



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

SUPERFAMILIA DE PROTEINAS REGULADORAS DEL
COMPLEMENTO Y SINDROME ANTIFOSFOLIPIDO.

Una nueva hipótesis sobre su fisiopatología.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA

P R E S E N T A
FRANCISCO LOPEZ LIRA



MEXICO, D. F.



1997



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.

Mi agradecimiento más profundo a mis maestros que me ayudaron en los momentos críticos de mis estudios: Dr. Jesús Guzmán García, Ma. Dolores Lastra y Magdalena Oliva.

Al Dr. Renato Berrón Pérez, por haberme brindado su apoyo y hospitalidad en el servicio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría

A la memoria de quienes me vieron iniciar, más nunca terminar, pero siempre tuvieron la plena confianza en que alcanzaría la meta propuesta: Elfego Huidobro Ayala, Marcelina Lira Valdéz, Gilberto Guerrero Castañeda y Gregorio Lira Valdéz

A mis amigos del laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría. Gracias por su apoyo.

**QFB Ma. Angélica Plaza González
QBP Carmen Lídice Velasco Manzano
IBQ Alicia Galindo Pérez
QBP Gloria Medina Oregón**

A HILDA por su paciencia y dedicación, que me ha permitido disponer del tiempo necesario para alcanzar el objetivo planteado cuando partimos en busca de nuestra superación y que parafraseando a Newton puedo decir: Si he alcanzado el ideal propuesto es porque he estado sostenido en los hombros de una gran mujer

A mis queridos hijos por los malos ratos que me han hecho pasar y que a pesar de ello los sigo queriendo, pues éste esfuerzo lo hago pensando en su futuro

A mis padres y hermanos

Esta especialidad fué efectuada gracias al apoyo otorgado por la Universidad Autónoma de Nayarit y al otorgamiento de una beca parcial por la SEP a través del programa FOMES, y del programa SUPERA de la Asociación Nacional de Universidades e Institutos de Enseñanza Superior (ANUIES)

ÍNDICE

Abreviaturas	iii
Resumen	v
Motivación	vii
I.- Introducción	1
II.- Síndrome antifosfolípido	7
III.- Proteínas reguladoras de la activación del complemento	15
IV.- Coagulación sanguínea y vía anticoagulante de la proteína C	27
V.- Beta-2-glicoproteína I y Protrombina	32
VI.- Discusión	36
VII.- Conclusiones	40
VIII.- Bibliografía	41

ABREVIATURAS

- ACA.- Anticuerpos anticardiolipina
- ADP.- Adenosín difosfato
- APA.- Anticuerpos antifosfolípido
- APS.- Síndrome antifosfolípido
- BFP-STTS.- Prueba biológica para sífilis falsa positiva
- β 2GPI.- Beta-2-glicoproteína I
- CCP.- Proteína control del complemento
- CI.- Complejos inmunes
- CH 50.- Complemento hemolítico al 50 %
- C3.- Componente número 3 del sistema del complemento
- C3bBb.- C3 convertasa de la vía alterna del complemento
- C4.- Componente número 4 del sistema del complemento
- C4b2a.- C3 convertasa de la vía clásica del complemento
- C4bBP.- Proteína fijadora del fragmento C4b del sistema del complemento
- CR1.- Receptor tipo 1 del sistema del complemento
- DAF.- Factor acelerador del decaimiento
- dsDNA.- Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
- ELISA.- Ensayo inmunoenzimático
- ENA.- Anticuerpos a antígenos extraíbles de núcleo
- FV.- Factor V de la coagulación sanguínea
- FVa.- Factor V activado
- FVIII.- Factor VIII de la coagulación sanguínea
- FVIIIa.- Factor VIII activado
- FIX.- Factor IX de la coagulación sanguínea
- FIXa.- Factor IX activado
- FX.- Factor X de la coagulación sanguínea
- FXa.- Factor X activado
- fPS.- Proteína S libre
- iC3b.- Fragmento C3b del complemento inactivado
- IgG.- Inmunoglobulina G
- IgM.- Inmunoglobulina M
- Kd.- Constante de disociación
- kDa.- Kilodalton
- MAC.- Complejo de ataque a membrana
- MCP.- Proteína cofactora de membrana
- PAPS.- Síndrome antifosfolípido primario
- PC.- Proteína C de la coagulación
- PCa.- Proteína C activada
- PS.- Proteína S de la coagulación
- PT.- Protrombina
- RCA.- Reguladores de la activación del complemento
- SCR.- Secuencias repetidas de concensos cortos

DE.- Desviación estándar
SLE.- Lupus eritematoso sistémico ó generalizado
TM.- Trombomodulina
tPS.- Proteína S total
VDRL.- Prueba para sífilis. Siglas de Venereal Disease Reseach
Laboratory

RESUMEN

El síndrome antifosfolípido (APS), se caracteriza por la presencia de anticuerpos antifosfolípido (APA), asociados a trombosis, aborto espontáneo recurrente o trombocitopenia. Entre otras enfermedades el (APS) se presenta frecuentemente en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE). Una desregulación en el funcionamiento de la vía clásica del complemento, predispone a SLE por lo que es de llamar la atención: 1.- La existencia de un APS en SLE y 2.- La presencia en el APS de complejos inmunes asociados a bajos niveles de C4 y CR1. Los APA reconocen como blanco antigénico una combinación de proteína fosfolípido, siendo la beta-2-glicoproteína I (β 2GPI) y la protrombina, las proteínas mejor identificadas. La β 2GPI es un miembro de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento, (C4bBP, CR1, DAF y MCP), caracterizadas por poseer uno ó varios dominios SCR. Existen varios datos que sugieren una posible asociación entre APA y alteración en estas proteínas reguladoras.

La proteína C4bBP también participa en el sistema anticoagulante de la proteína C formando un complejo con la proteína S. Una deficiencia de proteína S se ha relacionado con trombosis. Bajos niveles de PS libre, PS total, C4bBP, así como del complejo C4bBP-PS han sido asociados a los APA en SLE. La proteína C4bBP es la principal proteína eluida cuando el plasma humano es adsorbido con anti- β 2GPI ó β 2GPI, por lo que resulta interesante que la inmunización de animales de laboratorio con la β 2GPI, produzca un cuadro clínico similar al APS.

En esta tesis. se propone un nuevo mecanismo de acción que explica la patología del APS que consiste en el posible reconocimiento de un epitopo común compartido por los miembros de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento a la cual pertenece el principal blanco antigénico

reconocido hasta ahora: la beta-2-glicoproteína I, el cual involucra al sistema del complemento y a la vía anticoagulante de la proteína C.

MOTIVACIÓN

Como estudiante de la Especialización en Bioquímica Clínica, durante mi estancia hospitalaria en el servicio de inmunología del Instituto Nacional de Pediatría (INP), realicé una estancia con la QFB Angélica Plaza en el área donde se determinan los anticuerpos anticardiolipina (ACA), complejos inmunes y complemento hemolítico. Anteriormente a mi paso por el Instituto Nacional de Perinatología, los fosfolípidos me habían llamado la atención por su importancia en la madurez pulmonar del feto, por lo que al saber que en la determinación de ACA participaban fosfolípidos, volví a fijar mi atención en éstas moléculas.

Los lunes de cada semana, en el servicio de inmunología del instituto (INP), me correspondía participar en las sesiones de laboratorio con los médicos de la especialidad en inmunología y recuerdo que en una ocasión cuando se hablaba de anticuerpos "antifosfolípido", el Dr. Renato Berrón, jefe del servicio, hizo mención de que por lo que observaba en clínica, el complemento debería tener una participación muy importante en la patología del síndrome antifosfolípido, por lo que sería interesante (sugería el Dr. Berrón), contar con una técnica o diseñar una, que pudiera poner de manifiesto ésta observación.

Un hallazgo interesante fué el observado por Angélica Plaza al determinar ACA a una muestra que había sido previamente inactivada por calor a 56 °C durante 30 minutos (Angélica había ensayado la muestra utilizada en estudios de inmunofluorescencia que requiere de la inactivación de proteínas del complemento a 56 °C durante 30 min, pues no tenía otra), la cual resultó francamente positiva para ACA. Al repetir el experimento, la diferencia resultó evidente. Angélica me comentó el suceso, estimulando mi curiosidad.

En un artículo publicado por el Dr. Cheng Hwee-Ming, (Cheng, H. M. - 1991-. Antiphospholipid antibodies are masked in normal human serum. Immunol. Today. 12:96) se reporta una observación similar a la que Angélica me comentó. La explicación que el Dr. Cheng dió a su observación, consistió en suponer la posible presencia de un inhibidor unido a los anticuerpos antifosfolípido, de tal manera que cuando se calentaba la muestra para inactivarla, el inhibidor dejaba libre al anticuerpo, resultando en un incremento en la positividad de la prueba para ACA.

En la bibliografía existe una controversia sobre el verdadero blanco antigénico de los anticuerpos “antifosfolípido” debido a la descripción reciente de un cofactor protéico necesario para poner de manifiesto a estos anticuerpos, identificado como Beta-2-glicoproteína I (apolipoproteína H). Al realizar la investigación bibliográfica de este nuevo cofactor, me llamó la atención que esta proteína perteneciera a la superfamilia de proteínas reguladoras de la activación del complemento, preguntándome si tendría alguna relación con las alteraciones vasculares observadas en los pacientes pediátricos con ACA, donde se sugería una participación del complemento. ¿Sería este el inhibidor responsable del fenómeno descrito por el Dr. Ming y una explicación a lo observado por Angélica? , ¿Sería esta la respuesta a la pregunta que el Dr. Berrón hizo al proponer la invención de una técnica en la cual se demostrara la participación del complemento? , ¿sería posible una explicación molecular?. Si no es así al menos esto fué lo que motivó y ha dado origen a este trabajo.

I.- INTRODUCCIÓN

Históricamente, la observación de la existencia de una prueba biológica para sífilis falsa positiva (BFP-STS), manifestada persistentemente en personas sin evidencia clínica ó epidemiológica de sífilis (1), promovió una serie de investigaciones que dieron origen a lo que hoy conocemos como síndrome antifosfolípido (APS).

Los primeros estudios evidenciaron una estrecha asociación entre BFP-STS y las enfermedades autoinmunes, particularmente lupus eritematoso sistémico (2). Posteriormente fué reconocida una asociación entre BFP-STS y la presencia, paradójica, de un inhibidor de la coagulación en personas con manifestaciones de trombosis y trombocitopenia (3). A éste inhibidor se le denominó anticoagulante lúpico (4).

La poca sensibilidad y especificidad de los exámenes de laboratorio para sífilis y anticoagulante lúpico, creó la necesidad de contar con una prueba que pudiera brindar un mejor apoyo discriminatorio entre las observaciones mencionadas y su relación a enfermedad, para lo cual Harris y col. desarrollaron una técnica en fase sólida por radioinmunoensayo utilizando cardiolipina pura como antígeno (5), que posteriormente fué modificada y adaptada a un ensayo inmunoenzimático (6). Los anticuerpos detectados de ésta manera fueron llamados anticuerpos anticardiolipina (ACA) y la patología clínica asociada a ellos se le llamó síndrome anticardiolipina (7). El empleo de otros fosfolípidos en lugar de cardiolipina, demostró que sólo aquellos fosfolípidos con carga negativa, eran reconocidos como antígenos (8), originando el término de anticuerpos antifosfolípido (APA). Como resultado de éstos estudios, Harris propuso, que a la combinación de trombosis venosa o arterial con trombocitopenia, asociada a anticuerpos antifosfolípido, fuera denominada síndrome antifosfolípido (9).

Recientemente se ha demostrado que los APA detectados por ELISA, reconocen como blanco antigénico o requieren para hacerse evidentes, de un cofactor plasmático conocido como beta-2-glicoproteína I (β 2GPI) (10-12), lo que ha generado una controversia sobre la demostrada antigenicidad fosfolipídica. Actualmente la mayoría de los investigadores en el área del APS, sostiene que los APA no están dirigidos contra fosfolípidos, como se pensó originalmente, sino contra proteínas plasmáticas que exhiben una elevada afinidad por superficies fosfolipídicas. Por ésta razón se ha propuesto el uso del término “anticuerpos a proteínas que se unen a fosfolípidos”, en sustitución del término de anticuerpos antifosfolípido (13-14) y al síndrome asociado a éstas proteínas como síndrome antifosfolípido/cofactor (14b). Las proteínas más comunes y mejor caracterizadas son la β 2GPI y la protrombina (15-16). Mucho del trabajo experimental realizado sobre el APS, ha sido enfocado sobre la posible implicación que puedan tener éstas proteínas en la patología de la enfermedad.

Estructuralmente la β 2GPI es un miembro de la superfamilia de proteínas reguladoras de la activación del sistema del complemento (Superfamily CCP/SCR), las cuales están caracterizadas por poseer uno o varios dominios SCR (Short Consensus Repeats), característicos de éste tipo de proteínas (17-19). A ésta familia de proteínas reguladoras pertenecen : la proteína fijadora del fragmento C4b del complemento (C4bBP); el factor H; el receptor tipo 1 del complemento (CR1, CD35); el factor acelerador del decaimiento (DAF, CD55) y la proteína cofactora de membrana (MCP, CD46), todas con una función reguladora sobre las C3 convertasas, tanto de la vía clásica (C4b2a), como de la vía alterna (C3bBb), cruciales para el funcionamiento del complemento (Fig. 1).

VÍA CLÁSICA

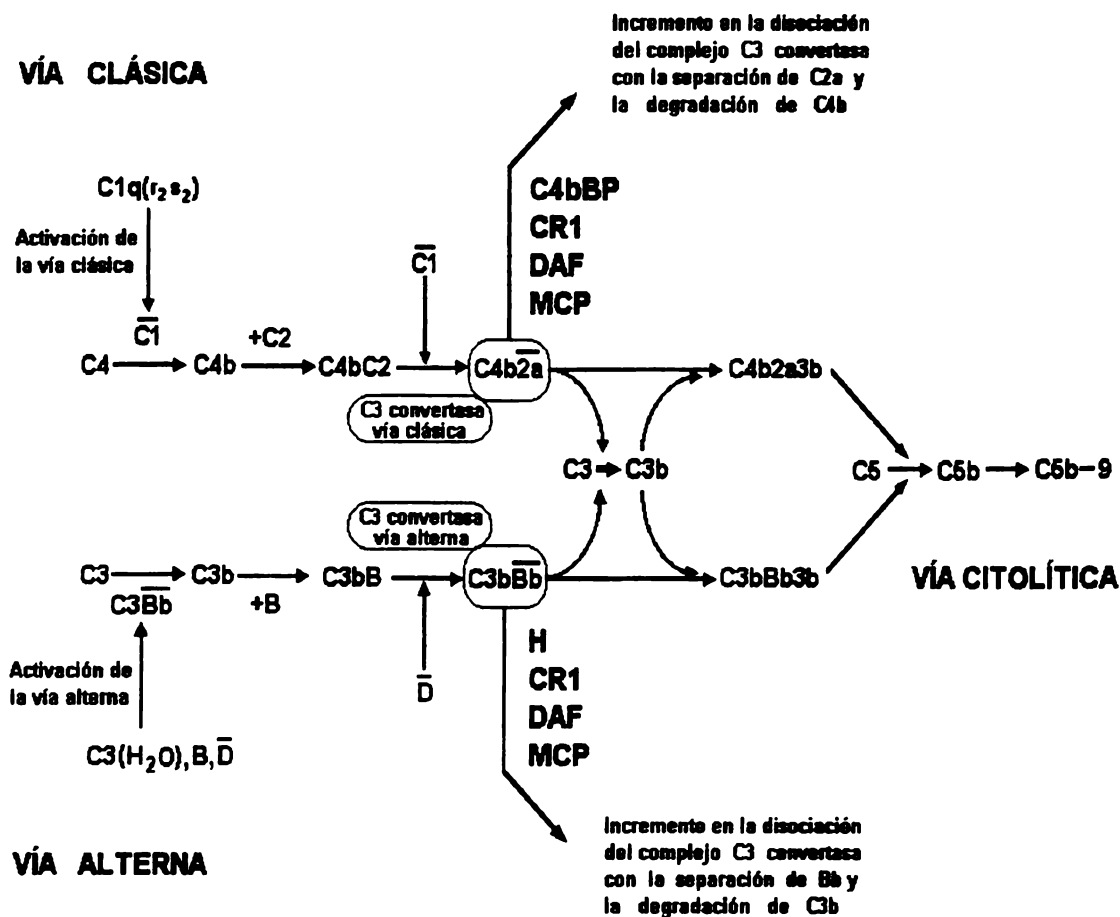


Figura 1. Principales vías de activación del sistema del complemento. Vía clásica, vía alterna y vía citolítica o de ataque a membrana y proteínas reguladoras (C4bBP, CR1, etc.).

Es de llamar la atención que la inmunización de conejos blancos Nueva Zelanda y de ratas Suizas NIH con $\beta 2GPI$, origine un cuadro clínico similar al de un APS con la formación de APA y de anticuerpos a $\beta 2GPI$ (20-21). A este respecto resulta interesante que los anticuerpos que reconocen a la $\beta 2GPI$ como antígeno, reconozcan también a la proteína C4bBP (22).

La trombosis asociada a APA, ha permitido fijar la atención, como uno de los posibles mecanismos causantes de patología en el APS, a la relación que puedan tener los APA con la vía anticoagulante de la proteína C (23), (Fig. 2) debido a que personas con una alteración heredada o adquirida en el funcionamiento de la proteína C ó proteína S cursan con una marcada predisposición a padecer trombosis (24-25). Es de interés que la proteína

C4bBP forme un complejo estequiométrico 1:1 con la proteína S, lo que ha permitido suponer que la C4bBP desarrolle una función importante en la regulación de la coagulación (26-28). La C4bBP es una proteína de fase aguda y durante la respuesta inflamatoria su concentración puede incrementarse hasta en un 400 % (29). En el plasma humano, del 30 al 40 % de la proteína S se encuentra libre y tiene actividad de cofactor para la proteína C activada, el resto se encuentra unido a la proteína C4bBP y circula en forma inactiva (26-28). Datos preliminares recientes, han sugerido que la β 2GPI pudiera tener una función reguladora importante, inhibiendo la interacción entre la proteína S y C4bBP (22).

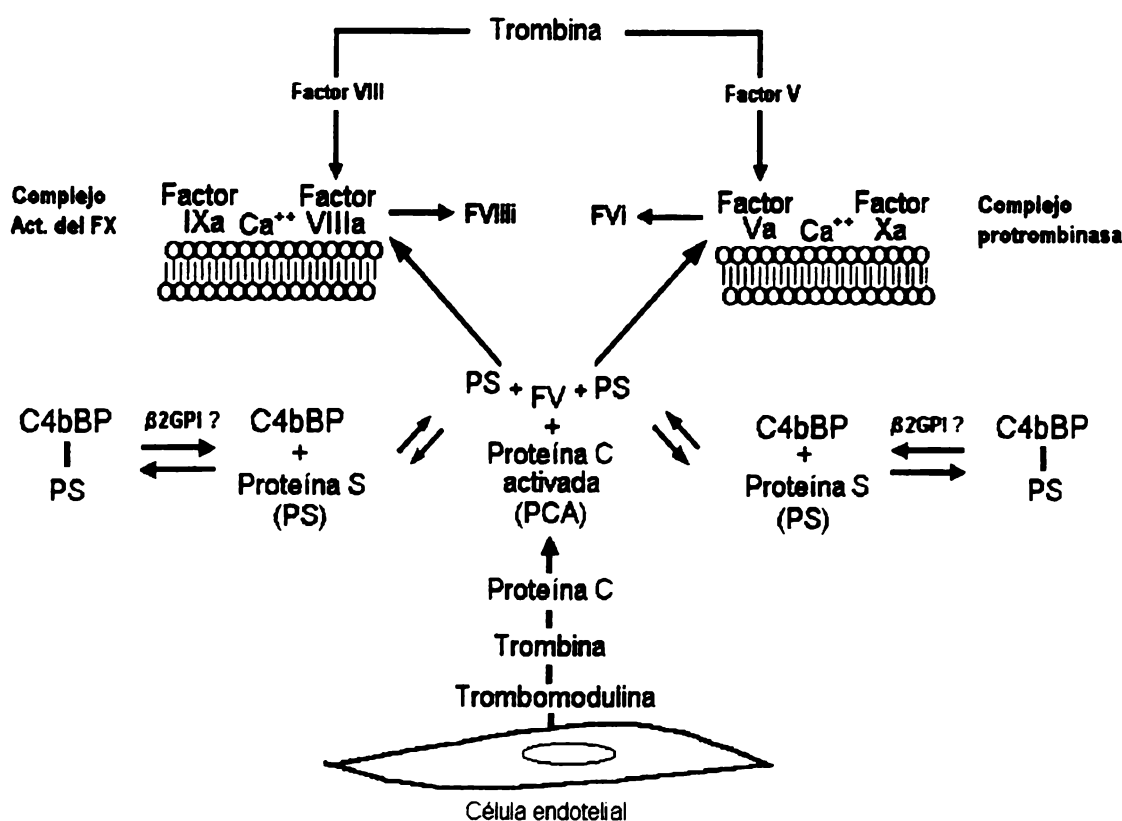


Figura 2. Vía anticoagulante de la proteína C. La trombina convierte al factor VIII y al factor V a sus formas activas: Factor VIIIa y factor Va. Un complejo formado por la trombina con el receptor de la célula endotelial, trombomodulina, activa a la proteína C. La proteína C activada, inactiva a los factores VIIIa y al factor Va sobre la superficie plaquetaria, esta reacción es acelerada por el factor V y la proteína S.

Una mínima atención ha merecido la existencia de un APS en SLE, donde al parecer muchas de las manifestaciones clínicas que se presentan en SLE están fuertemente asociadas a la presencia de APA (30-32). Es notorio que entre las principales alteraciones serológicas asociadas a APA y APS en SLE se encuentre una hipocomplementemia con niveles disminuidos de C4 (33-35), la presencia de complejos inmunes (34) y una disminución en los niveles de CR1 (36), manifestaciones que reflejan un inadecuado manejo de los complejos inmunes y por lo tanto de una alteración en la regulación del sistema del complemento, sobre todo de la vía clásica. A este respecto llama la atención la observación de que una desregulación en la vía clásica del sistema del complemento, predisponga a SLE (37).

El receptor tipo 1 del sistema del complemento es un regulador de la actividad de la C3 convertasa, tanto de la vía clásica como alterna (figura 1), así mismo, regula la degradación dependiente de factor I de C3b y C4b soluble (38). Se encuentra presente sobre la superficie de todas las células sanguíneas, donde los eritrocitos, por su elevada cantidad, aportan el mayor número de receptores. CR1 participa también en el transporte y depuración de los complejos inmunes que poseen C3b ó C4b (38-40), por lo que una disminución ya sea heredada o adquirida de este receptor, puede verse reflejada en la aparición de enfermedades por complejos inmunes como en SLE (41). La participación de CR1 en la patología del APS no ha sido considerada, no obstante su asociación a APA en SLE, presencia de complejos inmunes y niveles disminuidos de C4 (36). A este respecto son interesantes los estudios realizados con APA en SLE y su fijación a eritrocitos (42-44), lo que podría explicar la anemia hemolítica autoinmune reportada en el APS (45-46), con la posible participación de CR1.

DAF y MCP al igual que CR1, regulan la actividad de las C3 convertasas de la vía clásica y alterna del complemento (figura 1), se encuentran en todas

las células sanguíneas (con excepción de MCP que no se encuentra sobre los eritrocitos) y muy importantemente en el trofoblasto placentario (47). Se ha sugerido que el aborto espontáneo recurrente sea una consecuencia de la disminución de éstas proteínas en el trofoblasto placentario, sobre todo durante el primer trimestre del embarazo (48-50).

De acuerdo con éstas observaciones parece evidente una participación del sistema del complemento y del sistema de la coagulación sanguínea en la patología del APS, involucrando a la vía clásica en el sistema del complemento y a la vía anticoagulante de la proteína C en el sistema de la coagulación, por lo que no es de extrañar que la alteración de una vía influya en la otra.

Debido a que no existe un estudio que haya considerado al sistema del complemento como mecanismo probable causante de patología en el APS; en éste trabajo se propone un nuevo mecanismo de acción para los APA, consistente en el reconocimiento antigénico de un epitopo común, presente en los dominios SCR que poseen los integrantes de la familia de proteínas reguladoras de la activación del complemento (a la cual pertenece el principal blanco antigénico β 2GPI) y su influencia en la vía anticoagulante de la proteína C a través de la proteína C4bBP, justificando muchas de las manifestaciones clínicas y serológicas asociadas al APS, ofreciéndose una explicación de como los APA pudieran reconocer a la protrombina como antígeno.

II.- SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

La introducción de la técnica de ELISA para el estudio de los anticuerpos antifosfolípido, constituyó un avance significativo en la comprensión y definición del síndrome antifosfolípido.

El APS ha sido relacionado a SLE y a una serie de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome primario de Sjögren, lupus discoide, espondilitis anquilosante, etc., mas sin embargo en ninguna de éstas enfermedades se ha demostrado una asociación tan estrecha como la observada con SLE, lo que permitió concebir la idea de la posible existencia de un APS en SLE (7). Alarcón-Segovia y col. en un estudio realizado en 500 pacientes (agrandado posteriormente a 667) de su clínica de lupus en el Instituto Nacional de la Nutrición, demostró que efectivamente un APS existe en SLE, observando que pacientes con dos o más de las manifestaciones clínicas asociadas a APA, poseen frecuentemente un título elevado de anticuerpos en comparación con aquellos pacientes que tienen solo una (30-32). De acuerdo con éstos resultados se propuso un criterio de clasificación para el APS en SLE, considerando el número de manifestaciones clínicas y el título de APA presentes (30-32). Según ésta clasificación se considera un APS definitivo cuando se poseen dos de las manifestaciones clínicas propias del síndrome y un título elevado de APA, el cual es establecido por tener 5 DE por arriba de la media normal para los controles. Si se posee una manifestación clínica asociada a altos títulos de APA ó de dos manifestaciones y bajos títulos de APA, el APS debe considerarse como probable (Tabla 1).

La definición del APS en SLE permitió reconocer a otro grupo de pacientes con manifestaciones clínicas similares y elevados títulos de APA

pero sin la presencia de SLE ó alguna otra enfermedad autoinmune reconocible. A éste síndrome clínico se le denominó, síndrome antifosfolípido primario -PAPS- (34).

**Tabla 1. Criterio de clasificación para el APS
(30).**

DEFINIDO

Dos o más manifestaciones clínicas:

- pérdida fetal recurrente
- trombosis venosa
- oclusión arterial
- ulceración de piernas
- lívedo reticularis
- anemia hemolítica
- trombocitopenia

+ Títulos elevados de APA (IgG ó IgM > 5 DE)

PROBABLE

Una manifestación clínica y títulos elevados de APA
ó

Dos o más manifestaciones clínicas y título bajo de APA
(IgG ó IgM: 2-5 DE)

Los pacientes con APS en SLE poseen perfiles clínicos y de laboratorio similares a aquellos con PAPS (Tabla 2 y 3), con excepción de niveles disminuidos de C4, anemia hemolítica, neutropenia y linfopenia los cuales se presentan más frecuentemente en pacientes con APS en SLE (35).

**Tabla 2. Manifestaciones clínicas en APS
(34)**

	PAPS	APS en SLE
Trombosis venosa	presente	presente
Embolismo pulmonar	presente	presente
Trombosis arterial	presente	presente
Pérdida fetal	presente	presente
Lívedo reticularis	presente	presente

La variación observada en los parámetros serológicos (Tabla 3), con la presencia de complejos inmunes, crioglobulinas y niveles disminuidos de C4 es un reflejo de un manejo inadecuado de los complejos inmunes, lo que sugiere una alteración en el funcionamiento del sistema del complemento, principalmente de la vía clásica. En este sentido es relevante la propuesta y comprobación de la existencia de un APS en SLE (7, 30-32), siendo significativa la predisposición a padecer SLE como consecuencia de una desregulación (adquirida) en el funcionamiento del sistema del complemento (37), sobre todo de la vía clásica en donde participan los miembros de la superfamilia de proteínas reguladoras de la activación del complemento, C4bBP, CR1, DAF y MCP (Fig. 3). A este respecto es interesante la demostración de que los APA reconocen como blanco antigénico, una

Tabla 3. Parámetros serológicos en pacientes con APS (34)

	PAPS	APS en SLE
dsDNA	ausente	presente
ENA	ausente	presente
VDRL (falsa positiva)	20-30 %	20-30 %
Ac. antimitocondriales M5	20-30 %	20-30 %
Complejos inmunes	presentes	presentes
Deficiencia de C4	presente	presente
Crioglobulinemia	presente	presente
Factor reumatoide	ausente	presente

combinación de proteína-fosfolípido y no fosfolípidos únicamente, como se pensó originalmente (10-12), aunque, evidencia reciente sugiere que los APA reconocen sólo a la proteína sin la presencia de la molécula fosfolipídica (51-53). Actualmente las proteínas más comunes y mejor caracterizadas como blancos antigénicos son: la β 2GPI y la protrombina (15-16).

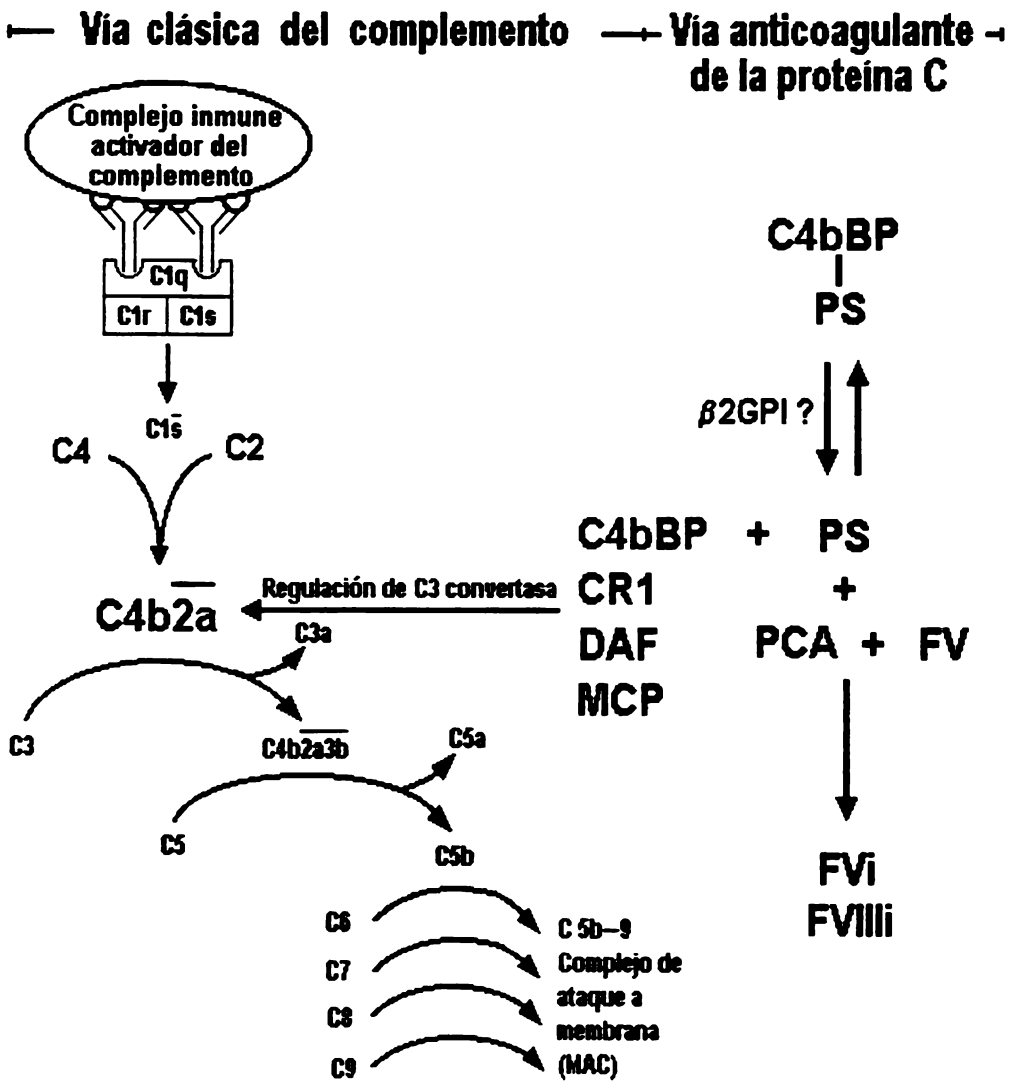


Figura 3. Vía clásica del sistema del complemento y su relación con la vía anticoagulante de la proteína C.

La β 2GPI es una proteína plasmática de fase aguda negativa (54-55) que pertenece a la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento cuya función no ha sido establecida. Se ha sugerido una participación importante en el sistema de la coagulación sanguínea, como un anticoagulante natural, por lo que es relevante la observación de que pudiera interaccionar con el complejo formado entre la proteína C4bBP y la proteína S de la coagulación (22).

La presencia de trombosis tanto venosa como arterial en el APS, ha orientado a pensar en un posible desbalance en el sistema de la coagulación sanguínea, más importantemente en la vía anticoagulante de la proteína C, debido a que una desregulación en esta vía, se acompaña de una marcada predisposición a sufrir complicaciones tromboembólicas (23-25, 56-58). Es de llamar la atención que anticuerpos contra β 2GPI reconozcan a la proteína C4bBP (22). Estudios en pacientes con APA y SLE encaminados a detectar alguna alteración en el funcionamiento de esta vía han reportado bajos niveles de proteína S total (tPS), proteína S libre (fPS), C4bBP, así como del complejo C4bBP-PS (59-60).

La existencia de una prueba de Coombs positiva ha sido reportada en pacientes con APS. Algunos estudios han relacionado ésta prueba con una baja actividad de CR1 (61), una hipocomplementemia (niveles disminuidos de C3 y C4) y presencia de complejos inmunes (33, 61), éstas dos últimas actividades presentes también en el APS (34-35). Una disminución significativa de CR1 ha sido asociada a APA (36). De acuerdo con estas observaciones, es interesante la relación existente entre una disminución de los niveles de CR1 y la presencia de anemia hemolítica en SLE (62) así como su asociación a APA (36). A este respecto la presencia de CR1 sobre la superficie de los eritrocitos y su participación en el transporte y depuración de los complejos inmunes es también interesante. Se ha propuesto, que sobre la superficie de los eritrocitos se encuentra alguna molécula todavía no identificada, diferente a la β 2GPI que pudiera actuar como cofactor incrementando la fijación de los APA a los eritrocitos (42-44). lo que en determinadas situaciones pudiera provocar la anemia hemolítica reportada en el APS (45, 62-63). Los experimentos realizados con anticuerpos eluidos de eritrocitos de pacientes con SLE y Coombs positivo, han resultado en la obtención de un prueba de ELISA con cardiolipina, positiva para APA (33, 43); así mismo, el suero de pacientes con un título elevado de APA en presencia de eritrocitos fijados con glutaraldehído

y posterior determinación de APA por ELISA, origina una disminución en el título de APA (42-44), lo que apoya la propuesta antes mencionada donde todo pareciera indicar que la molécula involucrada sea el CR1, la cual pertenece a la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento.

Para las hemocitopenias observadas en el APS los estudios son escasos (46). Se ha sugerido para la trombocitopenia que durante la activación plaquetaria, la β 2GPI pudiera unirse a la membrana de la plaqueta permitiendo su reconocimiento por los APA, lo que provocaría su eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (64-66). Para la neutropenia y linfopenia no se conoce una explicación, pero, es tentador suponer un mecanismo de acción similar al propuesto para los eritrocitos en el Coombs positivo, con la existencia de alguna molécula sobre su superficie celular (CR1, DAF ó MCP ?) que pudiera interactuar con los APA, dando lugar a su eliminación por activación del complemento, fagocitosis ó citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.

Por otra parte, mujeres con aborto espontáneo recurrente presentan una disminución significativa de los componentes del complemento C4 y C3, acompañados de una prueba directa de Coombs positiva asociada a bajos niveles de PS (67). Es de llamar la atención que en el trofoblasto placentario de mujeres con aborto espontáneo recurrente sobre todo durante el primer trimestre del embarazo se encuentra una disminución significativa de la proteína reguladora de la activación del complemento DAF, asociada a una hipocomplementemia con baja actividad del complemento hemolítico (CH 50) (48). Se ha sugerido que dos proteínas reguladoras del complemento asociadas a membrana (DAF y MCP) pudieran tener una función importante en la protección del feto durante las etapas tempranas del desarrollo (48-50). DAF y MCP son proteínas que se encuentran sobre la superficie de todas las células sanguíneas (con la notable excepción de MCP que no se encuentra sobre los eritrocitos), células del endotelio vascular, células epiteliales, espermatozoides

y trofoblasto placentario (42). Las proteínas DAF y MCP también forman parte de la superfamilia de proteínas a la que pertenecen C4bBP, CR1 y sobre todo la β 2GPI.

Con respecto al PAPS, debido a que comparte características serológicas y clínicas similares al APS en SLE, se ha sugerido que pudiera ser un precursor muy temprano en la aparición de SLE (68). Estudios clínicos de seguimiento a largo plazo (20 años ?), son requeridos para comprobar semejante observación.

III.- PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

El sistema del complemento es un mecanismo de defensa del organismo contra las infecciones y un componente integral de los procesos inflamatorios presente en todos los vertebrados. Está compuesto por una serie de proteínas y glicoproteínas (Tabla 4 y 5) que funcionan colectivamente como uno de los principales mecanismos efectores del sistema inmune humoral, tanto en la identificación y eliminación de microorganismos patógenos, como en la depuración de complejos inmunes (69).

La activación del sistema propicia el inicio de una serie de reacciones bioquímicas, en donde cada uno de los componentes activa a otro en una secuencia de cascada (Fig. 1). Este mecanismo permite una considerable amplificación de la activación, de tal manera que una señal de iniciación, estimula la formación de grandes cantidades de productos activos.

El sistema está organizado en dos vías de activación: vía clásica y vía alterna; una vía citolítica común ó de ataque a membrana y, proteínas reguladoras tanto plasmáticas como asociadas a membrana (Fig. 1 y Tablas 4 y 5).

La función primaria de las dos vías de activación es generar C3 convertasas, C4b2a para la vía clásica y C3bBb para la vía alterna (70). La vía clásica está integrada por los componentes C1, C4, C2 y C3, siendo el principal mecanismo de activación mediado por anticuerpos. La vía alterna la forman los factores B y D, así como el componente C3 que es común con la vía clásica. Puede funcionar en ausencia de anticuerpos y es básicamente espontánea. La fase final o citolítica, corresponde a la formación del complejo de ataque a membrana (MAC), el cual daña la membrana de las células blanco sobre las

Tabla 4. Propiedades de las proteínas del sistema del complemento

	Componente	Peso molecular (kDa)	Concentración plasmática (mg/L)	Función
Vía clásica	C1q	460	80	Fija Ig; inicia la activación de la vía clásica
	C1r	83	50	Activa al componente C1s
	C1s	83	50	Activa a C4 y a C2
	C4	205	600	Se une a C2 durante la activación
	C2	102	20	Activa a C3 y a C5
Vía alterna	Factor B	93	210	Activa a C3 y a C5
	Factor D	24	2	Activa al Factor B
	Properdina	220	26	Estabiliza las convertasas de la vía de activación
Común	C3	185	1300	Se une a C5 en las convertasas
Complejo de ataque a membrana (MAC)	C5	190	70	Inicia el ataque a membrana
	C6	120	65	Autoasociación con rompimiento de C5 para formar los sitios de la membrana a los cuales C9 pueda fijarse
	C7	110	55	
	C8	150	55	
	C9	69	60	Principal componente de MAC

que se forma. Esta vía está formada por los componentes C5, C6, C7, C8 y C9 (70).

Los componentes de las vías de activación del sistema del complemento (clásica y alterna), comparten una estrecha homología estructural y funcional entre las proteínas que la integran por lo que no es de extrañar que mecanismos similares regulen su activación. De importancia fundamental son las proteínas C4 y C3, cuya activación conduce a la formación de los fragmentos C4b y C3b respectivamente (17). Muchos de los efectos biológicos

Tabla 5. Proteínas reguladoras del sistema del complemento

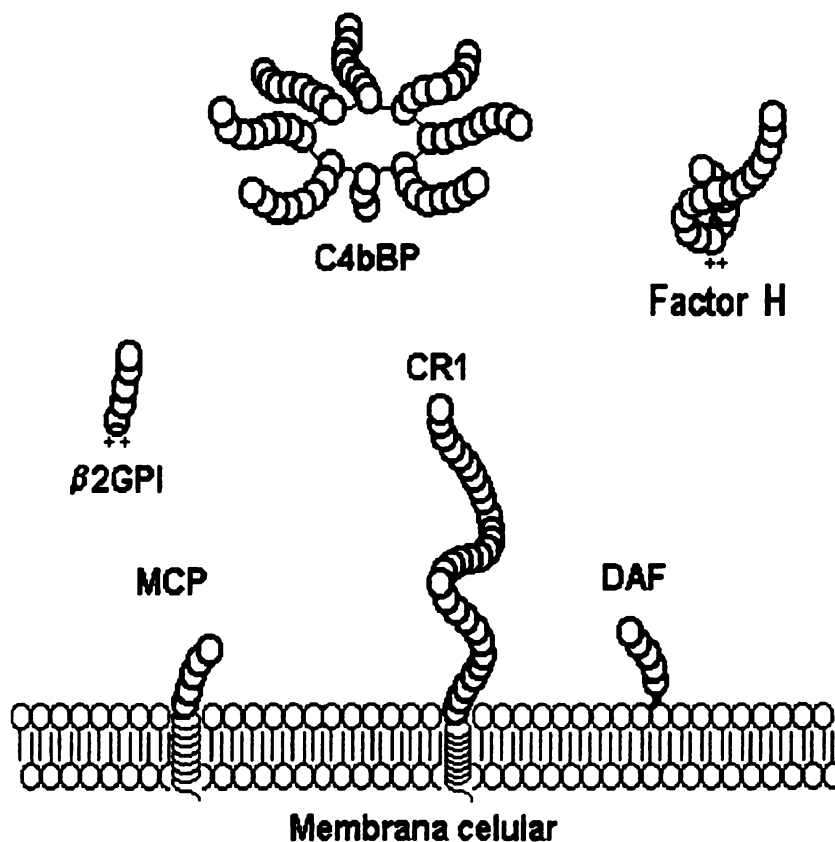
	Componente	Peso molecular (kDa)	Concentración plasmática (mg/L)	Función
Proteínas solubles	C1-INH	110	200	Se une a C1r+C1s, disocia a C1 activado
	C4bBP	500	250	Incrementa la disociación de C4b2a y actúa como cofactor del Factor I en el rompimiento de C4b
	Factor H	150	450	Acelera la disociación de C3bBb, y funciona como cofactor del Factor I en la degradación de C3b
	Factor I	80	35	Degrada a C4b y C3b
	Proteína S	83	500	Se une en fase fluida a C5b-7
	Proteína Sp 40-40	70	50	Se une en fase fluida a C5b-7
Proteínas asociadas a membrana	CR1	160-250		Incrementan la disociación de las C3/C5 convertasas y funcionan como cofactores del Factor I en la degradación de C4b y C3b
	DAF	70		
	MCP	45-70		
	HRF/MIP	65		Regula la formación/actividad del MAC

del sistema del complemento, los cuales involucran la inducción de respuestas inflamatorias, fagocitosis, muerte y lisis de bacterias y virus, son mediados por una variedad de receptores para éstas moléculas.

El control de la activación del complemento a este nivel, es crítico, y es efectuado por un grupo importante de proteínas tanto plasmáticas como asociadas a membrana que funcionan impidiendo la formación o incrementando la disociación de las convertasas C4b2a y C3bBb, las cuales contienen las formas activas de las enzimas C2 y factor B ó por actuar como cofactores en la proteólisis limitada de C4b y C3b por factor I. Este grupo de proteínas está integrado (como fué mencionado en la introducción) por la proteína fijadora del fragmento C4b (C4bBP), el factor H, el receptor tipo 1 del complemento (CR1, CD35), la proteína cofactora de membrana (MCP, CD46) y el factor acelerador del decaimiento (DAF, CD55) las cuales forman parte de la superfamilia de proteínas conocida como reguladora de la activación del complemento (17-19, 71). C4bBP y factor H son proteínas plasmáticas, donde CR1, DAF y MCP se encuentran unidas a membrana (Fig. 4 y Ref. 47, 72-73). Una característica sobresaliente de las proteínas que forman ésta familia es su capacidad para interactuar con los subcomponentes C4b y C3b.

Estudios moleculares recientes, han descrito que los genes que codifican éstas proteínas reguladoras se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma humano 1, en la banda 32q, cuya expresión da origen a proteínas formadas primariamente por un motivo estructural poco común de 60 residuos de aminoácidos, con una secuencia consenso basada en 4 cisteínas invariables, unidas por puentes disulfuro en un modelo cis 1-3 y cis 2-4 (Fig. 5). Otros aminoácidos con un elevado grado de conservación en éstas unidades, incluyen a la prolina, triptofano, tirosina/fenilalanina y glicina. A éste tipo de dominio se le ha denominado de diferentes maneras: módulo GPI porque fué descrito por primera vez en la proteína beta-2-glicoproteína I; módulo B debido

Miembros de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento



O = Dominio SCR

Figura 4. Miembros de la superfamilia de proteínas que poseen en su estructura dominios SCR o CCP pertenecientes al sistema del complemento (C4bBP, factor H, CR1, MCP y DAF), así como no pertenecientes al sistema: beta-2-glicoproteína I.

a que el factor B del complemento posee éste tipo de unidad; dominio Sushi porque de acuerdo a su estructura primaria, se le encontró parecido a la forma Sushi del platillo japonés; dominio SCR, por su descripción en el idioma inglés como secuencias repetidas de consensos cortos (Short Consensus Repeats) y finalmente módulo CCP (Complement Control Protein) debido a que las proteínas reguladoras de la activación del complemento poseen predominantemente éste tipo de unidades (19).

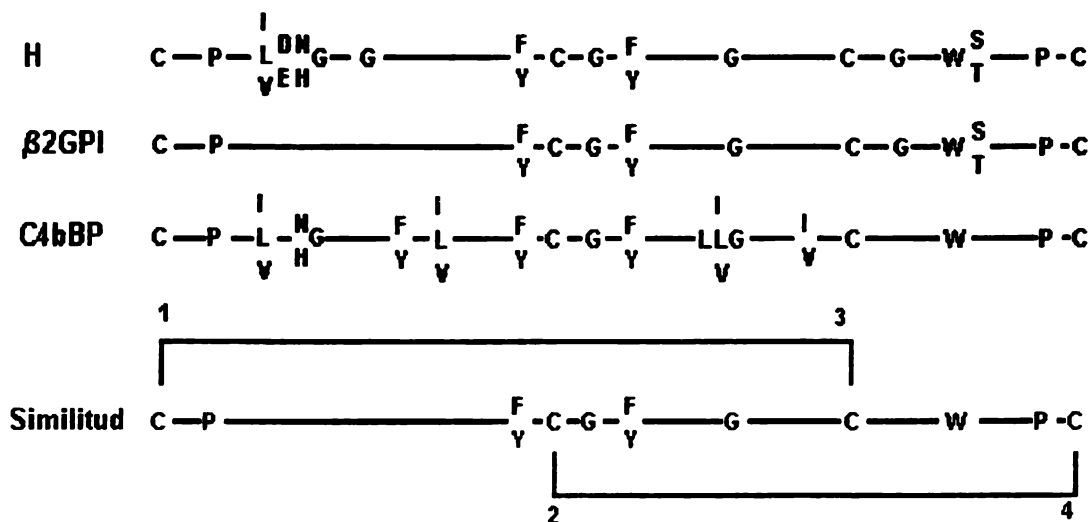
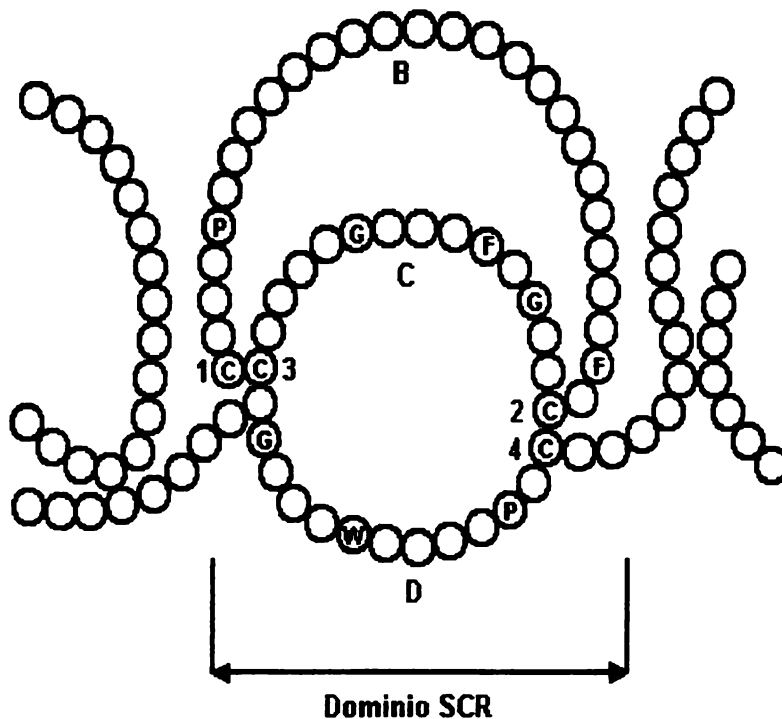


Figura 5. Dominio SCR típico, con formación de puentes disulfuro, en un ordenamiento cis 1-3 y cis 2-4. Se indican los aminoácidos que conservan homología.

Otras proteínas del complemento también poseen dominios similares, entre ellas se encuentran el fragmento C2b de C2 y Ba del factor B (C2 y factor B son proteínas homólogas, están codificadas por genes localizados en el complejo principal de histocompatibilidad) los cuales permiten la unión de C2 a C4b y del factor B a C3b respectivamente. También el subcomponente C1r posee éste tipo de unidades de repetición, sugiriendo fuertemente que sea ésta

la región de la molécula a la que se une C4 para activarlo. Otras proteínas no pertenecientes al sistema del complemento poseen secuencias homólogas similares, entre las que destacan el receptor de la interleucina 2, la subunidad b del factor XIII de la coagulación y de importancia fundamental la proteína beta-2-glicoproteína I.

La proteína C4bBP, es una proteína plasmática abundante, controla las convertasas que contienen C4b e interviene en la degradación dependiente de factor I de C4b soluble. Puede también actuar como cofactor para la degradación de C3b pero no en condiciones fisiológicas (72). C4bBP es una proteína multimérica, compuesta por siete cadenas alfa idénticas, cada una formada por ocho dominios SCR y una cadena beta con tres dominios SCR.

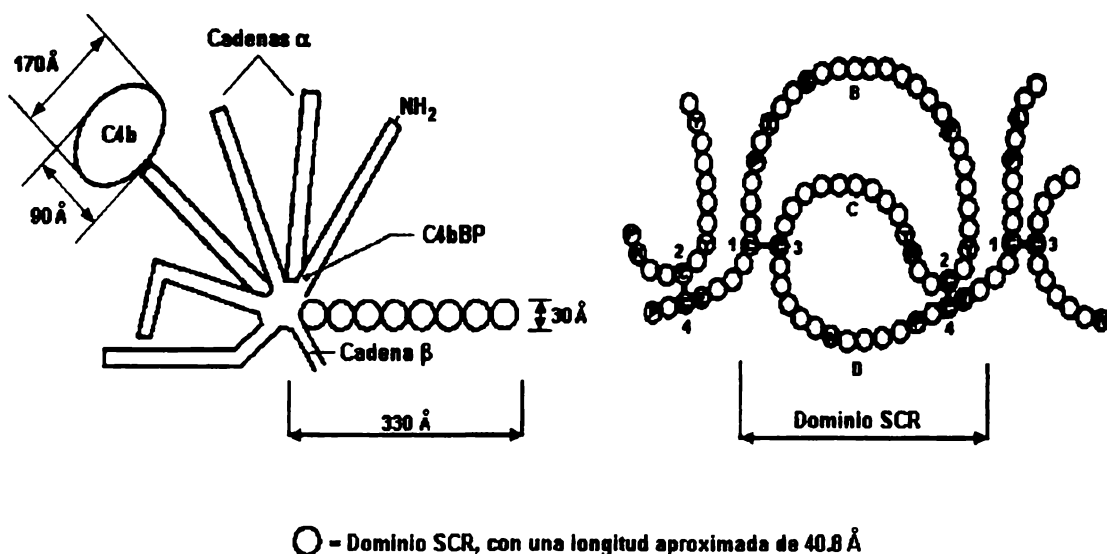


Figura 6. Un modelo esquemático que muestra a la proteína C4bBP unido a C4b, exhibiendo un posible acomodamiento de las 8 regiones de homología interna (dominio SCR). También se muestra una unidad de repetición con un acomodamiento de las cisteínas en una posición cis 1-3 y cis 2-4.

Las dos cadenas se encuentran unidas covalentemente por sus extremos C-terminal (Fig. 5). El peso molecular completo es de 500 kDa. La proteína se encuentra presente en el plasma en una concentración de 250 µg/mL (25 mg/dL ó 0.5 µM). Cuando es visualizada al microscopio electrónico, C4bBP

tiene una estructura en forma de araña, con tentáculos flexibles que se extienden a partir de un núcleo central (74, 76).

La proteína C4bBP también interacciona con la proteína S en la vía anticoagulante de la proteína C del sistema de la coagulación sanguínea sugiriendo una participación importante en éste sistema. Se ha propuesto que la proteína S pudiera funcionar en la fijación de la proteína C4bBP al sitio de daño dada su afinidad por superficies fosfolipídicas aniónicas, impidiendo la acción del complemento sobre las células autólogas (27,56,77). Es conocido que la activación del complemento conduce a una respuesta inflamatoria local debido parcialmente a la liberación de anafilatoxinas y a la atracción leucocitaria. La inhibición del complemento sobre superficies que estimulan las reacciones de la coagulación sanguínea puede ser benéfico, ya que una reacción inflamatoria ocurriendo en el mismo lugar y tiempo, puede conducir a la pérdida del control de las reacciones de la coagulación (por ejemplo por liberación de proteasas leucocitarias), con consecuencias fatales.

La interacción entre las dos proteínas es no covalente y el sitio de unión para la proteína S con C4bBP es distinto de aquel efectuado entre C4b y C4bBP (Fig. 7). Es de llamar la atención que la interacción entre éstas dos proteínas sea de alta afinidad (K_d 0.5-1.0 nM) y dependiente de iones calcio, tanto en sistemas con componentes puros como en suero o plasma (60), situación que admite al menos dos consideraciones: primera, una interacción de alta afinidad entre éstas dos moléculas, es indicativo de especificidad y de poseer una función biológica importante, como la que se atribuye a éste complejo y, segunda, la elevada afinidad sugiere que a las concentraciones plasmáticas en que se encuentran ambas proteínas, no debería encontrarse proteína S libre, lo que eliminaría la actividad de cofactor anticoagulante de la proteína S *in vivo* (77).

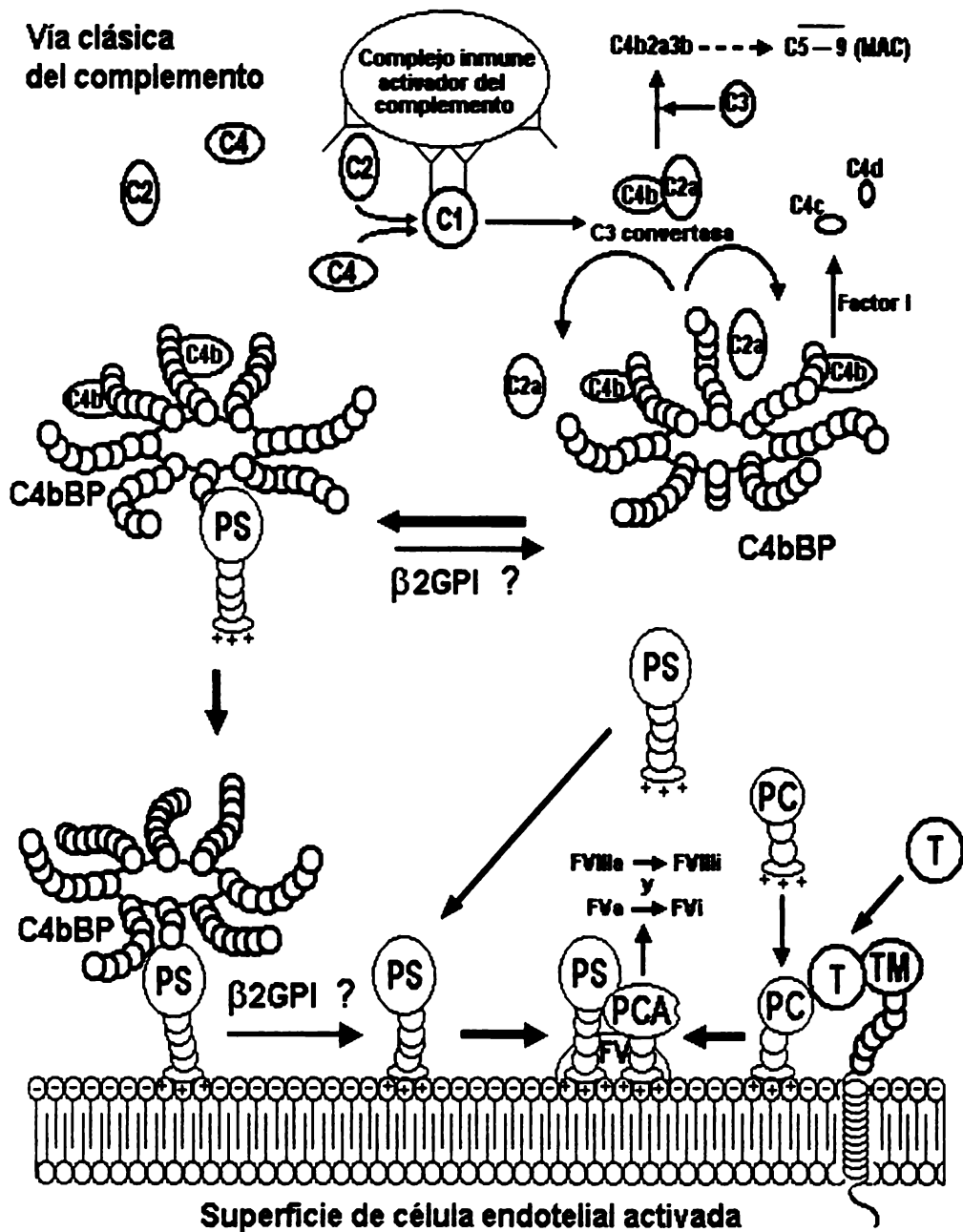


Figura 7. Esquema de la unión existente entre el sistema del complemento y el sistema de la coagulación sanguínea a través de la proteína C4bBP y la posible función de la proteína beta-2-glicoproteína I.

Estas observaciones son inconsistentes con una interacción binaria simple entre C4bBP y PS, por lo que es posible que exista una tercera molécula, todavía no identificada, que sea la responsable de mantener cantidades adecuadas de proteína S libre. Una deficiencia (heredada ó adquirida) de éste tercer componente hipotético, pudiera estar asociado a

niveles disminuidos de proteína S libre, reduciendo a una interacción binaria de alta afinidad la interacción entre C4bBP y proteína S (77-78). Si ésta es la explicación bioquímica para la deficiencia selectiva de proteína S libre habrá que demostrarlo.

Se ha reportado que el plasma bovino contiene una proteína fijadora de proteína S, la cual es diferente de C4bBP (79). También se ha descrito que contiene una sustancia que inhibe la interacción entre proteína S y C4bBP. Este inhibidor ha sido purificado por cromatografía de intercambio iónico y por filtración en gel (22), encontrándose que posee una secuencia amino terminal similar al de la proteína beta-2-glicoproteína I. Resulta interesante que la absorción de plasma con anti- β 2GPI ó con β 2GPI inmovilizada, da lugar a la obtención de la proteína C4bBP (22).

El factor H, es la principal proteína reguladora de C3b soluble, controla las actividades de todas las convertasas que contienen C3b y tiene la propiedad única de estar involucrada en distinguir entre activadores y no activadores de la vía alterna, interviene en la degradación dependiente de factor I de C3b y C3bBb solubles (80-81). El factor H es una glicoproteína plasmática formada por una simple cadena polipeptídica con un peso molecular de 155 kDa. Se encuentra presente en el plasma a una concentración de 200 a 500 μ g/mL (20-50 mg/mL ó 1.3-3.2 μ M) (82). El factor H humano consta de 1213 residuos de aminoácidos y la secuencia completa está integrada por 20 dominios SCR contínuos (83). En un trabajo reciente se ha reportado que el factor H posee dentro de su molécula un dominio con una región cargada positivamente (84), que pudiera permitirle fijarse a membranas activadas cargadas negativamente y funcionar como un mecanismo de control alterno del complemento sobre las superficies celulares.

Las proteínas reguladoras asociadas a membrana (Fig. 4), desarrollan una función importante en el control de las proteasas del complemento. La proteína cofactora de membrana (MCP) y el factor acelerador del decaimiento (DAF) poseen actividad sólo como reguladores de la C3 convertasa, donde el CR1 tiene una función más versátil: actúa como un receptor de complejos inmunes que poseen C3b ó C4b y está involucrado en la señal para la depuración mediada por receptor de éstos complejos (47,85).

El CR1 funciona como cofactor en la degradación tanto de C3b como de C4b. A diferencia de C4bBP, el CR1 puede distinguir entre los principales isotipos de C4, C4A y C4B. Es mucho menos abundante que el factor H ó C4bBP, pero está localmente concentrado sobre las superficies celulares de eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos (38,47,72). Recientemente ha sido demostrado en células dendríticas foliculares, fibras nerviosas periféricas y en podocitos glomerulares (47), por lo que el CR1 pudiera tener una función especial en regular la activación adyacente de C3 en la superficie celular. El CR1 también actúa como un receptor (receptor de adherencia inmune), que interviene en la fijación de partículas portadoras de C3b ó C4b a fagocitos participando en el transporte y depuración de complejos inmunes adheridos al CR1 sobre los eritrocitos (39). Es probable que el CR1 efectúe un papel principal en la conversión de C3b a iC3b dependiente de factor I para la subsecuente transferencia de las partículas a fagocitos tisulares portadores de CR3. El CR1 es el más grande de los cofactores para el factor I (Fig. 4) existiendo cuatro variantes de distinto tamaño, CR1-A, -B, -C y -D, los cuales tienen pesos moleculares de 220, 250, 190 y 280 kDa respectivamente . El CR1-A, la principal variante alélica, está formada de 30 dominios SCR que están organizados en estructuras de orden superior, llamados homólogos repetidos largos (Long Homologous Repeats -LHRs-), cada uno consistiendo de siete dominios SCR (86).

La proteína cofactora de membrana (MCP) está involucrada en el procesamiento tanto de C3b como de C4b, tiene una amplia distribución tisular, encontrándose presente sobre todas las células circulantes (con la notable excepción de los eritrocitos), células hematopoyéticas, una variedad de líneas celulares de epitelio y fibroblastos, espermatozoides y sobresalientemente en el trofoblasto placentario (47,87-88). Por lo tanto MCP puede tener un papel particular en la protección de los tejidos del huésped de un ataque accidental por complemento, aunque los otros cofactores son también importantes en éste aspecto. MCP consiste de cuatro dominios SCR N-terminales, seguido de una región O-glicosilada un segmento transmembranal y un dominio corto citoplasmático. La proteína fué formalmente llamada gp 45-70, lo que reflejaba la heterogeneidad en masa molecular (45-70 kDa) debido a diferencias en la glicosilación y de múltiples alternativas de rompimiento (87-88).

Finalmente el factor acelerador del decaimiento (DAF) tiene capacidad para incrementar la disociación de las subunidades de las convertasas (47,72,89). DAF se encuentra presente sobre la superficie de todas las células circulantes, células del endotelio vascular y sobre gran número de células epiteliales (47). Trabajos recientes han demostrado una expresión abundante de DAF en la placenta humana, en los sitios donde el feto es expuesto a la sangre materna (48,50). El factor acelerador del decaimiento, es en algún sentido como el MCP en estructura primaria y tamaño, teniendo cuatro dominios SCR seguidos por una región rica en O-azúcares y un segmento transmembranal.

El posible involucramiento de las proteínas reguladoras de la activación del complemento, C4bBP, CR1, DAF y MCP en el APS han sido descritas en la sección anterior.

IV.-COAGULACIÓN SANGUÍNEA Y VÍA ANTICOAGULANTE DE LA PROTEÍNA C

La coagulación sanguínea es un mecanismo de defensa del organismo, que en conjunto con la respuesta inflamatoria y de reparación, contribuye a mantener la integridad del sistema vascular después de daño tisular (90). El sistema de la coagulación sanguínea está formado por un conjunto de glicoproteínas plasmáticas que reaccionan en una secuencia de cascada (Tabla 6, 7 y Fig. 8). Muchas de las proteínas de la coagulación son activas sólo cuando forman un complejo con otras proteínas que actúan como cofactores, por ejemplo los factores V y VIII. En éste contexto, los iones calcio tienen una función crítica fundamental, debido a que muchos de los componentes son dependientes de calcio, ya sea para que la reacción se efectúe o bien para interaccionar con otras proteínas sobre la superficie de las membranas celulares (91).

En los sitios de daño vascular, los eventos proteolíticos de la cascada de la coagulación, dan lugar a la formación de trombina, la cual activa a los factores V y VIII, estimula plaquetas y convierte el fibrinógeno en fibrina. Los factores V y VIII activados (FVa, FVIIIa) se unen a la superficie de las plaquetas activadas ó a las células endoteliales dañadas y sirven como sitios receptores para las enzimas proteolíticas factor Xa y IXa respectivamente. El complejo factor Xa/Va (protrombinasa) actúa sobre la protrombina originando trombina, que a su vez convierte el fibrinógeno en fibrina con la subsecuente estabilización del coágulo (92-93).

El sistema es potencialmente peligroso para los organismos, por lo que varios mecanismos reguladores sirven para controlar éstas reacciones. Uno de ellos es el de la vía anticoagulante de la proteína C, el cual incluye a las

Tabla 6. Propiedades de las proteínas de la coagulación sanguínea.

Proteína	Sitio de síntesis	Peso molecular (kDa)	Función	Concentración plasmática (µg/mL)
Fibrinógeno (Factor I)	Hepatocito	340	Estructural	200-400 (mg/dL)
Protrombina (Factor II)	Hepatocito	72	Zimógeno de proteasa, dependiente de vitamina K	100
Factor tisular (Factor III)	Muchos tipos de células	37	cofactor	0
Factor V	Hepatocito, megacariocito	330	Cofactor del factor Xa	10
Factor VII	Hepatocito	50	Zimógeno de proteasa dependiente de vitamina K	0.5
Factor VIII	Hepatocito	330	Cofactor del factor IXa	0.1
Factor IX	Hepatocito	56	Zimógeno de proteasa dependiente de vitamina K	5
Factor X	Hepatocito	56	Zimógeno de proteasa dependiente de vitamina K	10
Factor XI	Hepatocito	160	Zimógeno de proteasa	5
Factor XII	Hepatocito	80	Zimógeno de proteasa	30
Factor XIII	Hepatocito	320	Factor estabilizante de fibrina	10

Tabla 7. Proteínas reguladoras de la coagulación sanguínea

Proteína	Sitio de síntesis	Peso molecular (kDa)	Función	Concentración plasmática (µg/mL)
Proteína C	Hepatocito	62	Reguladora	5
Proteína S	Hepatocito	80	Reguladora	25
Trombomodulina	Célula endotelial	75-105	Reguladora	0
Antitrombina III	Hepatocito	60	Reguladora	150
Inhibidor de la vía del factor tisular	Célula endotelial	33	Reguladora	115

proteínas dependientes de vitamina K: proteína C y proteína S, así como un receptor de membrana para la trombina, la trombomodulina (Fig. 8).

La vía anticoagulante de la proteína C es una vía de control importante para la cascada de la coagulación. La proteína clave es la proteína C, un zimógeno dependiente de vitamina K, el cual es activado a una proteasa de serina por el complejo trombina-trombomodulina que se forma sobre la superficie de la célula endotelial dañada. La eficiencia anticoagulante de la proteína C activada, es estimulada por un cofactor protéico dependiente de vitamina K, la proteína S. Recientemente se ha descrito que el factor V funciona también como cofactor (94). La proteína C activada y la proteína S se unen a fosfolípidos cargados negativamente dando lugar a un complejo unido a la membrana celular que degrada los factores Va y VIIIa más eficientemente que como lo hace la proteína C por sí sola (57-58). La significancia biológica de la actividad anticoagulante de la proteína S, es ilustrada por la relación entre la deficiencia heredada de proteína S y trombosis (24-25).

— Sistema de la coagulación sanguínea — Vía anticoagulante de la proteína C —

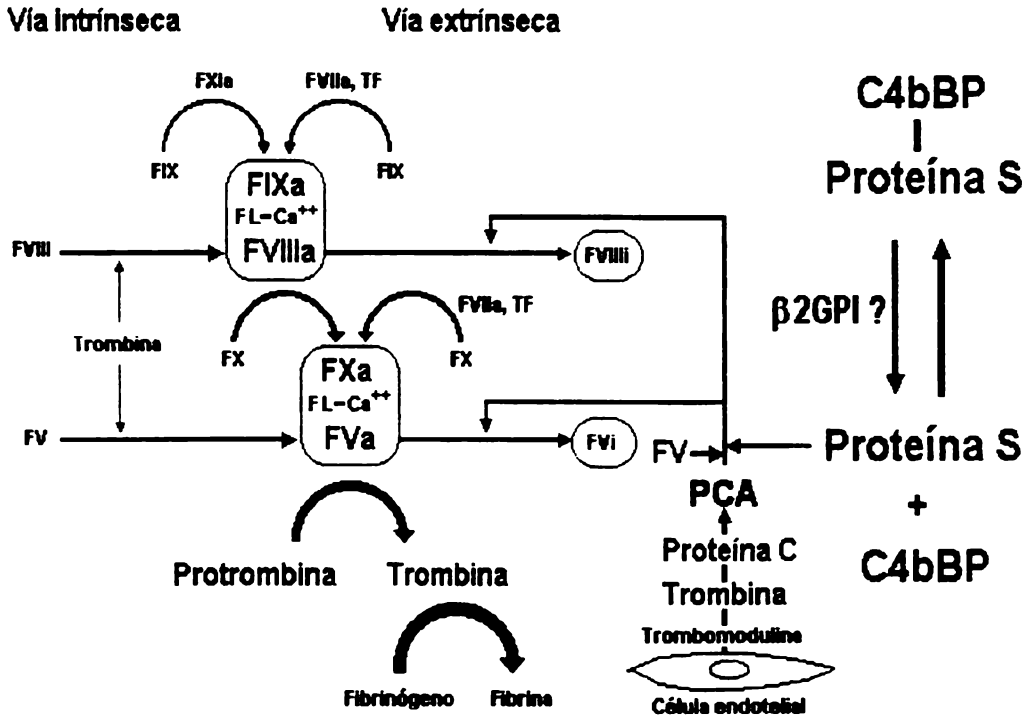


Figura 8. Esquema de la coagulación sanguínea y vía anticoagulante de la proteína C. La unión de la proteína S a la proteína C4bBP conduce a la inhibición de las propiedades anticoagulantes de la proteína S. Modificado de (58).

La anticoagulación parece no ser la única función de la proteína S, ya que tanto *in vivo* como *in vitro*, forma un complejo no covalente de alta afinidad con una de las proteínas reguladoras del sistema del complemento: la proteína C4bBP, sugiriendo una participación en la regulación de la vía clásica del sistema del complemento (26,28,56). Es probable que la proteína S sirva para fijar a la proteína C4bBP al mismo tipo de fosfolípido que proporciona la superficie para las reacciones de la coagulación, lo que constituiría un mecanismo alternativo para el control de la activación del complemento cercano a las superficies celulares (Fig. 9).

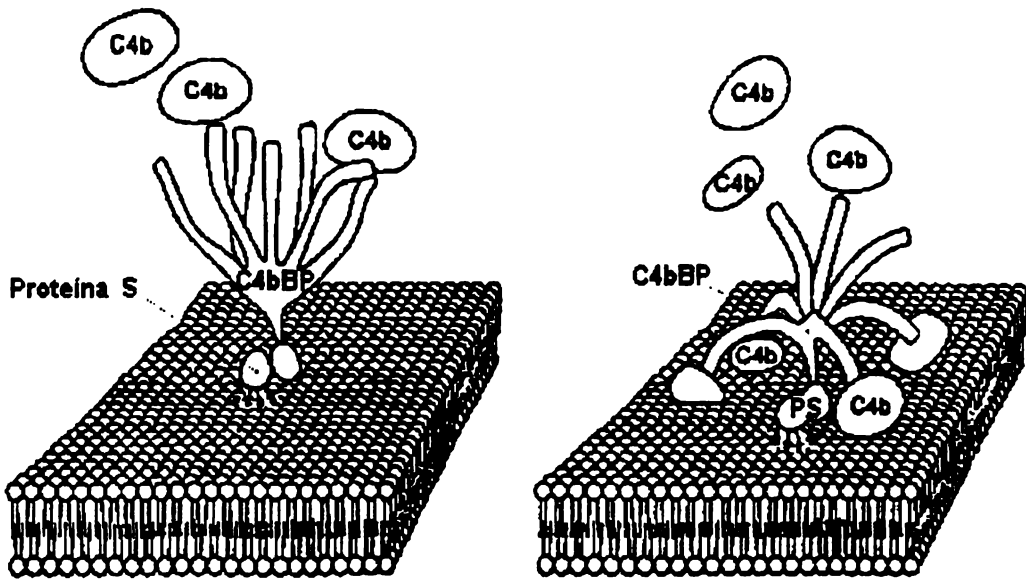


Figura 9. Modelo propuesto para la fijación de la proteína C4bBP a superficies fosfolipídicas cargadas negativamente a través de la proteína S (27).

V.- BETA-2-GLICOPROTEÍNA I Y PROTROMBINA

Se ha demostrado que la beta-2-glicoproteína I junto con la protrombina son el principal blanco antigénico de los anticuerpos antifosfolípido, que asociado a alteraciones como trombosis y pérdida fetal recurrente, caracterizan al síndrome antifosfolípido.

La β 2GPI, es una glicoproteína plasmática asociada a diferentes fracciones lipoprotéicas tales como quilomicrones y lipoproteínas de alta y baja densidad. También es conocida como apolipoproteína H (95). Se encuentra formada por una sóla cadena polipeptídica de 326 aminoácidos, con un peso molecular aparente de 50 kDa. La β 2GPI es un miembro de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento, caracterizadas por poseer unidades de repetición de aproximadamente 60 a.a. con cuatro cisteínas altamente conservadas, formando puentes disulfuro en un ordenamiento cis 1-3 y cis 2-4 (19,96), denominados dominios SCR ó módulos CCP (Fig. 5). La β 2GPI está formada por cinco de éstos dominios, de los cuales los primeros cuatro son ejemplos característicos de éste tipo de dominio, no así el quinto (extremo C-terminal) que contiene dos cisteínas adicionales con un ordenamiento atípico de cis 1-4, cis 2-5 y cis 3-6 (Fig. 10. Ref. 97).

Aunque la función exacta de la β 2GPI no ha sido determinada, su función en hemostasis ha sido de gran interés, debido a sus propiedades anticoagulantes *in vitro*. Se ha encontrado que puede unirse a un número de sustratos cargados negativamente como los fosfolípidos aniónicos y las plaquetas, sugiriendo un número de funciones posibles, como la inhibición de: a) la coagulación sanguínea por fijarse a los fosfolípidos sobre células dañadas (98-99); b) la agregación plaquetaria inducida por ADP (100) y c) la actividad de protrombinasa plaquetaria (99). La β 2GPI puede fijarse a otras estructuras macromoleculares cargadas negativamente diferentes a fosfolípidos como son

el DNA y la heparina (101-102), ésta propiedad ha sido atribuida a que la β 2GPI, posee un segmento peptídico en el quinto dominio formado por aminoácidos cargados positivamente (cis 281-cis 288) unidos a la molécula principal por puentes disulfuro (fig. 10) de tal manera que la hidrolisis de este dominio elimina la capacidad de la β 2GPI para unirse a la superficie de fosfolípidos cargados negativamente (103-104).

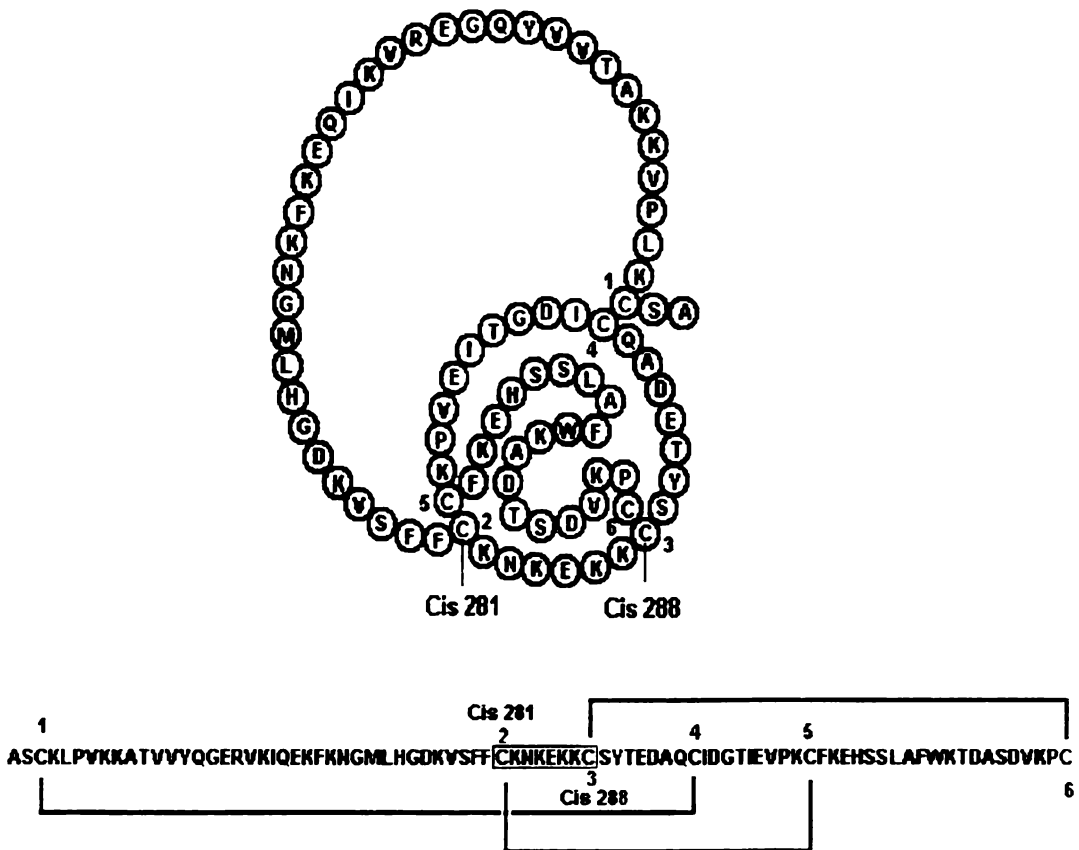


Figura 10. Mapa de las uniones disulfuro del quinto dominio de la β 2GPI humana, con un ordenamiento atípico en los dominios SCR de cis 1-4, cis 2-5 y cis 3-6.

La protrombina es una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado y secretada en el torrente circulatorio como un zimógeno de 579 aminoácidos, con un peso molecular de 72 kDa (105-106). La protrombina está compuesta por tres dominios estructurales, referidos comúnmente como fragmento 1, fragmento 2 y pretrombina 2 (Fig. 11). La función del fragmento 1 es la unión a fosfolípidos, con una marcada preferencia por aquellos cargados negativamente; la función del fragmento 2 es unirse al factor Va de la

coagulación y finalmente la protrombina 2 es el precursor inmediato de la trombina alfa (107-108). La protrombina en su forma de zimógeno no tiene actividad anticoagulante y tiene que ser convertida a trombina para poder participar en la cascada de la coagulación. En presencia de calcio, la protrombina se une en la superficie fosfolipídica al factor Xa y al factor Va formando el complejo protrombinasa. Este complejo es el responsable para la producción de trombina alfa, localizando los eventos de la coagulación al sitio de daño. La especificidad en los eventos moleculares en coagulación, son un prerrequisito para el control de la hemostasia y por lo tanto en la prevención de la trombosis (109). En el APS los APA interaccionan de alguna manera con una o varias proteínas que intervienen en la regulación de la coagulación produciendo trombosis. Entre las proteínas descritas como blancos antigénicos de los APA se encuentra la protrombina (15-16).

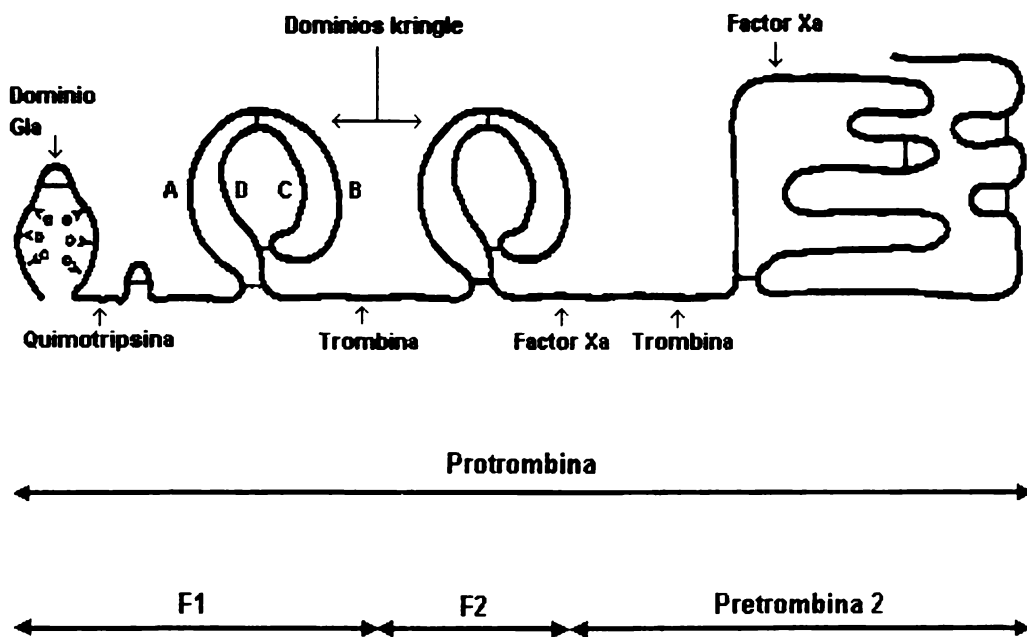


Figura 11. Esquema de la organización en dominios de la protrombina humana con algunos productos de activación. Modificado de (105).

Resulta de importancia fundamental que la principal característica estructural de la β 2GPI (los dominios SCR) presenten una similitud estructural

interna con los dominios Kringle observados en la protrombina, plasminógeno, etc. (Fig. 12). Se ha propuesto que las cisteínas (conservadas en uniones disulfuro 1-3 y 2-4) en éstas moléculas desempeñan un papel importante en la estructura secundaria, contribuyendo significativamente en la especificidad y estabilidad de las formas funcionales de estas proteínas (110-111). Como ha sido mencionado, el dominio SCR (fig. 5) es el único tipo de dominio presente en la β 2GPI y proteínas reguladoras del complemento (C4bBP, CR1, DAF, MCP), sin embargo el dominio Kringle es uno de los cuatro dominios diferentes que se encuentran presentes dentro de la región reguladora de las proenzimas de los sistemas fibrinolítico y de la coagulación sanguínea (110).

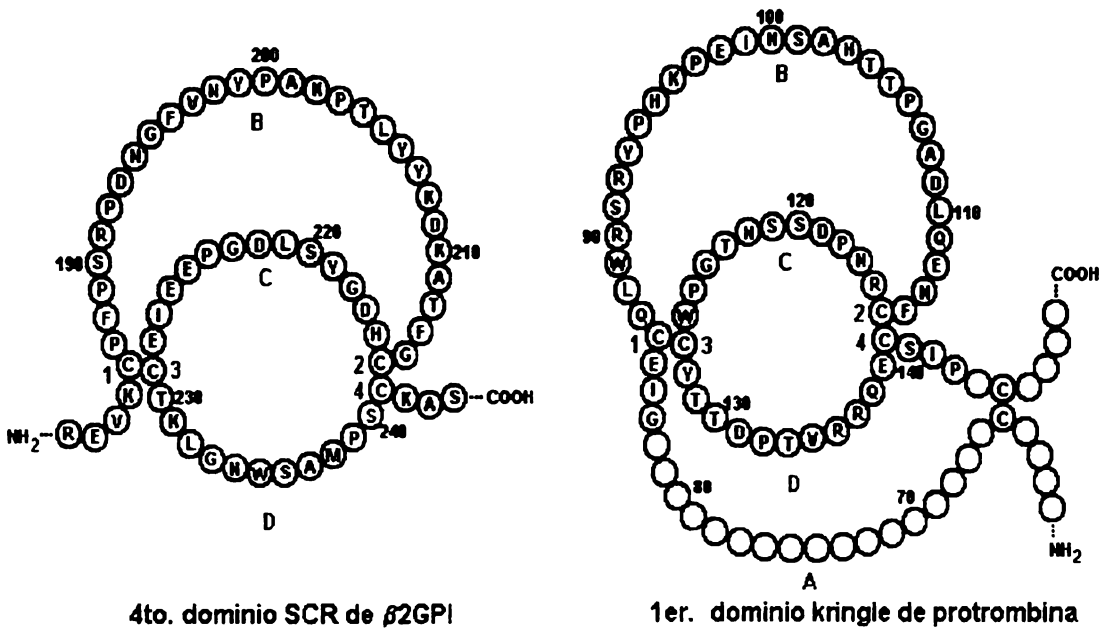


Figura 12. Comparación de dos módulos estructurales. El dominio SCR de la proteína C4bBP y el dominio kringle del fragmento 1 de la protrombina (111).

VI.- DISCUSION

La demostración de la existencia de un APS en SLE (30-32), ha sido sin duda una contribución importante en la comprensión de la patología asociada a la presencia de los APA en el APS. El sistema del complemento, sobre todo la vía clásica (fig. 3), ha sido implicado en la patogénesis de SLE (37), donde niveles disminuidos de CR1, presencia de complejos inmunes e hipocomplementemia han sido reportados coincidentemente a los reportados en el APS. La vía clásica del complemento tiene una función importantísima en el procesamiento de los complejos inmunes (fig. 13) donde las proteínas reguladoras de la activación del complemento C4bBP, CR1 DAF y MCP juegan un papel fundamental, debido a lo cual una alteración en su funcionamiento puede conducir a enfermedades como SLE.

Pacientes con SLE y APA poseen una disminución significativa de CR1. A su vez, pacientes con hipocomplementemia y APA presentan prueba de Coombs positiva, donde llama la atención que los anticuerpos eluidos de eritrocitos Coombs positivo, den origen a una prueba de APA por ELISA positiva. De acuerdo con éstas observaciones existe la posibilidad que los APA reconozcan a CR1 como su antígeno originando su disminución, con la producción de una disfunción en el sistema de regulación del complemento con alteración en el procesamiento de los complejos inmunes, alteraciones observadas en el APS.

Otro hallazgo interesante, ha sido el descubrimiento de que la proteína beta-2-glicoproteína I es un cofactor necesario para poner de manifiesto a los APA, reconociéndolo como su verdadero blanco antigénico al igual que la protrombina. Como ha sido mencionado, la β 2GPI es un miembro de la superfamilia de proteínas reguladoras de la activación del complemento. Sorprendentemente anticuerpos dirigidos contra β 2GPI (APA?) reconocen

también como antígeno a la proteína C4bBP (22), por lo que resulta interesante que C4bBP sea una proteína que regule la formación de la C3 convertasa de la vía clásica. En éste contexto es relevante la inducción de un APS inmunizando animales de laboratorio con β 2GPI. C4bBP se encuentra relacionada con la vía anticoagulante de la proteína C a través de la proteína S, (fig. 2, 3, 7 y 8) estableciendo una relación con el sistema de la coagulación sanguínea, y donde se ha propuesto una participación significativa de la β 2GPI, por lo que anticuerpos que reconcen a la β 2GPI como su antígeno podrían interferir con el complejo C4bBP-PS, evitando la separación de la PS (y la acción de la β 2GPI en éste complejo?) impidiendo que efectúe su función anticoagulante produciendo trombosis, lo que explicaría la trombosis reportada en el APS. C4bBP, CR1 y β 2GPI están caracterizados por poseer una homología estructural poco común: el dominio SCR (fig. 5). Los anticuerpos anti- β 2GPI que reconocen a C4bBP podrían también reconocer a CR1 lo que explicaría la prueba de Coombs positiva mencionada anteriormente así mismo la anemia hemolítica reportada en el APS.

Con respecto a que algunos APA reconocen a la protrombina como su antígeno existe la posibilidad de que los anticuerpos que reconocen estructuralmente los dominios SCR como los de la β 2GPI, pudieran también reconocer estructuralmente a la región del dominio Kringle de la protrombina que comparte similitud estructural con el dominio SCR (fig. 12), lo que explicaría por que algunos APA reconocen tanto a β 2GPI como a la protrombina (14-15). Este reconocimiento antigénico hecho extensivo a las proteínas de la superfamilia a la que pertenece la β 2GPI, aclara muchos de los misterios a los que no se les ha encontrado explicación, como la positividad en la prueba de Coombs donde los anticuerpos pudieran reconocer a CR1 lo que originaría su disminución con una alteración en el manejo de los complejos

inmunes (29-30,33,43-45) y anemia hemolítica (46); pérdida fetal recurrente por reconocimiento de DAF ó MCP ó ambos (39), evitando la protección del feto del ataque por complemento; trombosis por interferir con β 2GPI ó C4bBP, conduciendo a un estado protrombótico (7,9,13,14,26,27,30,31,37) y finalmente las hemocitopenias (47), por la presencia de moléculas reguladoras del complemento como DAF ó MCP sobre la superficie celular, cuyo reconocimiento por anticuerpos provocaría su eliminación.

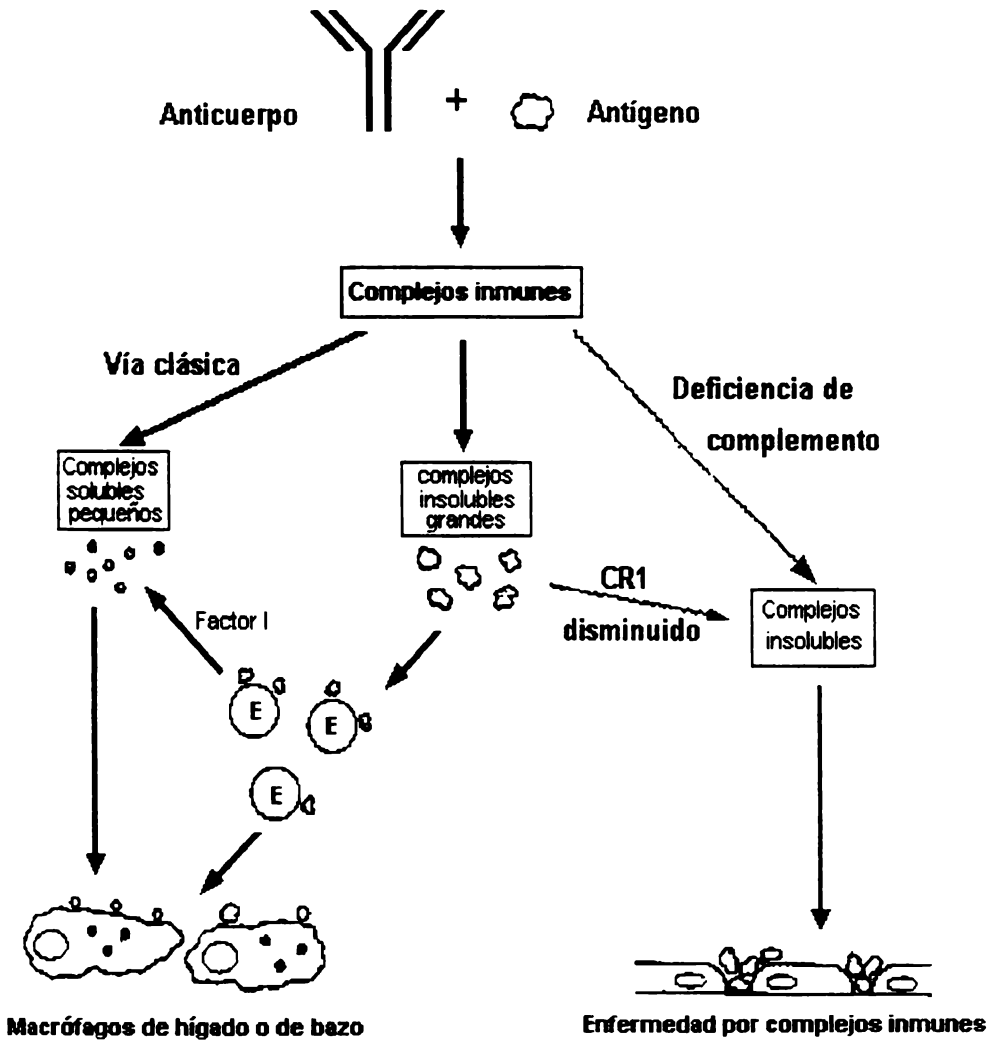


Figura 13. Participación del complemento en el manejo de los complejos inmunes. Los complejos pequeños son eliminados por los macrófagos. Los complejos grandes normalmente se fijarán a los eritrocitos vía CR1, pero si el CR1 se encuentra disminuido o existe una deficiencia de complemento se forman complejos insolubles.

Para el caso de la trombocitopenia se ha sugerido que la β 2GPI se une a plaquetas activadas que exhiben fosfolípidos aniónicos permitiendo ser reconocida y eliminada (48-50).

El punto clave en éstas explicaciones es el reconocimiento estructural de una parte del dominio SCR (y estructuras similares) como sustrato antigénico de los APA. Habrá que demostrarlo.

DAF y MCP son proteínas que pertenecen a la misma familia de proteínas que las mencionadas (C4bBP, CR1 y β 2GPI) encontrándose distribuidas sobre todas las células sanguíneas (excepto MCP que no se encuentra en los eritrocitos). Dado que poseen dominios SCR, ¿será posible que los APA ó anti- β 2GPI reconozcan estructuralmente este dominio, que a su vez sea la explicación para las hemocitopenias observadas en el APS ? ; DAF y MCP se encuentran en el trofoblasto placentario, ¿su disminución por APA elimina la actividad protectora del feto provocando aborto ?.

De lo expuesto anteriormente, se abre un enorme campo en el interesante estudio del APS por lo que investigación futura en ésta área, seguramente dará contestación a muchas de las inquietudes planteadas cuyo significado biológico es un enigma.

VII.- CONCLUSIONES

De lo mencionado en ésta revisión, se infiere la participación del sistema del complemento en la patología del APS, donde los APA al parecer reconocen a nivel estructural un epitopo común presente en el dominio SCR compartido por los miembros de la familia de proteínas reguladoras del complemento β 2GPI, C4bBP, CR1, DAF y MCP, y que a su vez comparte cierta similitud estructural con el dominio Kringle de la protrombina, otro blanco antigénico de los APA, por lo que apoyado en éstas observaciones se propone que una región del dominio SCR es reconocida por los APA, cuya interacción origina una disfunción de las proteínas involucradas, dando lugar a las manifestaciones clínicas observadas en el síndrome antifosfolípido.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Moore, J. E. y Mohr, C. F. (1952). Biologically false positive serologic test for syphilis. Type, incidence, and cause. *JAMA. J. Am. Med. Assoc.* 150:467-473
- 2.- Moore, J. E. y Lutz, W. B. (1955). The natural history of systemic lupus erythematosus: An approach to its study through chronic biologic false positive reactors. *J. Chronic Dis.* 1:297-316
- 3.- Conley, C. L. y Hartmann, R. C. (1952). Haemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 31:621-622
- 4.- Feinstein, D. I. y Rapaport, S. I. (1972). Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog. Hemostasis Thromb.* 1:75-95
- 5.- Harris, E. N., Gharavi, A. E., Boey, M. L. y col. (1983). Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2:1211-1214
- 6.- Loizou, S., Mc Crea, J. D., Rudge, A. C. y col. (1985). Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin. Exp. Immunol.* 62:738-745
- 7.- Hughes, G. R. V. (1985). The anticardiolipin syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 3:285-286
- 8.- Gharavi, A. E., Harris, E. N., Asherson, R. A. y Hughes, G. R. V. (1987) Anticardiolipin antibodies: Isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum. Dis.* 46:1-6
- 9.- Harris, E. N., Baguley, E., Asherson, R. A. y Hughes, G. R. V. (1987). Clinical and serological features of the "antiphospholipid syndrome" (APS). *British J. Rheumatol.* 26:19 (resumen)
- 10.- Mc Neil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N. y Krillis, C. A. (1990). Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4120-4124
- 11.- Galli, M., Confurius, P., Maassen, C., y col. (1990). Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet.* 335:1544-1547
- 12.- Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K. y Koike, T. (1990). Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet.* 336:177-178
- 13.- Vermylen, J. y Arnout, J. (1992). Is the antiphospholipid syndrome caused by antibodies directed against physiologically relevant phospholipid-protein complexes?. *J. Lab. Clin. Med.* 120:10-12
- 14.- Roubey, R. A. S. (1994). Autoantibodies to phospholipid binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood.* 84:2854-2867
- 14b.-Alarcón-Segovia, D. y Cabral, A. R. (1996). The antiphospholipid/cofactor syndromes. *J. Rheumatol.* 23:1319-1322

- 15.- Shapiro, S. S. (1996). The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Ann. Rev. Med.* 47:533-553
- 16.- Hunt, J. E., Adelstein, S. y Krilis, S. A. (1994). New basic aspects of the antiphospholipid syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 12:661-668
- 17.- Reid, K. B. M., Bentley, D. R., Campbell, R. D., Chung, L. P., Sim, R. B., Kristensen, T. y Tack, B. F. (1986). Complement system proteins which interact with C3b or C4b. A superfamily of structurally related proteins. *Immunol. Today.* 7:230-234
- 18.- Kristensen, T., D'Eustachio, P., Ogata, R. T., Chung, L. P., Reid, K. B. M. y Tack, B. F. (1987). The superfamily of C3b/C4b-binding proteins. *Fed. Proc.* 46:2463-2469
- 19.- Reid, K. B. M. y Day, A. J. (1989). Structure-function relationship of the complements components. *Immunol. Today.* 6:177-180
- 20.- Gharavi, A. E., Sammaritano, L. R., Wen, J. y Elkon, K. B. (1992). Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *J. Clin. Invest.* 90:1105-1109
- 21.- Blank, M., Faden, D., Tincani, A., y col. (1994). Immunization with anticardiolipin cofactor (Beta-2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naive mice. *J. Autoimmun.* 7:441-445
- 22.- Walker, F. J. (1993). Does beta-2-glycoprotein I inhibit the interaction between protein S and C4b-binding protein ?. *Thomb. Haemost.* 69:930 (resumen)
- 23.- DeGroot, P. G. y Derksen, R. H. W. M. (1994). Protein C pathway, antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lupus.* 3:229-233
- 24.- Bertina, R. M. (1985). Hereditary protein S deficiency. *Haemostasis.* 15:241-246
- 25.- Marlar, R. A. y Neumann, A. (1990). Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies. *Semin. Thromb. Hemost.* 16:299-309
- 26.- Dahlbäck, B. (1983). Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem. J.* 209:847-856
- 27.- Dahlbäck, B. (1984). Interaction between vitamin K-dependent protein S and the complement protein C4b-binding protein. A link between coagulation and the complement system. *Sem. Thromb. Hemost.* 10:139-148
- 28.- Helsing, M. (1991). The interaction between complement component C4b-binding protein and the vitamin K-dependent protein S forms a link between blood coagulation and the complement system. *Biochem. J.* 277:581-592
- 29.- Barnum, S. R. y Dahlbäck, B. (1990). C4b-binding protein a regulatory component of the classical pathway of complement, is an acute phase protein and is elevated in systemic lupus erythematosus. *Complem. Inflamm.* 7:71-77
- 30.- Alarcón-Segovia, D., Delezé, M., Oria, C. V. y col. (1989). Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine.* 68:353-365

- 31.- Alarcón-Segovia, D. (1992). Clinical manifestation of the antiphospholipid syndrome. *J. Rheumatol.* 19:1778-1871
- 32.- Alarcón-Segovia, D. (1994). Antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 3:289-291
- 33.- Hazeltine, M., Rauch, J., Danoff, D., Esdaile, J. M. y Tannenbaum, H. (1988). Antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus: Evidence of an association with positive Coomb's and hypocomplementemia. *J. Rheumatol.* 15:80-86
- 34.- Asherson, R. A., Khamashta, M. A., Ordi-Ros, J., y col. (1989). The "primary" antiphospholipid syndrome: Major clinical and serological features. *Medicine.* 68:366-374
- 35.- Vianna, J. L., Khamashta, M. A., Ordi-Ros, J., y col. (1994). Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: A European multicenter study of 114 patients. *Am. J. Med.* 96:3-9
- 36.- Hammond, A., Rudge, A. C., Loizou, S., Bowcock, S. J. y Walport, M. J. (1989). Reduced numbers of complement receptor type 1 on erythrocytes are associated with increased levels of anticardiolipin antibodies. Findings in patients with systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *Arthr. Rheum.* 32:259-264
- 37.- Davies, K. A., Schifferli, J. A. y Walport, M. J. (1994). Complement deficiency and immune complex disease. *Springer Semin. Immunopathol.* 15:397-416
- 38.- Ross, G. D. (1992). Complement receptor type 1. *Curr. Top. Microb. Immunol.* 178:31-44
- 39.- Turk, J. L. (1992). Immune adherence. En: *Encyclopedia of Immunology.* Roitt I. M. Acad. Press. pág.749-750
- 40.- Beynon, H. L. C., Davies, K. A., Haskard, D. O. y Walport, M. J. (1994). Erythrocyte complement receptor type 1 and interactions between immune complexes, neutrophils, and endothelium. *J. Immunol.* 153:3160-3167
- 41.- Uko, G., Dawkins, R. L., Kay, P., Christiansen, F. T. y Hollings-Worth, P. N. (1985). CR1 deficiency in SLE: acquired or genetic?. *Clin. Exp. Immunol.* 62:329-336
- 42.- Arvieux, J., Roussel, B., Ponard, D. y Colomb, M. G. (1991). Reactivity patterns of anti-phospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus sera in relation to erythrocyte binding and complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* 84:446-471
- 43.- Loizou, S., Cofiner, C., Giles, C. M., Davies, K. A. y Walport, M. J. (1992). Characterization of anticardiolipin antibodies eluted from erythrocytes from patients with SLE. *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:661 (resumen)
- 44.- Arvieux, J., Roussel, B., Schweizer, B. y Colomb, M. G. (1993). Erythrocyte binding of antiphospholipid antibodies (carta). *Clin. Exp. Rheumatol.* 11:352-353
- 45.- Guzmán, J., Cabral, A. R., Cabiedes, J., Pita-Ramírez, L. y Alarcón-Segovia, D. (1994). Antiphospholipid antibodies in patients with idiopathic autoimmune haemolytic anemia. *Autoimmunity.* 18:51-56

- 46.- Delezé, M., Alarcón-Segovia, D., Oria, C. V. y col. (1989). Hemocytopenia in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J. Rheumatol.* 16:926-930
- 47.- Morgan, B. P. y Meri, S. (1994). Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin. Immunopath.* 15:369-396
- 48.- Holmes, C. H., Simpson, K. L., Wainwright, S. D. y col. (1990). Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy. *J. Immunol.* 144:3099-3105
- 49.- Holmes, C. H., Simpson, K. L., Okada, H., y col. (1992) Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development: Distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay-accelerating factor (CD55). *Eur. J. Immunol.* 22:1579-1585
- 50.- Cunningham, D. S. y Tichenor, J. R. (1995). Decay-accelerating factor protects human trophoblast from complement mediated attack. *Clin. Immunol. Immunopath.* 74: 156-161
- 51.- Matsuura, E., Igarashi, Y., Yasuda, T., Triplett, D. A. y Koike, T. (1994). Anticardiolipin antibodies recognize B2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J. Exp. Med.* 179:457-462
- 52.- Roubey, R. A. S., Eisenberg, R. A., Harper, M. F. y Winfield, J. B. (1995). "Anticardiolipin" autoantibodies recognize B2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of Ag density and bivalent binding. *J. Immunol.* 154:954-960
- 53.- Cabral, A. R., Cabiedes, J. y Alarcón-Segovia, D. (1995). Antibodies to phospholipid-free B2-glycoprotein-I in patients with primary antiphospholipid syndrome. *J. Rheumatol.* 22:1894-1898
- 54.- Sellar, G. C., Keane, J., Mehdi, H. y Peeples, M. E. (1993). Characterization and acute phase modulation of canine apolipoprotein H (B2-glycoprotein I). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:1288-1293
- 55.- Sellar, G. C., Steel, D. M., Zafiropoulos, A., Seery, L. T. y Whitehead, A. S. (1994). Characterization, expression and evolution of mouse B2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:1521-1528
- 56.- Dahlbäck, B. (1991). Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb. Haemost.* 66:49-61
- 57.- Esmon, C. T. (1992). The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler. Thromb.* 12:135-145
- 58.- Dahlbäck, B. y Stenflo, J. (1994). The protein C anticoagulant system. En: *Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A. W., Majerus, P. W., Varmus, H. eds. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia: W. B. Saunders. pág. 599-628*
- 59.- Ruiz-Argüelles, G. J., Ruiz-Argüelles, A., Alarcón-Segovia, D., y col. (1991). Natural anticoagulants in systemic lupus erythematosus. Deficiency of protein S bound to C4bp associates with recent history of venous thromboses,

- antiphospholipid antibodies, and the antiphospholipid syndrome. *J. Rheumatol.* 18:552-558
- 60.- Forastiero, R. R., Kordich, L., Basilotta, E. y Carreras, L. O. (1994). Differences in protein S and C4b-binding protein levels in different groups of patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coag. Fibrin.* 5:609-616
- 61.- Inada, Y., Kamiyama, M., Kanemitsu, T., Clark, W. y Asai, Y. (1986). Relationship between C3b receptor (CR1) activity of erythrocytes and positive Coombs' test. *Annals Rheum. Dis.* 45:367-372
- 62.- Walport, M., Yin C.NG y Lachmann, P. J. (1987). Erythrocytes transfused into patients with SLE and haemolytic anaemia lose complement receptor type 1 from their cell surface. *Clin. Exp. Immunol.* 69:501-507
- 63.- Jones, D. R. E., Scarsbrook, A. F., Imrie, H., Booker, D. y Sokol, R. J. (1996). Do plasma antiphospholipid antibodies in patients with autoimmune haemolytic anaemia correlate with reduced levels of erythrocyte complement receptor 1?. *Autoimmunity* 23:45-51
- 64.- Shi, W., Chong, B. H. y Chesterman, C. N. (1993). Beta-2-glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: Differences with lupus anticoagulants. *Blood.* 81:1255-1262
- 65.- Galli, M., Bevers, E. M., Comfurius, P., Barbui, T. y Zwaal, R. F. A. (1993). Effect of antiphospholipid antibodies on procoagulant activity of activated platelets and platelet-derived microvesicles. *British. J. Haematol.* 83:466-472
- 66.- Vazquez-Mellado, J., Llorente, L., Richaud-Patin, Y. y Alarcón-Segovia, D. (1994). Exposure of anionic phospholipids upon platelet activation permits binding of beta-2-glycoprotein I and through it that of IgG antiphospholipid antibodies. Studies in platelets from patients with antiphospholipid syndrome and normal subjects. *J. Autoimm.* 7:335-348
- 67.- Parke, A. L., Weinstein, R. E., Bona, R. D., Maier, D. B. y Walker, F. J. (1992). The thrombotic diathesis associated with the presence of phospholipid antibodies may be due to low levels of free protein S. *Am J. Med.* 93:49-56
- 68.- Asherson, R. A. y Cervera, R. (1994). "Primary", "Secondary" and other variants of the antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 3:293-298
- 69.- Müller-Eberhard, H. J. (1988). Molecular organization and function of the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* 57:321-347
- 70.- Kinoshita, T. (1991). Biology of complement: The overture. *Immunol. Today.* 12:291-295
- 71.- Hourcade, D., Holers, V. M. y Atkinson, J. P. (1989). The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv. Immunol.* 45:381-416
- 72.- Sim, R. B., Day, A. J., Moffatt, B. E. y Fontaine, M. (1993). Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Meth. Enzymol.* 223:13-35
- 73.- Liszewski, M. K., Farries, T. C., Lublin, D. M., Rooney, I. A. y Atkinson, J. P. (1996). Control of complement system. *Adv. Immunol.* 61:201-283
- 74.- Dahlbäck, B., Smith, C. A. y Müller-Eberhard, H. J. (1983). Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:3461-3465

- 75.- Hillarp, A. y Dahlbäck, B. (1988). Novel subunit in C4b-binding protein required for protein S binding. *J. Biol. Chem.* 263:12759-12764
- 76.- Hillarp, A., Helsing, M. y Dahlbäck, B. (1989). Protein S binding in relation to the subunit composition of human C4b-binding protein. *FEBS Lett.* 259:53-56
- 77.- Schwalbe, R., Dahlbäck, B., Hillarp, A. y Nelsestuen, G. (1990). Assembly of protein S and C4b-binding protein on membranes. *J. Biol. Chem.* 265:16074-16081
- 78.- Dahlbäck, B., Frohm, B. y Nelsestuen, G. (1990). High affinity interaction between C4b-binding protein and vitamin K-dependent protein S in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.* 265:16082-16087
- 79.- Walker, F. (1986). Identification of a new protein involved in the regulation of the anticoagulant activity of activated protein C. *J. Biol. Chem.* 261:10941-10944
- 80.- Pangburn, M. K., Schreiber, R. D. y Müller-Eberhard, H. J. (1977). Human complement C3b inactivator: Isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein B1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.* 146:257-270
- 81.- Misasi, R., Huemer, H. P., Schwaeble, W., y col. (1989). Human complement factor H: An additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. *Eur. J. Immunol.* 19:1765-1768
- 82.- Ripoche, J., Day, A. J., Harris, T. J. R. y Sim, R. B. (1988). The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem. J.* 249:593-602
- 83.- Barlow, P. N., Norman, D. G., Steinkasserer, A., y col. (1992). Solution structure of the fifth repeat of factor H: A second example of the complement control protein module. *Biochemistry.* 31:3626-3634
- 84.- DiScipio, R. G. (1992). Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *J. Immunol.* 149:2592-2599
- 85.- Parker, C. J. (1992). Regulation of complement by membrane proteins: An overview. *Curr. Top. Microb. Immunol.* 178:1-6
- 86.- Wong, W. W., Cahill, J. M., Rosen, M. D., y col. (1989). Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. *J. Exp. Med.* 169:847-863
- 87.- Liszewski, M. K., Post, T. W. y Atkinson, J. P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): Newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Ann. Rev. Immunol.* 9:431-455
- 88.- Liszewski, M. K. y Atkinson, J. P. (1992). Membrane cofactor protein. *Curr. Top. Microb. Immunol.* 178:45-60
- 89.- Nicholson-Weller, A. (1992). Decay accelerating factor (CD55) *Curr. Top. Microb. Immunol.* 178:7-30
- 90.- Furie, B. y Furie, B. C. (1992). Molecular and cellular biology of blood coagulation. *New. Engl. J. Med.* 326:800-806
- 91.- Furie, B. y Furie, B. C. (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 53:505-518

- 92.- Davie, E. W., Fujikawa, K. y Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: Initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 30:10363-10370
- 93.- Davie, E. W. (1995). Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb. Haemost.* 74:1-6
- 94.- Dahlbäck, J. (1995) Molecular genetic of thrombophilia: Factor V mutation causing resistance to activated protein C as a basis of the hypercoagulable state. *J. Lab. Clin. Med.* 125:566-571
- 95.- Lee, N. S., Brewer, H. B. y Osborne, J. C. J. (1983). Beta-2-glycoprotein I. Molecular properties of an unusual apolipoprotein, apolipoprotein H. *J. Biol. Chem.* 258:4765-4770
- 96.- Steinkasserer, A., Estaller, C., Weiss, E. H., Sim, R. B. y Day, A. J. (1991). Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta-2-glycoprotein I. *Biochem. J.* 277:387-391
- 97.- Steinkasserer, A., Barlow, P. N., Willis, A. C. y col. (1992). Activity, disulphide mapping and structural modelling of the fifth domain of human beta-2-glycoprotein I. *FEBS Lett.* 313:193-197
- 98.- Schousboe, I. (1985). Beta-2-glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*. 66:1086-1091
- 99.- Nimpf, J., Bevers, E. M., Bomans, P. H. H., y col. (1986). Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta-2-glycoprotein I. *Biochim. Biophys. Acta.* 884:142-149
- 100.- Nimpf, J., Wurm, H., y Kostner, G. M. (1987). Beta-2-glycoprotein I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis*. 63:109-114
- 101.- Kroll, J., Larsen, J. K., Loft, H., Ezban, M., Wallevik, K. y Faber, M. (1976). DNA-binding proteins in Yoshida ascites tumor fluid. *Biochem. Biophys. Acta.* 434:490-501
- 102.- Polz, E., Wurm, H., Kostner, G. M. (1979). Investigation on beta-2-glycoprotein I in the rat: Isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions. *Int. J. Biochem.* 11:265-273
- 103.- Hunt, J. E., Simpson, R. J. y Krilis, S. A. (1993). Identification of a region of beta-2-glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2141-2145
- 104.- Hunt, J. y Krilis, S. (1994). The fifth domain of beta-2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (cys 281-cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J. Immunol.* 152:653-659
- 105.- Stubbs, M. T. y Bode, W. (1993). A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 69:1-58
- 106.- Stubbs, M. T. y Bode, W. (1994). Coagulation factors and their inhibitors, *Curr. Op. Struct. Biol.* 4:823-832
- 107.- Park, C. H. y Tulinsky, A. (1986). Three-dimensional structure of the Kringle sequence: Structure of prothombin fragment 1. *Biochemistry*. 25:3977-3982

- 108 Tulinsky, A. (1991). The structures of domains of blood proteins. *Thromb. Haemost.* 66:16-31
- 109.- Stubbs, M. T. y Bode, W. (1995). Structure and specificity in coagulation and its inhibition. *Trends Cardiovasc. Med.* 5:157-166
- 110.- Davie, E. W., Ichinose, A. y Leytus, S. P. (1986). Structural features of the proteins participating in blood coagulation and fibrinolysis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:509-514
- 111.- Janatova, J., Reid, K. B. M. y Willis, A. C. (1989). Disulfide bonds are localized within the short concensus repeat units of complement regulatory proteins: C4b-binding protein. *Biochemistry.* 28:4754-4761

