

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL FACTOR
TERMOLABIL QUE OCULTA LOS ANTICUERPOS
ANTICARDIOLIPINA EN HUMANOS Y BUSQUEDA DEL
FENOMENO EN RATONES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(INMUNOLOGIA)

P R E S E N T A E L :

M. en C. JAVIER CABIEDES CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS :

Dr. DONATO ALARCON SEGOVIA

MEXICO D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

DEDICATORIAS.

Dedico esta tesis y todo aquello que ocurrió en sus dos años y medio de elaboración a las siguientes personas:

A mi madre por haberme dado la vida y por enseñarme su valor.

A Donia mi verdadero, único y más grande amor.

A Donia ELIDA, que es el producto de mi amor y ahora el motor de mi lucha por la vida.

A mi abuelita que es mi contacto más cercano con Dios.

A mis hermanos que son tantos y tan diferentes.

A mi alumna Claudia.

También quiero agradecer a todos aquellos que se interesaron en mi trabajo y me brindaron el placer de ser escuchado. A mis profesores, amigos y al honorable jurado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO
EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

INDICE

1. Resumen	1
2. Abreviaturas	3
3. Introducción	5
4. Generalidades	5
4.1 Autoinmunidad natural	5
4.2 Autoanticuerpos naturales	6
4.3 Origen y mecanismos de control de los autoanticuerpos	7
4.4 Origen de los autoanticuerpos patogénicos	8
4.5 Modelos murinos de autoinmunidad	8
4.5.1 Patogénesis de la autoinmunidad en los ratones de nueva Zelanda	9
4.5.2 Linfocitos B	10
4.5.3 Influencia del microambiente en la producción de autoanticuerpos	13
4.5.4 Participación de las células T en la producción de los autoanticuerpos	13
4.5.5 Células no T-no B	14
4.5.6 Complejo principal de histocompatibilidad	15
4.5.7 El timo en la autoinmunidad de los ratones de NZ	15
4.5.8 Genética	16
4.6 Anticuerpos anti-cardiolipina	16
4.6.1 Anticuerpos anti-fosfolípidos como anticuerpos naturales	17
4.6.2 Factores inmunogenéticos y aFL	18
4.6.3 Des-regulación inmune y aFL	19
4.6.4 aFL como anticuerpos anti-idiotipo	19
4.6.5 aFL inducidos por fármacos	20
4.6.6 aFL inducidos por infecciones	20
4.6.7 aFL y anemia hemolítica	20
4.6.8 Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípido	21
4.6.9 Epitopes reconocidos por los aFL	22
4.6.10 Heterogeneidad funcional e inmunoquímica de los aFL	23
4.6.11 Anticuerpos anti-cardiolipina escondidos	26
5. Hipótesis	27
6. Objetivos	27
7. Sujetos de estudio	28
8. Materiales y métodos	29
8.1 Liberación de los aCLE por calentamiento	29
8.2 ELISA estándar y modificado para la detección de los aFL	29
8.3 ELISA para detectar actividad anti-DNA	30
8.4 ELISA para detectar actividad de factor reumatoide (FR)	30
8.5 Adsorción de los sueros con mFL	31

8.6	Purificación de la fracción IgG (IgG1, IgG2, e IgG4) de sueros humanos y murinos (columna de proteína-A)	31
8.7	Depleción de los sueros humanos y del suero bovino de β_2 GP-I	31
8.8	Separación de las subpoblaciones de aCL de los pacientes con SaFP	31
8.9	Electroinmunotransferencia (EIT)	32
8.10	Detección de β_2 GP-I en los sueros humanos y en el suero bovino por inmunopunto (IP)	34
8.11	Detección de la reactividad contra antígenos nucleares y citoplásmicos por IFI	34
8.12	Purificación de β_2 GP-I	34
8.13	Diálisis contra amortiguadores hipermolares y de pH bajo	36
8.14	Extracciones con cloroformo y cloroformo-metanol	36
8.15	Cromatografía en capa fina (CCF)	36
8.16	Determinación del tiempo de protrombina (TP)	36
8.17	Determinación del tiempo parcial de tromboplastina parcia activada (TPTa)	36
8.18	Tratamiento de los SHN con fosfolipasas (A ₂ , B, C y D)	37
8.19	Análisis estadístico.	37
9.	Resultados	38
9.1	Definición de cociente aCLE	38
9.2	Frecuencia e isotipo de los aCLE en sujetos sanos	39
9.3	Cinética de liberación de los aCLE de sueros humanos normales incubados a 56 °C	39
9.4	Depleción de los sueros de la fracción IgG (IgG1, IgG2 e IgG4)	40
9.5	Inhibición con micelas de CL (mCL) de la actividad aCL potenciada por el tratamiento a 56 °C durante 30 minutos	41
9.6	Detección de los aCLE en el suero de pacientes con LEG, SaFP y sífilis	42
9.7	Requerimiento de β_2 glicoproteína-I (β_2 GP-I) por los aCLE de sujetos sanos	44
9.8	Participación de la β_2 GP-I exógena (suero bovino fetal) SBF y de la endógena en la detección de los aCLE	45
9.9	Caracterización de los aCL del suero de pacientes con SaFP	48
9.9.1	Caracterización de las subpoblaciones de aCL no escondidos en los sueros de pacientes con SaFP	50
9.9.2	Caracterización de las subpoblaciones de aCLE del suero de pacientes con SaFP	52
9.10	Detección de aFL en los sueros de ratones normales (Balb/c) y en los de ratones autoinmunes (NZB)	53

9.10.1	Caracterización de la actividad aFL potenciada por el tratamiento a 56 °C durante 30 minutos (sueros murinos)	55
9.10.1.1	Depleción de la fracción IgG (IgG1, IgG2 e IgG4)	55
9.10.1.2	Inhibición de la actividad aCL con mCL	56
9.10.1.3	Requerimiento de β_2 GP-I por los aCLE de los ratones Balb/c y NZB	57
9.11	Reactividad de los aCLE contra fosfolípidos (estudio en humanos)	58
9.12	Reactividad de los aCLE de sujetos sanos contra otros antígenos	62
9.13	Reactividad de los aCLE contra los fosfolípidos que participan en las reacciones de la cascada de la coagulación	64
9.14	Tratamientos que rompen el complejo aCLE-inhibidor	68
9.14.1	Incubación y diálisis con amortiguadores hipermolares	68
9.14.2	Incubación y diálisis con amortiguadores de pH bajo	70
9.14.3	Tratamiento de los SHN con fosfolipasas	73
9.15	Caracterización del factor termolábil que oculta a los aCLE	77
10.	Discusión	82
11.	Conclusiones	86
12.	Bibliografía	88

1. RESUMEN.

Recientemente varios autores reportaron que el tratamiento con calor (56 °C durante 30 minutos) descubre anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) que previamente no eran detectables en los sueros humanos normales (SHN). Se desconoce la naturaleza del inhibidor termolábil que oculta a los anticuerpos anti-cardiolipina "escondidos" (aCLE) y las características de los anticuerpos que componen a esta familia de aFL.

OBJETIVOS. 1. Determinar la frecuencia e isotipo de los aCLE; 2. Investigar si se encuentran en pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso generalizado [LEG] y síndrome de antifosfolípidos primario [SaFP]) e infecciosas (sífilis); 3. Determinar sus requerimientos de β_2 GP-I; 4. Determinar las características de reactividad; 5. Identificar el posible papel como anticoagulantes circulantes; 6. Caracterizar al inhibidor termolábil que los oculta y 7. Buscar el fenómeno en ratones.

MATERIALES Y METODOS. Se estudiaron los siguientes grupos: 100 SHN, 50 de pacientes con LEG, 22 de pacientes con SaFP y 25 de pacientes con sífilis. Se purificaron 5 IgG's de SHN y se caracterizaron los aCL no escondidos y los aCLE de 2 pacientes con SaFP. Se estudiaron también 10 sueros de raton balb/c y 10 de NZB. Por ELISA estandar y modificado (libre de β_2 GP-I) se estudió la dependencia de β_2 GP-I y la actividad aCL y aCLE post-inhibiciones con micelas de cardiolipina (mCL) en todos los grupo. También se estudió por ELISA la reactividad contra otros antígenos (fosfolípidos aniónicos y neutros, DNACd, DNACs y la actividad de factor reumatoide). La reactividad de los aCLE de los SHN contra antígenos nucleares y citoplásmicos se estudió por inmunofluorescencia indirecta. La actividad de anticoagulante lúpico (AL) se determinó midiendo el efecto sobre el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTa) de SHN e IgG's purificadas en columna de proteína A de SHN pre-tratados a 56°C, 30 min. (SHN₅₆) mezcladas (V/V) con plasma fresco normal. La actividad AL de los SHN₅₆ y de las IgG's se inhibió con mCL y de fosfatidilserina (mFTS). Para identificar la naturaleza del inhibidor se trataron 10 SHN con fosfolipasas (A₂, B, C y D) en condiciones experimentales óptimas. La purificación de los aCLE y la caracterización del inhibidor termolábil se realizó mediante diálisis de los SHN en membranas de nitrocelulosa benzoilada contra amortiguadores hipermolares de pH bajo. El inhibidor se identificó por cromatografía en capa fina (CCF), y se comprobó por ELISA y por estudios de inhibición autóloga.

RESULTADOS. Los aCLE fueron exclusivamente de isotipo IgG y se detectaron en el 94% de los SHN. En los pacientes con LEG, SaFP y sífilis que tienen títulos altos de aCL no escondidos se detectaron también aCLE con características similares a sus aCL no escondidos. En pacientes con SaFP se caracterizaron 3 subpoblaciones de aCL, las cuales fueron: aCL no escondidos dependientes de β_2 GP-I para su detección *in vitro*, dos subpoblaciones de aCLE, una dependiente y otra independiente del cofactor, en 2 pacientes se identificó una población más de aCL no escondidos que fue independiente de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*. Los estudios de reactividad de los aCLE mostraron que solo reaccionaron contra FL tanto aniónicos como neutros, y no reaccionaron contra otros antígenos (DNACs, DNACd, gamaglobulina agregada, componentes nucleares ni citoplásmicos). Los estudios de inhibición de los aCLE con micelas de los diferentes FL revelaron dos patrones de reactividad: contra FL aniónicos y contra FL neutros. Los TP y TPTa se prolongaron en presencia de SHN₅₆ y de las IgG's purificada, las mCL y mFTS inhibieron la actividad AL de los aCLE. Las digestiones con las fosfolipasas A₂, B, C y D incrementaron la actividad aCL de los SHN en 0.9, 3.2, 12 y 4.6 respectivamente, cuando se compararon con los sueros sin tratar. La CCF mostró que los inhibidores termolábiles son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol. Los estudios en ratones mostraron que tanto en ratones normales como autoinmunes se pueden detectar los aCLE. Las características de los aCLE murinos fueron similares a las de los humanos, es decir, no requieren de β_2 GP-I para su detección *in vitro* y tuvieron reactividad cruzada contra fosfolípidos tanto aniónicos como neutros. Los aCLE se detectaron también en los ratones NZB que tenían títulos altos de aCL no escondidos. En los ratones NZB se detectaron además aCLE de isotipo IgM independientes de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*.

Los resultados muestran la caracterización de una nueva familia de autoanticuerpos que son verdaderos anticuerpos antifosfolípidos (aFL) cuyos sitios de reconocimiento antigénico se encuentran ocupados por fosfolípidos, por lo que circulan en el torrente sanguíneo inactivos. El estudio del origen de estos aFL ayudará a conocer su papel fisiológico (si lo existe) y su relación molecular con otros aFL patogénicos o no patogénicos.

1. ABSTRACT

It has been recently shown that heat treatment (56°C for 30 min) of human sera unveiled anti-cardiolipin antibodies in normal subjects. The nature of the thermolabile factor that hides anti-cardiolipin antibodies (aCL) is not known nor are the characteristics of the antiphospholipid antibodies that belong to this family.

Aims of this study. i) Define the prevalence and the isotype of the hidden anti-cardiolipin antibodies. ii) Analyze if these antibodies are found in autoimmune (systemic lupus erythematosus [SLE] and anti-phospholipid syndrome [APS]) and infectious (syphilis) diseases. iii) Analyze whether these autoantibodies require the presence of β_2 GP-I. iv) Define its reactivity v) Analyze its possible role as circulating anticoagulant antibodies. vi) Characterize the thermolabile factor that hides them. vii) Study hidden antibodies in mice.

Material and methods. We study a total of 197 human sera. One hundred were from normal subjects; twenty five from SLE patients; 22 from APS patients; and 22 from syphilis patients. Total IgG was purified from 5 normal sera and uncover and hidden aCL were characterized from 2 APS patients. Sera from Balb/c and NZB mice were also studied. In every group, we studied the dependency of β_2 GP-I of the anticardiolipin antibodies (hidden or not) by ELISA and after inhibition with cardiolipin micelles. Reactivity to other antigens (anionic and neutral phospholipids, dsDNA, ssDNA and rheumatoid factor) were also tested by ELISA. The cross-reactivity of aCL with nuclear and cytoplasmic antigens was tested by indirect immunofluorescence. Lupus anticoagulant activity was determined by measuring the effect of normal sera or purified IgG after heat treatment (56°C for 30 min) and mixed (v/v) with normal plasma on the prothrombin time and partial time of activated thromboplastin. Lupus anticoagulant activity of heated sera or IgG was inhibited with cardiolipin and/or phosphatidylserine micelles. To characterize the thermolabile factor 10 normal sera were treated with phospholipases (A₂, B, C, and D). Purification of hidden antibodies and the thermolabile factor was carried out by dialysis in benzoylated cellulose membranes against hyperosmolar buffers at low pH. The thermolabile factor was finally identified by thin layer chromatography. Its nature was corroborated by ELISA and by autologous inhibitory assays.

Results. All hidden aCL were of the IgG isotype and were detected in 94% of normal human sera. Hidden aCL were also detected in sera from SLE, APS and syphilis patients, and were akin to their uncover aCL. In APS patients 3 aCL subpopulations were identified: i) uncover aCL dependent on the presence of β_2 GP-I for its detection *in vitro*. ii) Hidden aCL dependent or not on the presence of β_2 GP-I. iii) In two patients uncover aCL were found to be independent of β_2 GP-I for its detection *in vitro*. The cross reactivity of hidden aCL was limited to anionic and neutral phospholipids. Inhibition with micelles showed two patterns of reactivity, one against neutral and other against anionic phospholipids. Phospholipases digestion results in increased activity of aCL from normal subjects by 0.9, 3.2, 12, and 4.6 respectively when compared to undigested sera. Thin layer chromatography revealed that the thermolabile factor consist of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and phosphatidylglycerol. Hidden aCL were also demonstrated in autoimmune or normal mice and were similar to those found in humans. However, hidden aCL of IgM isotype independent of β_2 GP-I were found in NZB mice.

Our results demonstrate a new family of autoantibodies which are truly anti-phospholipids antibodies. The binding sites of these autoantibodies are occupied *in vivo*, thus they remain inactive in the circulation. The study on the origin of these autoantibodies, will be important to know its physiological role (if there is any) and their molecular relationship with other pathogenic or non-pathogenic anti-phospholipid antibodies.

2. ABREVIATURAS

AAN	Anticuerpos anti-nucleares.	DO ₄₀₅	Densidad óptica leída a 405 nanómetros (nm).
a β_2 GP-I	Anticuerpos anti- β_2 GP-I.	EDTA	Acido etilendiamino tetracético.
ACE	Anticuerpos contra eritrocitos.	EIT	Electroinmunotransferencia.
AF	Acido fosfatídico.	ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme linked immuno-sorvent assay).
AL	Anticoagulante lúpico.	EM	Esfingomielina.
aCL	Anticuerpos anti-cardiolipina.	ERBr	Eritrocitos de ratón tratados con bromelina (bromelinizados).
aCLE	Anticuerpos anti-cardiolipina escondidos u ocultos.	FITC	Isotiocianato de fluoresceina (Fluorescein Isothiocyanate)
aCL-IgG	Anticuerpos anti-cardiolipina de isotipo IgG.	FL	Fosfolípido.
aCL-IgM	Anticuerpos anti-cardiolipina de isotipo IgM.	FR	Factor reumatoide.
aCL-mCL	Anticuerpos anti-cardiolipina y inhibidos con micelas de cardiolipina.	FRC	Fosforilcolina.
aFRC	Anticuerpos anti-fosforilcolina.	FTC	Fosfatidilcolina.
aFTC	Anticuerpos anti-fosfatidilcolina.	FTE	Fosfatidiletanolamina.
aFTC-IgG	Anticuerpos anti-fosfatidilcolina de isotipo IgG.	FTG	Fosfatidilglicerol
aFTC-IgM	Anticuerpos anti-fosfatidilcolina de isotipo IgM.	FTI	Fosfatidilinositol.
aFTE	Anticuerpos anti-fosfatidiletanolamina.	FTS	Fosfatidilserina.
aFL	Anticuerpos anti-fosfolípidos.	g	Aceleración de la gravedad.
Ag	Antígeno.	GGA	Gamaglobulina agregada.
ANT	Anticuerpos naturales timocitotóxicos.	HEp-2	Línea celular de carcinoma de laringe humano (Human Epithelial-2).
ASB	Albúmina sérica bovina.	HLA	Antígenos leucocitarios humanos (Human leukocyte Antigens).
β_2 GP-I	β_2 Glicoproteína-I.	HIV	Virus de inmunodeficiencia humana (Human Immunodeficiency Virus).
CCF	Cromatografía de capa fina.	Hom	Homogeneo. Patrón de anticuerpos antinucleares.
CD5	Determinante de grupo número 5 (su contraparte en el ratón Ly-1).	H ₂ O _{DO}	Agua destilada desionizada.
CL	Cardiolipina.	HEPES	(Acido N-[2-Hidroxietil] piperazina -N'- [etano-sulfónico]).
DE	Desviación estándar.	ICH	Injerto-contrahuésped.
DNA	Acido desoxirribonucleico.	IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
DNAcd	Acido desoxirribonucleico de cadena doble.	IP	Inmunopunto.
DNAcs	Acido desoxirribonucleico de cadena simple.		
DO	Desidades ópticas.		

IgA	Inmunoglobulina A.	SDS	Dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate).
IgG	Inmunoglobulina G.	SHN	Suero humano normal.
IgM	Inmunoglobulina M.	SHN ₅₆	Suero humano normal tratado a 56 °C durante 30 minutos.
INNSZ	Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.	Sm	Antígeno Smith.
LEG	Lupus eritematoso generalizado.	TA	Temperatura ambiente (Aproximadamente 20 °C).
LisoFTE	LisoFosfatidiletanolamina.	TEMED	(N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamino).
M	Concentración molar.	TP	Tiempo de protrombina.
mCL	Micelas de cardiolipina.	TPTa	Tiempo parcial de tromboplastina activa.
MEM	Medio esencial mínimo (Medio de cultivo).	TVWR	Tiempo de Veneno de Víbora de Russell.
mFL	Micelas de fosfolípido.	VDRL	Examen de laboratorio usado para diagnosticar sífilis (Venereal Disease Reference Laboratory).
mFTS	Micelas de fosfatidilserina.	V _H	Región variable de las cadenas pesadas.
N	Concentración normal.	V _k	Región variable de las cadenas ligeras kappa.
Neg	Negativo.	V _L	Región variable de las cadenas ligeras.
NK	Células asesinas naturales (Natural Killer).	V/V	Concentración volumen/volumen.
NS	No significativo.		
NZ	Nueva Zelanda (Cepa de ratones de Nueva Zelanda)		
NZB	Cepa de ratones negros de Nueva Zelanda (New Zealand Black).		
NZW	Cepa de ratones blancos de Nueva Zelanda (New Zealand White).		
PAGE-SDS	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Polyacrylamide Gel with Sodium dodecyl sulfate).		
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate buffer saline).		
PFN	Plasma fresco normal.		
PFN _{pp}	Plasma fresco normal pobre en plaquetas.		
P/V	Concentración peso/volumen.		
RIA	Radio inmunoanálisis.		
RNP	Ribonucleoproteínas.		
rpm	Revoluciones por minuto.		
SaF	Síndrome de anti-fosfolípidos.		
SaFP	Síndrome de anti-fosfolípidos primario.		
SBF	Suero bovino fetal.		
SBRN	Suero de bovino recién nacido.		

3. INTRODUCCION

Por mucho tiempo se ha considerado que la principal función del sistema inmune es la protección del huésped en contra de agentes infecciosos ambientales y productos tóxicos. En consecuencia, el sistema inmune es necesario para sintetizar anticuerpos dirigidos contra antígenos expresados por el medio ambiente externo. Sin embargo, en los últimos 30 años el concepto se ha modificado al encontrarse que el sistema inmune de casi todos los vertebrados es capaz de producir, en cantidades relativamente altas, anticuerpos que no solo reconocen antígenos ambientales externos sino también, anticuerpos dirigidos contra antígenos altamente conservados durante la evolución, tales como actina, histonas, y ácidos nucleicos, y además, anticuerpos que reconocen constituyentes celulares ubicuos, como AMP-cíclico, fosforilcolina y colesterol. Con esto parecería, que el sistema inmune tiene el potencial para producir anticuerpos específicos que reconocen estructuras propias.

Debido a que el sistema inmune produce y secreta continuamente anticuerpos que reconocen estructuras propias, esto ha sido la base para el estudio de autoanticuerpos naturales, i.e., los anticuerpos mostrados en el suero de animales e individuos fisiológicamente sanos.

Por otra parte, pueden existir situaciones en las que se produzca un trastorno de la inmunorregulación que lleve a la formación de autoanticuerpos con potencial patogénico sobre estructuras del huésped, y como consecuencia cause daño a tejidos y secundariamente la expresión de estados patológicos que puedan llevar a la muerte del individuo.

Este concepto nos lleva a definir que existen por lo menos dos grandes grupos de fenómenos autoinmunes, uno natural, que probablemente cumpla una función fisiológica dentro del sistema inmunológico; y uno patogénico, el cual esté fuera de la regulación del sistema inmune y por lo tanto se manifieste como enfermedad.

El presente trabajo considera estos 2 fenómenos de autoinmunidad, los cuales pueden o no estar relacionados entre sí.

4. GENERALIDADES

4.1 AUTOINMUNIDAD NATURAL

Uno de los principales papeles del sistema inmune es el distinguir entre antígenos autólogos y no propios. Esta característica del sistema inmune le permite identificar y reaccionar con antígenos extraños sin causar daño. Inicialmente, se consideró que la tolerancia a lo propio (estado de no-autoinmunidad), estaba relacionado con la ausencia de autoanticuerpos y linfocitos autorreactivos. Apoyando esta hipótesis, Ehrlich (1904) acuñó el término "horror autotoxicus", expresando la visión de que la presencia de autoanticuerpos es anormal y tiene una consecuencia clínica grave.

En 1959 Burnet como un corolario de su teoría de "selección clonal", formuló el concepto de "delección clonal", en la que propuso que las clonas que expresan receptores para antígenos fetales son detenidas en su desarrollo y eliminadas, confiriendo tolerancia. Por lo tanto, la presencia de autoanticuerpos estaría relacionada en el surgimiento de clonas autorreactivas "prohibidas" a través de mutación, ó por liberación de antígenos secuestrados. Hallazgos subsecuentes indicaron que los linfocitos autorreactivos pueden identificarse en el sistema inmune normal del adulto, surgiendo algunas dudas a cerca de la teoría de la "selección clonal", y dando pie a que Nossal y cols., formularan la teoría de la "anergia clonal". Acorde con este concepto, los linfocitos que surgen, pasan a través de una fase en la cual, sobre un encuentro antigénico, estos son funcionalmente inactivados, pero no eliminados. Con una visión opuesta, Jeme propone su "teoría de la red", en la que la auto-reactividad es un componente normal del sistema inmune maduro. El sugiere que la principal función de este sistema es vigilar el medio interno y mantener una homeostasis macromoléculas, más que para proteger al huésped del medio externo que lo rodea. Durante los últimos 20 años, se ha acumulado suficiente evidencia que muestra que la actividad autoinmune es ubicua en condiciones normales, y varias teorías han sido propuestas para su explicación.

4.2 AUTOANTICUERPOS NATURALES

El término de autoanticuerpo natural se refiere a anticuerpos autorreactivos presentes en el suero, que no necesitan de la estimulación antigénica ó mitogénica de células B para su síntesis. Inicialmente, la presencia de estos anticuerpos se relacionó a antígenos desconocidos ó infecciones subclínicas. Sin embargo, ahora se cree que los anticuerpos naturales son formados independientemente del estímulo antigénico.

Los autoanticuerpos naturales son un componente de la inmunidad natural que también incluye a las células asesinas naturales y macrófagos. Uno de los principales papeles de este sistema es actuar como una primera línea de defensa y destruir agentes extraños en el contacto inicial.

Durante las últimas 2 décadas se han detectado varios anticuerpos naturales en el suero de animales y humanos sanos y en algunas poblaciones especiales, incluyendo familiares sanos en primer grado de pacientes con enfermedades autoinmunes, individuos normales de más de 70 años, y pacientes con gamopatías monoclonales. Por ejemplo, han sido reportados factores reumatoides, anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-DNA e histonas, y anticuerpos linfocitotóxicos, en el suero de familiares en primer grado de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG). Isenberg y cols., mostraron anticuerpos anti-DNA con el idiotipo patogénico 16/6, en el 24% de los familiares sanos en primer grado de pacientes con LEG. De manera similar, se ha encontrado factor reumatoide, anticuerpos anti-tiroideos, anticuerpos anti-centrómero, y anticuerpos anti-mitocondriales, en el suero de familiares de pacientes con artritis reumatoide, tirotoxicosis, esclerodermia, y cirrosis biliar primaria respectivamente.

Los anticuerpos naturales también han sido encontrados a títulos altos en el suero de pacientes con mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, y gamopatía monoclonal benigna. Avrameas y cols., detectaron que 5.7% de los sueros de 612 pacientes con gamopatía monoclonal tuvieron autorreactividad contra actina, tubulina, DNA de cadena doble, miosina y tiroglobulina. Estudios subsecuentes muestran que el suero de pacientes con mielomas o condiciones relacionadas reacciona con histonas, DNA, Ro y La, antígenos órgano específicos, Sm y RNP. Es importante hacer notar, sin embargo, que en

solo pocos casos ha sido mostrado definitivamente que es la proteína del mieloma en sí la que se une al autoantígeno.

El elevado porcentaje de autoanticuerpos en el suero de pacientes con discrasias de células plasmáticas sugiere que células B autorreactivas son más propensas a desarrollar una transformación neoplásica, ó que las células plasmáticas capaces de producir autoanticuerpos son muy comunes en el repertorio de linfocitos B.

4.3 ORIGEN Y MECANISMOS DE CONTROL DE LOS AUTOANTICUERPOS

La detección de autorreactividad en el suero de individuos sanos implica que los genes que codifican para autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos anti-DNA, pueden existir en el genoma de células B normales. Se ha observado que las células B producen autoanticuerpos polirreactivos de baja afinidad previo a la estimulación antigénica y que son codificados por genes de línea germinal. En apoyo a la existencia de genes de línea germinal que codifican para autoanticuerpos en el suero de personas normales, se han reportado algunas similitudes entre estos autoanticuerpos y la expresión de genes fetales, lo cual indica que los genes V_H en un diverso espectro de autoanticuerpos son los mismos que aquellos expresados con una elevada frecuencia durante la ontogenia temprana. Estos datos sugieren que los autoanticuerpos naturales y los autoanticuerpos patogénicos (AAN), así como los tumores de células B expresan un repertorio restringido de genes V similar al generado durante la diferenciación temprana de precursores de células B.

La población de células B con autorreactividad probablemente constituya una elevada proporción del total de células B. A este respecto, una intensa investigación se ha enfocado en un subgrupo de células B, llamadas células B CD5 positivas ($CD5^+$) cuyo denominador común es la expresión en su superficie de un marcador que originalmente se creía que era exclusivo de células T pero que actualmente se sabe que también lo presentan un subgrupo de células B. Las células B $CD5^+$ en el humano ó $Ly-1^+$ en el ratón tienen en su superficie Ig. Los marcadores CD5 y Ly1 son determinantes de superficie, los cuales son marcadores pan-T, y se expresan en la superficie de todas las células T, incluyendo los subtipos CD4 y CD8. Las células B $CD5^+$ representan el 10 a 25% de las células B circulantes y esplénicas y constituyen la mayoría de las células B del bazo fetal humano y cordón umbilical.

La importancia de las células B $CD5^+$ en la producción de autoanticuerpos se basó en 3 observaciones:

- a) La frecuencia de células B Ly1-CD5 en algunas especies murinas susceptibles a enfermedades autoinmunes y en humanos con enfermedades autoinmunes está incrementada.
- b) Las células B Ly1-CD5 producen autoanticuerpos.
- c) Existe un incremento significativo entre la asociación de leucemia linfocítica crónica $CD5^+$ y enfermedades autoinmunes.

No obstante, aunque en un inicio se intentó relacionar la función de las células CD5-Ly1 con enfermedades autoinmunes, un análisis crítico de varios hallazgos experimentales indican:

- I. Que mientras la frecuencia de células B Ly1 están incrementadas en algunas cepas murinas pre-autoinmunes (NZB, ratón *me^v*), este subtipo no está incrementado en otras especies pre-autoinmunes (MRL/lpr, y SJL). Esto sugiere que otros factores genéticos más sutiles controlan la frecuencia de células Ly1.
- II. Existe una elevada frecuencia de células B CD5 en ciertas enfermedades autoinmunes humanas (artritis reumatoide, Sjögren, esclerodermia y síndrome de anti-

fosfolípido primario), y en otras enfermedades (esquizofrenia), no obstante, no hay evidencia de un incremento de estas células en otras enfermedades autoinmunes sistémicas tal como el LEG ó enfermedades autoinmunes organo-específicas.

III. Es aparente que los autoanticuerpos organo-específicos y no organo-específicos son producidos tanto por células B convencionales como por células B CD5-Ly1, con la excepción de anticuerpos anti-eritrocitos de ratón bromelinizados (anti-ERBr) y anti-timocitos, los cuales son producidos principalmente por células B Ly1 del peitoneo en el ratón, y anticuerpos polirreactivos producidos por células B CD5⁺ en humanos.

IV. No hay evidencia de una expresión preferencial de familias de genes V_H ó V_L en células B CD5 y Ly1, comparado con células B convencionales excepto los anticuerpos murinos anti-ERBr.

V. Las células B CD5 y Ly1 aparentemente usan genes V que no sufren hipermutación somática. Esto puede estar relacionado con una pérdida de la secuencia permisiva para los procesos de mutación y cambio de isotipo, ó alternativamente, a causa de una falta de respuesta de este subtipo de células a células T de ayuda. El papel de las células B Ly1-CD5 en la producción de autoanticuerpos aún debe ser esclarecido.

4.4 ORIGEN DE LOS AUTOANTICUERPOS PATOGENICOS

Hay dos teorías que intentan responder esta pregunta, una de estas se basa en la producción de autoanticuerpos patogénicos a partir de genes de línea germinal, como consecuencia de un defecto en la regulación de la producción de los autoanticuerpos naturales. La segunda teoría está basada en que estos autoanticuerpos son el resultado de genes que sufren mutación somática derivada de un antígeno. La primera evidencia de que los autoanticuerpos naturales pueden estar relacionados con los autoanticuerpos patogénicos se originó del estudio del idiotipo 16/6, el cual se identificó originalmente en un anticuerpo IgM anti-DNA derivado de un pacientes con LEG. Los anticuerpos con el idiotipo 16/6 se han encontrado en los depósitos inmunes en lesiones renales y de la piel de pacientes con esta enfermedad. Este idiotipo es codificado por el gen de línea germinal V_H26 (familia V_H3), y linfocitos B policlionalmente activados de sujetos normales producen anticuerpos con este idiotipo, y también puede estar presente en anticuerpos que se unen al polisacárido K-30 de la Klebsiella. Una interpretación de éstos datos es que el idiotipo 16/6 ha sido conservado para ayudar a proteger a las especies contra infecciones, pero que en ciertas circunstancias algunos autoanticuerpos que portan este idiotipo son sobre regulados y pueden ser patogénicos. Otros autoanticuerpos también derivados de pacientes con lupus, es probable que sean codificados por genes de línea germinal, por ejemplo, el anticuerpos anti-DNA 21/28 codificado por la familia V_H1.

4.5 MODELOS MURINOS DE AUTOINMUNIDAD

Ya que el modelo más estudiado de autoinmunidad es el del ratón que desarrolla espontáneamente una enfermedad semejante al LEG, tomaremos a éste como un ejemplo en la patogenesis de autoinmunidad, pudiendo ser esto común ó no para otros trastornos autoinmunes.

Los defectos encontrados en los modelos animales simplemente nos muestran la elevada complejidad que tiene el desarrollo de un trastorno autoinmune, lo cual se hace aún más evidente cuando se intenta estudiar en el hombre. De hecho, se hace evidente que la enfermedad que intenta llamarse "lupus murino" no es similar dentro de una misma

especie (el ratón) ya que los genes que regulan a este trastorno varían de una cepa a otra, lo cual genera una gran diversidad de manifestaciones con un fondo patogénico diferente. Por este motivo, el intentar hacer equivalentes estos defectos en la enfermedad que desarrolla el humano tal vez no sea adecuado. En el hombre no es posible tener un control estricto de razas y menos aún el tenerlo genéticamente controlado y además, no es posible controlar el medio ambiente que lo rodea, lo cual hace más complejo su estudio.

4.5.1 PATOGENESIS DE LA AUTOINMUNIDAD EN LOS RATONES DE NUEVA ZELANDA (NZ)

La etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes no ha podido estudiarse profundamente por carecerse de modelos apropiados, sin embargo, las cepas de ratones que desarrollan espontáneamente una enfermedad muy parecida al LEG del humano han sido un modelo importante para el estudio de la patogénesis de esta enfermedad, y una ayuda importante para el desarrollo y demostración de varios procesos inmunológicos básicos. En este sentido, el entendimiento de la patogénesis y la etiología del lupus murino puede extrapolarse a la enfermedad del humano, lo cual ha ayudado a generar el conocimiento universal de la autoinmunidad y la inmuno-regulación.

El desarrollo de modelos animales del síndrome de anti-fosfolípidos (SaF), ha comenzado a brindar sus primeros frutos, con respecto al papel patogénico de los aFL. Durante los últimos años se han descrito varios modelos animales de SAF. La cepa de ratones autoinmunes MRL/lpr, que posee el gen *lpr* de linfoproliferación, fue el primero de ellos. En este modelo, se ha observado que después de los dos meses de edad, los ratones MRL/lpr desarrollan títulos altos de autoanticuerpos, incluyendo aFL de clase IgG, que se asocian a la presencia de trombocitopenia y a gestas de productos de talla baja. Se ha descrito también, como en los pacientes con SAF, que los aFL de los ratones MRL/lpr tienen reactividad cruzada con otros fosfolípidos ácidos pero no contra DNA. La cepa congénica MRL/+ que carece del gen *lpr*, también presenta la enfermedad pero con menor gravedad, además desarrollan títulos anormales de aFL y trombocitopenia pero en etapas mucho más tardías de la vida.

Un modelo murino que desarrolla títulos altos de aFL, asociados a manifestaciones clínicas, es el del ratón Negro de Nueva Zelanda (NZB). Este ratón tiene un promedio de vida de 467 días para los machos y de 431 para las hembras (Tabla 1). La muerte a tan corta edad se atribuye al desarrollo de anemia hemolítica entre el primero y quinto mes de vida. La anemia es causada por anticuerpos contra eritrocitos. Los autoanticuerpos contra eritrocitos (ACE) en esta cepa de ratones pueden ser detectados desde los tres meses de edad y alcanzan una frecuencia del 100 % a los doce meses de su vida. En los ratones NZB también se detectan autoanticuerpos naturales timocitotóxicos (ANT) que reconocen linfocitos T. La presencia de los ANT antecede a la aparición de los ACE y alcanza una frecuencia del 100 % a los 3 meses de edad. Con respecto a los ACE, se conocen cuatro tipos en los ratones NZB, tres de estos antígenos son crípticos y reconocen eritrocitos tratados con bromelina. La naturaleza del epítipo fue revelada por Kawaguchi en 1987¹.

Otro autoanticuerpo presente en el modelo NZB es el ANT, estos anticuerpos de isotipo IgM reaccionan virtualmente contra todas las células T en un patrón similar al de los anticuerpos anti-Teta. Sin embargo, la identidad del antígeno(s) es controversial, pues existe una gran heterogeneidad en la respuesta de los ANT, lo cual dificulta la caracterización de los antígenos de la célula T involucrados en el reconocimiento.

TABLA 1
CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS RATONES AUTOINMUNES
DE NUEVA ZELANDA

PARAMETRO	NZB	B/WF ₁
Sobrevida		
Machos	467*	439
Hembras	431	280
Autoanticuerpos naturales predominantes	timocitotóxicos anti-eritrocitos anti-DNAcs anti-gp70	anti-DNAcd, cs anti-histonas anti-RNA anti-gp70
Degeneración acelerada del timo	si	si
Infiltración de tejido por células linfoides	si	si
Predominancia de sexo	baja frecuencia de hembras	principalmente hembras
Causa primaria de muerte	anemia hemolítica	falla renal

* Media de la sobrevida en días

Los ratones NZB también tienen anticuerpos circulantes contra DNA de cadena simple (DNAcs), sin embargo, no sufren glomerulonefritis severa. Una observación importante, es el hecho de que algunos autoanticuerpos monoclonales murinos y anticuerpos convencionales tienen capacidad de reconocer a más de un antígeno^{2, 3}. Además, el patrón de reactividad antigénica y el repertorio que desarrollan las células de bazo de los ratones NZB jóvenes es también similar al de los ratones normales⁴, lo cual sugiere que la autorreactividad es una función normal en la ontogenia del sistema inmune. Sin embargo, en animales genéticamente predispuestos a desarrollar autoinmunidad, el nivel funcional y estructural de los autoanticuerpos puede cambiar con la edad.

4.5.2 LINFOCITOS B

Con respecto a las células B de los ratones NZB, una de sus principales características es su hiperactividad (Tabla 2). Se ha reportado que presentan un proceso de maduración precoz que lleva a la existencia de grandes cantidades de células B maduras y a la existencia de precursores en etapas tempranas de maduración⁵.

TABLA 2
ANORMALIDADES EN LOS LINFOCITOS DE LOS RATONES
DE NUEVA ZELANDA

LINFOCITOS B

- Producción espontánea de Ig's *in vitro*.
- Hipergammaglobulinemia.
- Elevado número de unidades formadoras de colonias de células B, células B clonables.
- Depleción temprana de precursores de células B de médula ósea.
- Mayor número de células *Ly-1*⁺
- Mayor respuesta a antígenos, mitógenos y a las señales de las células T.
- Defectos en la inducción de tolerancia.
- Acumulación intracelular de cadenas J y del fragmento C terminal de la cadena m.
- Mayor expresión del oncogen *c-myc*.
- Menor capacidad de generación de células T supresoras.

LINFOCITOS T

- Actividad T supresora disminuida.
 - Reacción mixta linfocitaria autóloga disminuida.
 - Defecto en la inducción de tolerancia.
 - Incremento en la producción de autoanticuerpos post trasplante en hospedero normal.
-

Una evidencia que explica la hiperactividad de las células B, es el incremento en la respuesta a las señales de las células accesorias⁶⁻⁸. Apoya lo anterior, el hallazgo de la sobre expresión del oncogen *c-myc* y la acumulación en el citoplasma de dos proteínas, la cadena J y el fragmento C terminal de la cadena m⁹, estas dos alteraciones son características de las células B activadas de los ratones NZB.

Los reportes de la asociación del marcador *Lyt-1* (marcador de superficie que se pensaba era exclusivo de las células T) con el linfoma murino de las células B, y su homólogo humano el *Leu-1*¹⁰ con la leucemia linfocítica crónica, ayudaron al descubrimiento de una población de células B de bazo que expresan dicho marcador de superficie en los ratones NZB¹¹.

El estado de activación de las células B *Ly-1*⁺ se ha determinado por los niveles elevados de transcripción de *c-myc* y por la facilidad con la que pueden ser inmortalizadas¹².

Otra característica de las células B *Ly-1*⁺ es su capacidad de regular funciones de las células linfoides. Por ejemplo, existen reportes que muestran que la actividad de ayuda ("helper") de las células B *Ly-1*⁺ se puede deber a la secreción de una linfocina no-inmunoglobulina¹³. Se ha descrito también una citocina que acelera la maduración de células B y cuyo origen son las mismas células B, que tiene la capacidad de inducir actividad de ayuda idiotipo-específica en estas células. Existen reportes de la participación de las células B *Ly-1*⁺ en la inmunosupresión de células T¹⁴. Los ratones NZB adultos tienen células B *Ly-1*⁺ "hiper diploides" con los cromosomas 10, 15, 17 y X duplicados, además de una sobre expresión de la molécula de superficie. El paso de células hiperdiploides de NZB a receptores (NZB x DBA/2)F₁ resulta en la expansión de las

poblaciones celulares del bazo del receptor, decremento de las células B peritoneales endógenas $Ly-1^+$ y de las células B de bazo, se incrementan los macrófagos de bazo, y se reducen los niveles de IgM sérica y de autoanticuerpos anti-DNAcs. La actividad reguladora de las células B $Ly-1^+$ es más intrigante por el hecho de que se encuentran en el timo de ratones normales¹⁵.

Los estudios relacionados con la estructura de las inmunoglobulinas producidas por las células B $Ly-1^+$, muestran que existe restricción en el uso de los genes que codifican para las regiones variables. En dos estudios recientes se reportó que existe uso exclusivo de una familia de genes V_H , la V_H11 ^{16, 17}. El análisis de linfomas de células B $Ly-1^+$ también muestra que existe restricción del uso de los genes V_H y V_L dada por la selección del antígeno; al parecer dichos genes no sufren hipermutación somática¹⁸. Los linfomas de células B $Ly-1^+$ mostraron una importante capacidad para realizar el cambio de isotipo manteniendo la especificidad contra fosfatidilcolina.

En los ratones NZB el número de células B $Ly-1^+$ tanto de peritoneo como de bazo es aproximadamente normal (tabla 3); en tanto que en los híbridos B/W F_1 los niveles de estas células en bazo son mucho mayores comparados con los ratones NZB. En cultivo, se ha observado que las células B $Ly-1^+$ son las responsables de la secreción de IgM característica de las células de bazo de los ratones NZB^{19, 20}, siendo su especificidad dirigida contra antígenos propios, que incluyen timocitos y DNAcs. La exposición *in vitro* de las células de bazo de los ratones NZB a antígenos exógenos resultó en la estimulación de células B $Ly-1^+$ y no de $Ly-1^-$ ^{19, 20}, lo que sugiere que el repertorio de las inmunoglobulinas de superficie de las células B $Ly-1^+$ está dirigido en contra de antígenos propios. Sin embargo, se ha observado que también las células B $Ly-1^+$ de bazo producen anticuerpos contra DNAcs²¹.

TABLA 3
PROPIEDADES DE LAS CELULAS B $Ly-1^+$ DE LOS RATONES
DE NUEVA ZELANDA

Mayor número en bazo y cavidad peritoneal; aún más aumentadas en el híbrido B/W F_1 comparadas con los ratones NZB.
Se encuentran presentes en la circulación de los ratones NZ ancianos.
Son las responsables de la liberación espontánea de los anticuerpos <i>in vitro</i> .
Los anticuerpos que producen reconocen antígenos propios; glóbulos rojos, timocitos, DNA.
Generalmente son estimuladas por si mismas, y no por antígenos exógenos.
Sus funciones parecen estar reguladas por células T.
Existen subpoblaciones hiperdiploides que se encuentran presentes en los ratones NZB ancianos y cuya función aparentemente es reguladora.

Se ha reportado que existen diferencias en cuanto a la especificidad de los autoanticuerpos producidos por las células B $Ly-1^+$. Por ejemplo, a diferencia de las células B $Ly-1^+$ de bazo de los ratones NZB las células B $Ly-1^+$ de peritoneo producen con mayor frecuencia anticuerpos anti-ERBr²², en tanto que, las células B $Ly-1^+$ de bazo provenientes del híbrido B/W F_1 no se asocian con la producción de autoanticuerpos dirigidos contra DNAcd. Los anticuerpos que reconocieron ERBr mostraron una relativa monoespecificidad, en contraste con la poliespecificidad de los anticuerpos que reconocen DNA y también

proteínas del citoesqueleto, aunado a su baja afinidad que sugiere que son autoanticuerpos naturales.

Las evidencias de hiperactividad y producción espontánea *in vitro* de inmunoglobulinas por las células B $Ly-1^+$ en los ratones NZB, pueden no ser características inherentes de estas células, sino posiblemente, de un proceso de regulación deficiente.

La relevancia de la asociación entre las células B $Ly-1^+$ y autoinmunidad se refleja también en los estudios recientes en humanos, cuyo homólogo son las células B Leu-1 ($CD5^+$). Estas células sintetizan factor reumatoide y autoanticuerpos anti-DNAcs además, se sabe que constituyen el 50% de las células B del bazo fetal, que son raras en el bazo de los adultos²³.

4.5.3 INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE EN LA PRODUCCION DE AUTOANTICUERPOS

Existen diversos estudios diseñados para estimar el efecto que tiene el microambiente no-autoinmune sobre las células B de los ratones NZB.

Los datos de moléculas efectoras solubles sugieren también la existencia de una red de factores que se encuentran presentes en el microambiente y que ayudan al desarrollo de la respuesta autoinmune en los ratones NZB. En el suero de los ratones NZB jóvenes se encontraron factores que aceleran la maduración de los precursores de las células B²⁴.

La nutrición es también un factor que puede influir en la autoinmunidad²⁵. En algunos trabajos se han reportado los efectos benéficos que tienen los lípidos derivados del pescado sobre los procesos inflamatorios. Lo anterior se fundamenta en que probablemente las grasas del pescado (ácido eicosapentanoico) son un sustrato pobre para la producción de ácido araquidónico, en comparación a las grasas vegetales (ácido linoléico) y tienen una mayor tendencia a formar leucotrienos y prostaglandinas de tipo inhibitorio. La privación del zinc en la dieta disminuye la severidad de la enfermedad en los ratones NZB B/W F_1 ²⁶. No obstante, se desconoce el mecanismo de los efectos de la privación de zinc, se propone una participación en la formación de los "dedos de zinc" por las proteínas unidoras de DNA²⁷ y/o en la actividad de la proteína cinasa C²⁸. La ingesta de una dieta libre de caseína por animales B/W F_1 disminuye el cambio de isotipo de los anticuerpos anti-DNAc y el depósito en los glomérulos de complejos inmunes²⁹.

Bajo el mismo contexto, la contribución de la inmunidad asociada a mucosas en la enfermedad de los ratones NZ puede ser importante. Se ha visto que las células de las placas de Peyer de los ratones NZB no producen espontáneamente *in vitro* inmunoglobulinas, como lo hacen las células de bazo, además de que la relación IgA/IgG en estos mismos animales es mucho menor que en los ratones DBA/2³⁰.

4.5.4 PARTICIPACION DE LAS CELULAS T EN LA PRODUCCION DE AUTOANTICUERPOS

Existen evidencias indirectas que muestran que la respuesta autoinmune en los ratones NZB y B/W F_1 esta relacionada con la actividad de las células T de ayuda (tabla 4). Lo anterior incluye la demostración de la dependencia de las células B tanto de ratones

NZB como de B/W F₁ a las señales provenientes de las células T de ayuda en la proliferación y producción de inmunoglobulinas^{6,31}.

TABLA 4
EVIDENCIAS QUE APOYAN LA PARTICIPACION DE LAS CELULAS T EN LA
PRODUCCION DE LOS AUTOANTICUERPOS PATOGENICOS DE LOS
RATONES DE NUEVA ZELANDA

-
- El tratamiento de ratones B/W F₁ con anticuerpos anti-CD4 reduce la severidad de la enfermedad.
 - La presencia de anticuerpos antinucleares en los ratones NZ similares a los reportados en la enfermedades ICH.
 - El trasplante de células T de ratones NZB a hospederos DBA/2 resulta en el aumento de los niveles de autoanticuerpos.
 - El requerimiento de las células T *in vitro* para la producción de autoanticuerpos anti-DNAcd, y del cambio de isotipo de IgM a IgG.
 - El requerimiento de las células T para la síntesis *in vitro* de autoanticuerpos catiónicos por células de ratones B/W F₁ y SNF1.
 - Los estudios realizados en clonas de células T de ratones NZ confirman la participación de las células T en la producción de los autoanticuerpos.
-

En forma directa, se observó un incremento en la producción de autoanticuerpos cuando se transplantaron conjuntamente células T de ratones NZB y células B de ratones DBA/2 a receptores DBA/xid³², además, se determinó la dependencia de las células T en la producción *in vitro* de autoanticuerpos por células B tanto de ratones NZB como de ratones DBA/2^{33,34}.

Los estudios de clonas de células T autorreactivas se usaron también para esclarecer el requerimiento de células T en la producción de autoanticuerpos. Las clonas T de ayuda mostraron la capacidad de influir en las vías de diferenciación de células B, a través de su especificidad antigénica (antígeno más moléculas Ia), y también en forma antígeno inespecífica (moléculas Ia solas)³⁵.

4.5.5 CELULAS NO T-NO B

En los ratones NZB también se han estudiado las células no T-no B, aunque en forma menos extensiva que los linfocitos. La producción de prostaglandina E (PGE) por macrófagos peritoneales de ratones B/W F₁ se encuentra disminuida³⁶, y en los ratones NZB parece existir un defecto en la IL-1 en las células dendríticas de bazo de los ratones NZB³⁷. La actividad NK (natural killer NK, asesinas naturales) parece estar alterada también en los ratones autoinmunes. En un ensayo para determinar la actividad NK de timocitos de ratones NZB y B/W F₁ contra un blanco de timocitos jóvenes, mostró menor capacidad de lisis, fenómeno que se observa también en las células de bazo de ratones NZB³⁸, lo que sugiere un posible mecanismo por medio del cual las células T autorreactivas pueden escapar a la eliminación.

4.5.6 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

La asociación entre la presencia de determinadas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y la presencia de una enfermedad autoinmune en particular no es poco común en humanos ni en animales, además de que los sistemas *in vitro* que se usan para estudiar la producción de autoanticuerpos consistentemente muestran el requerimiento de compatibilidad en el CPH^{33, 39, 40} (tabla 5).

TABLA 5
PARTICIPACION DEL CPH EN LAS ENFERMEDADES
DE LOS RATONES DE NUEVA ZELANDA

La restricción del CPH que se observó en la producción *in vitro* de autoanticuerpos.
La adición de anticuerpos anti-la reduce la producción de autoanticuerpos *in vitro*.
La presencia de características similares en el lupus murino y en la enfermedad de ICH.
La condición de heterocigotos *H-2* asociados a lupus murino en ratones B/W F₁ y SNF1.
Los estudios genéticos que muestran una fuerte asociación entre autoinmunidad y genes del CPH.
La expresión aberrante de moléculas Ia en células epiteliales, incluyendo tejido del timo, que puede estimular la proliferación mediada por el CPH de células T autorreactivas.

Una evidencia que apoya fuertemente la participación del CPH en el desarrollo de autoinmunidad es la producción de autoanticuerpos en la reacción injerto-contra-huesped (ICH)^{41, 42}. La infiltración de las células linfoides al tejido de los ratones NZB semejan la reacción que se presenta en la enfermedad ICH⁴³. Sin embargo, el papel que juega el CPH en el lupus eritematoso generalizado (LEG) puede ser más complejo al que se observa en la inducción de la enfermedad de ICH. Es importante tener en cuenta que la región del CPH es la única estudiada en este sentido, y que no se debe descartar la posible participación del complejo menor de histocompatibilidad (CMH) conocido también como antígenos menores de estimulación de linfocitos⁴⁴.

4.5.7 EL TIMO EN LA AUTOINMUNIDAD DE LOS RATONES NZ

El timo es un órgano linfoide con participación central en la maduración de las células T. Las anomalías en este órgano tienen un enorme impacto en la homeostasis del sistema inmune y por tanto en la regulación de la respuesta inmune. El modelo NZB de autoinmunidad se caracteriza por presentar múltiples problemas en dicho órgano (tabla 6). Los ratones NZB muestran al igual que otros modelos murinos de lupus, una acelerada atrofia del timo⁴⁵. La degeneración del timo es una característica relativamente temprana del proceso de autoinmunidad de los ratones NZB y puede ser detectada, inclusive, a menor edad que los ANT⁴⁶.

Se ha estudiado también la influencia del timo en la gravedad de las enfermedades autoinmunes en el contexto de las hormonas sexuales.

La forma en que las anomalías del timo influyen en la enfermedad de los NZB y B/W F₁ aun se desconoce; no obstante, son muy claras las diferencias entre los ratones autoinmunes y los que no lo son.

4.5.8 GENETICA

Los trastornos inmunológicos presentes en los ratones NZB son el resultado de alteraciones genéticas. A pesar de que la naturaleza de las alteraciones se desconoce, la información de la influencia genética en la enfermedad autoinmune de los ratones NZB muestra que son varios genes los que están involucrados en la expresión de la enfermedad, la expresión de dichos genes parece ser en forma dominante o codominante.

Para conocer la genética de los ratones autoinmunes NZB los investigadores han estudiado cepas congénicas recombinantes. En los reportes de Datta y colaboradores⁴⁷ muestran que la hiperactividad de las células B, la producción de autoanticuerpos y la reacción anormal con linfocitos autólogos mixtos son fenómenos independientes. Existe también información que apoya el hecho de que los ANT y los anticuerpos anti-DNAcs son producidos por genes independientes. El trabajo de Raveche y colaboradores⁴⁸ muestra evidencias de regulación multigénica en la síntesis de los anticuerpos anti-eritrocitos. Miller y colaboradores⁴⁹ proponen la interacción entre dos grupos de genes no relacionados para fundamentar las características inmunopatológicas de los ratones NZB.

La asociación más consistente de las características autoinmunes con locus genéticos específicos, sigue siendo hasta la fecha, con el sistema principal de histocompatibilidad.

Es posible cierta generalización en la enfermedad autoinmune de los ratones híbridos NZB y de sus cepas derivadas basada en los estudios genéticos, debido a que las anomalías humorales y celulares tienen concordancia. En los ratones NZB, la hiperactividad policlonal parece estar unida a la hiperactividad endógena de las células madre totipotenciales, al número mayor de células Ly-1⁺ y a la hipergammaglobulinemia IgM. Estas características están posiblemente más asociadas con la producción de ANT, menos asociadas con la producción de anticuerpos anti-eritrocitos y mínimamente asociadas con la producción de anticuerpos anti-DNA. Aparentemente no existe asociación con el H-2, sin embargo, la participación del cromosoma 4 en el modelo NZB es evidente. Alternativamente, en el modelo B/W F₁ la respuesta anti-DNA no se asocia con hipergammaglobulinemia, pero se ve influenciada por el cromosoma 17 (H-2) de las dos cepas parentales y con el cromosoma 6 de los ratones NZW^{49,50}.

4.6 ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA (aCL)

La asociación entre manifestaciones clínicas y presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL) fué reportada primeramente en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG), quienes presentaban trombosis u otras manifestaciones vasculares periféricas, anticoagulantes circulantes y/o prueba serológica para sífilis falsa positiva⁵¹. No obstante, fue hasta que se desarrollaron técnicas más sensibles y específicas para la detección de anticuerpos anti-cardiolipina (aCL), que se pudo conocer la verdadera magnitud de esta asociación. Con la aplicación del radioinmunoanálisis (RIA)⁵² y posteriormente del ensayo inmunoenzimático (ELISA)⁵³, para la detección de los anticuerpos aCL, se hizo claro que en pacientes con LEG la presencia de anticuerpos aFL puede asociarse con diversas manifestaciones clínicas que constituyen un síndrome dentro

de la enfermedad⁵⁴. Posteriormente se encontró que el síndrome puede presentarse en pacientes con títulos altos de aFL, y las manifestaciones clínicas a las que se asocian estos anticuerpos, en ausencia de datos clínicos o serológicos de otra enfermedad primaria, se le denominó "síndrome de anti-fosfolípidos primario" (SaFP)⁵⁵⁻⁵⁷, para distinguirlo del síndrome de anti-fosfolípidos secundario o asociado que se presenta primordialmente en pacientes con LEG.

Existen diversas circunstancias en las cuales los aFL pueden aparecer en un individuo, las más importantes son: 1.- como anticuerpos naturales, en cuyo caso son autoanticuerpos codificados por genes de línea germinal; 2.- como resultado de la interacción de factores inmunogenéticos y factores ambientales; 3.- como consecuencia de una des-regulación inmune y/o activación policlonal intrínseca de una enfermedad autoinmune; 4.- como anticuerpos anti-idiotipo de otros anticuerpos; 5.- inducidos por fármacos, y 6.- como resultado de procesos infecciosos, en cuyo caso, la génesis de los aFL es principalmente dirigida por antígeno.

4.6.1 ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS COMO ANTICUERPOS NATURALES

Todos los ratones normales tienen anticuerpos naturales de clase IgM contra ERBr^{58, 59}. El epítipo que se expone con el tratamiento de estas células con bromelina, es la fosfatidilcolina (FTC), fosfolípido de carga neutra localizado en la cara externa de la membrana de las células^{1, 60, 62}. La FTC que es el fosfolípido más abundante de la cara externa del eritrocito se encuentra recubierta por sialoglicoproteínas que pueden ser removidas por enzimas proteolíticas tales como la tiolproteasa bromelina (Br)^{62, 63}. Los aFTC son en su mayoría de clase IgM, sin embargo, se han reportado autoanticuerpos naturales de clase IgG que están regulados por anticuerpos de clase IgM⁶⁴. Los anticuerpos de clase IgM son producidos principalmente, mas no exclusivamente, por células B Ly-1⁺ (CD5⁺)⁶⁵, un subgrupo de células B que expresa en su superficie el marcador conocido como CD5, que se pensaba era exclusivo de linfocitos T. La proteína de membrana CD5 no está relacionada con el receptor de superficie para el antígeno del linfocito B. Las células B CD5⁺ representan del 10-15% de los linfocitos circulantes y de bazo⁶⁶, y constituyen la mayoría de los linfocitos B del bazo fetal humano²³ y del cordón umbilical⁶⁷. A estas células se les ha atribuido la función de ser productoras de autoanticuerpos naturales de clase IgM²⁰. En ratones se ha determinado que las células B CD5⁺ que producen aFTC se encuentran concentradas en la cavidad peritoneal⁶⁸, y en las cavidades pleuropericárdicas⁶⁹. En estas cavidades las células B CD5⁺ expresan un repertorio de anticuerpos diferente al de los linfocitos convencionales, lo cual aumenta la posibilidad de que la especificidad de estos anticuerpos dependa de un grupo particular de genes V_H y V_L. Se ha propuesto que estas diferencias se deben a mecanismos de selección celular que operan específicamente en la población de células B CD5⁺ o bien en ese sitio en particular.

El uso de un grupo de genes por los anticuerpos que muestran reconocimiento contra ERBr ha sido demostrado por diferentes autores^{70, 71, 72}. En el trabajo de Andrade y colaboradores⁷², se muestra la distribución relativa de diez genes V_H y siete V_K con lo que los autores concluyen que la distribución es dependiente de la localización de las células, su interacción con el medio ambiente que las rodea y la edad de los individuos. Los genes conocidos que codifican para los autoanticuerpos naturales contra ERBr son: V_H 81X (7183), V_H 300-19 (Q52), V_H S107 (S107), V_H X24 (X24), V_H PB14 (J606), V_H P6-3R1 (30-60), V_H PNP (V_H 11) pertenecientes todos a la familia V_H 11. De la familia V_K, los que codifican para autoanticuerpos naturales son: V_K1, V_K4, V_K8, V_K9, V_K21, V_K22 y V_K23.

Algunos de estos anticuerpos tienen reactividad cruzada contra otros fosfolípidos zwitteriónicos y/o aniónicos incluyendo cardiolipina¹.

Parece ser que en etapas tardías de la vida de ratones NZB, se incrementan los títulos de anticuerpos naturales contra FTC, fenómeno que coincide con un segundo brote de anemia hemolítica que los lleva a la muerte⁷². En 1990 nosotros describimos el caso de un paciente con anemia hemolítica y títulos altos de aCL de clase IgM con reactividad cruzada contra FTC⁷³. Los anticuerpos purificados de su plasma reconocieron ERBr y eritrocitos envejecidos *in vitro*. Este último hallazgo nos sugiere que los autoanticuerpos contra FTC pueden participar en la eliminación de eritrocitos envejecidos.

La noción de que los autoanticuerpos aFL pertenecen al grupo de los autoanticuerpos naturales se apoya en los siguientes hallazgos: primero, la identificación de un idiotipo relacionado con el idiotipo público 16/6⁷⁴ en el suero de pacientes con SaFP⁷⁵. Los anticuerpos que portan dicho idiotipo son codificados por genes de línea germinal que sufren poca o ninguna mutación somática⁷⁶; segundo, se encontró además que algunos pacientes con SaFP tienen aumentado el número de células B CD5⁺ circulantes⁷⁷, subgrupo de células B que es productor de autoanticuerpos naturales, demostrado esto último en modelos murinos.

4.6.2 FACTORES INMUNOGENETICOS Y aFL

En los familiares de pacientes con LEG se encontró una alta prevalencia de aFL (específicamente aCL), detectados por ELISA, comparados con la población normal no relacionada⁷⁸; aunado esto a la presencia de aFL en los pacientes con LEG, que se encuentran relacionados con marcadores del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), particularmente con componentes del sistema del complemento en los que se ha reportado la presencia de alelos nulos tanto de C4A como de C4B^{78,79}.

La asociación de aCL y HLA-DR7 se reportó también en pacientes con LEG del norte de Italia, en tanto que una asociación entre HLA-DR4 y aCL de pacientes con LEG fue reportada en un estudio pequeño realizado en Inglaterra⁸⁰. Los estudios anteriores reflejan las diferencias étnicas de la frecuencia de los genes HLA-DR entre dos poblaciones. Esto también puede reflejar la participación de los genes HLA-DR β 4 debido a que ambos antígenos están contenidos en el DRw53 y portan la cadena DR β 4.

En pacientes con SaFP de Inglaterra, se encontraron aumentados en frecuencia el DR4 y el DRw53. El DR3, DRw52a y la delección en el gen de C4A que están fuertemente asociados con LEG en pacientes caucásicos y en la población negra se encontraron disminuidos en ese estudio, lo cual apoya las diferencias en la predisposición genética cuando se comparan pacientes con LEG definido⁸¹. El DQw7 en estos pacientes se encuentra aumentado, los autores sugieren que el incremento se debe a desequilibrio de unión entre el DR4-DRw53 y el DQw7, y que el locus DR está más fuertemente asociado que el DQB en pacientes con SaFP. Aún más, el riesgo relativo tan alto en pacientes con SaFP esta dado por el alelo DRw53, el cual está presente en todos los pacientes con aCL positivos de este estudio, lo cual sugiere que este alelo puede jugar un papel directo en el desarrollo de respuesta autoinmune contra fosfolípidos⁸¹.

En un estudio realizado en pacientes mexicanos se encontró asociación con el DR-5 (DRB1*1201) y susceptibilidad a desarrollar SaFP⁸². El DR5 se encontró significativamente aumentado en pacientes con SaFP, lo cual apoya la noción de que la cadena β del DR y DQ tiene secuencias relacionadas con la producción de aFL en estos pacientes. Recientemente el mismo grupo de investigadores tipificaron los genes DR β y DQ β de los 17 pacientes mexicanos con SaFP, por la técnica de reacción de polimerasa en

cadena (PCR) usando sondas de DNA complementario⁸³. La frecuencia de los genes HLA-DR5 y DRw52 estuvo significativamente aumentada en los pacientes con el SaFP al compararla con la frecuencia de estos alelos en los controles (200 haplotipos de sujetos normales). En el estudio se muestra que 14 de los 34 cromosomas de los pacientes presentaron el alelo DRw52 sin estar presente el DR5 lo que sugiere una participación independiente de los genes DR β 1 y DR β 3 en el desarrollo del SaFP.

Otros datos que apoyan la participación de factores inmunogenéticos en el desarrollo del SaF reside en el estudio de familias en las que se ha encontrado más de un miembro con el SaFP, así como el estudio de familias con un miembro con SaFP y otro u otros con LEG⁸⁴.

4.6.3 DES-REGULACION INMUNE Y aFL

La des-regulación inmune trae como consecuencia una excesiva producción de autoanticuerpos, incluyendo los aFL, que es un punto cardinal en pacientes con LEG⁸⁵. En los pacientes con SaFP puede también ocurrir des-regulación inmune que aparentemente es diferente a la que ocurre en pacientes con LEG u otras enfermedades autoinmunes.

4.6.4 aFL COMO ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

El análisis serológico de idiotipos ha permitido incluir ciertos mecanismos en la generación de autoanticuerpos, a pesar de que el origen de esta respuesta aún no se define. Los estudios de las actividades biológicas de los idiotipos y sus anti-idiotipos han iluminado ciertos puntos en el desencadenamiento de las enfermedades autoinmunes. Shoenfeld y Mozes⁸⁶, mostraron que la inmunización de ratones normales con un anticuerpo monoclonal humano que porta el idiotipo 16/6 produjo una enfermedad con características clínicas, serológicas e inmunopatológicas iguales al LEG. Estudios posteriores demostraron que también un anticuerpo anti-idiotipo puede producir el mismo fenómeno, lo que sugiere que la perturbación de la red idiotipo-anti-idiotipo por un idiotipo patogénico o un anti-idiotipo puede iniciar múltiples manifestaciones de LEG. Existen estudios relacionados con la respuesta proliferativa del 16/6 y del anti-16/6 en células T de pacientes con LEG, sus familiares y en sujetos controles. Los resultados sugieren que la alteración de la red del 16/6 también puede ocurrir en seres humanos con enfermedades autoinmunes^{87,88}.

En modelos murinos se ha podido demostrar que la manipulación de una red de anti-idiotipos puede inducir la producción de autoanticuerpos⁸⁹. La regulación de la respuesta autoinmune por interacciones idiotipo-anti-idiotipo también ha sido demostrada⁹⁰.

La observación de idiotipos con reactividad cruzada entre los anticuerpos contra la proteína p24 gag del virus de inmunodeficiencia tipo 1 y los anticuerpos anti-Sm del suero de pacientes con LEG, sugiere, que el desarrollo de un proceso infeccioso juega un papel importante en la generación de una población idiotípica vía mimetismo molecular⁹¹. Con la des-regulación de éstos anticuerpos por un mecanismo de retroalimentación positiva, no dependiente de idiotipo, se puede intensificar y perpetuar la respuesta⁹².

La posibilidad de que algunos aFL pueden ser anticuerpos anti-idiotipo de otros anticuerpos emerge a consecuencia del descubrimiento de un anticuerpo de cabra contra proteína C, un anticoagulante natural humano, que expresa idiotipos que son reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de sujetos normales y de pacientes con LEG. Estos

anticuerpos anti-idiotipo contra anticuerpos de cabra anti-proteína C, también se comportaron como aCL⁹³.

4.6.5 aFL INDUCIDOS POR FARMACOS

A algunos pacientes que reciben tratamiento con clorpromazina se les han detectado títulos altos de aFL⁹⁴, este fármaco, puede inducir LEG⁹⁵, así como en algunos casos, la producción de AAN en ausencia de manifestaciones clínicas de lupus o cualquier otra enfermedad autoinmune⁹⁶.

4.6.6 aFL INDUCIDOS POR INFECCIONES

El primer aFL reportado fue el relacionado con sífilis, que posteriormente se usó para el diagnóstico serológico de esta enfermedad. En procesos infecciosos virales también se ha podido demostrar el incremento en los títulos de aFL⁹⁷. En pacientes con el virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV), el incremento en los títulos de estos anticuerpos se ha atribuido a infecciones oportunistas^{98, 99}, sin embargo, Maclean y colaboradores proponen que el virus es por si mismo capaz de inducir la producción de aFL¹⁰⁰.

4.6.7 aFL Y ANEMIA HEMOLITICA

En el trabajo publicado por Delezé y colaboradores se encontró una fuerte asociación entre la anemia hemolítica y aCL de clase IgM a títulos altos en pacientes con LEG¹⁰¹. El papel patogénico de estos anticuerpos en la producción de la anemia hemolítica se ha hipotetizado pero aun no existe demostración directa. La razón por la cual se duda de que los aFL tengan un papel patogénico en la anemia hemolítica es el conocimiento de que los FL aniónicos se localizan en la cara interna de las membranas celulares y por lo tanto no quedan expuestos a dichos anticuerpos^{102, 103}. No obstante, se ha reportado que en eritrocitos que han sufrido daño en la integridad de su membrana los fosfolípidos (FL) aniónicos pueden exponerse en la cara externa¹⁰² y de esta manera pueden dar origen a anticuerpos patogénicos que tienen capacidad de reconocer fosfolípidos zwitteriónicos por reacción cruzada¹⁰⁴.

En el trabajo de Cabral y colaboradores⁷³ se reportó un paciente con anemia hemolítica y aFTC unidos a sus eritrocitos en el momento de hemólisis activa. Los autores reportan además, que los anticuerpos eluidos de los eritrocitos reconocen eritrocitos de ratón tratados con bromelina (ERBr), y que al estar presentes las proteínas del complemento producen hemólisis. Los anticuerpos reconocen además eritrocitos almacenados, procedimiento que expone la FTC del eritrocito por pérdida de la capa sialoglicoprotéica que la recubre. Estos no son los primeros datos de la capacidad hemolítica de los aFL en el humano. En 1961 Jenkins y Marsh reportaron tres pacientes con anemia hemolítica y prueba serológica para sífilis falsa positiva, a los pacientes se les detectaron además, anticuerpos que reconocían eritrocitos almacenados y tratados con enzimas¹⁰⁵. Oken y colaboradores describieron un paciente con anemia hemolítica y prueba de Coomb's positiva, VDRL positivo, IgM sérica aumentada así como factor reumatoide positivo¹⁰⁶. Cooper y colaboradores reportaron un paciente con linfoma y antecedentes de anemia hemolítica quien desarrollo un anticuerpo monoclonal IgM, que debido a la reacción fuertemente positiva para VDRL se encontró que reconocen CL y FTC. Estos dos

fosfolípidos junto con el colesterol forman el antígeno de la prueba de VDRL¹⁰⁷. Del Papa y colaboradores describieron un paciente con SaFP, anemia hemolítica y crioglobulinemia cuyos anticuerpos eluidos de sus eritrocitos presentaban reactividad cruzada con CL. El isotipo de los anticuerpos detectados fué IgG y reconocían exclusivamente con fosfolípidos de carga negativa¹⁰⁸.

4.6.8 SINDROME DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPIDOS (SaF)

La existencia del SaF como entidad clínica propia está cada vez más definida y delimitada. Diversas manifestaciones clínicas se correlacionan con la presencia de aFL en el suero y aún en otros líquidos biológicos como orina¹⁰⁹. Las manifestaciones clínicas incluyen una alta frecuencia de oclusiones vasculares que habían sido originalmente observadas en pacientes con anticoagulante lúpico (AL) positivo y prueba serológica para sífilis falsa positiva^{51, 110}. Uno de los trabajos más extensos y con mayor número de pacientes estudiados es el elaborado por Alarcón-Segovia y colaboradores en 1989¹¹¹, en el que se estudiaron los aCL de 500 pacientes con LEG mediante ELISA, usando CL como antígeno. Las manifestaciones clínicas que se encontraron significativamente asociadas con la presencia de aFL a títulos altos fueron: trombosis venosas (particularmente las que se presentan en forma recurrente), trombocitopenia, anemia hemolítica, pérdida fetal repetida, livedo reticularis, úlceras en piernas, oclusiones arteriales, hipertensión pulmonar y mielitis transversa. Las tres últimas mostraron una asociación muy débil, al parecer debido a la baja frecuencia con la que se presentan en pacientes con LEG. Para definir mejor la significancia de la asociación los autores usaron dos estrategias, una de ellas fue el estudio de un número grande de pacientes con la manifestación clínica en cuestión (fuera del grupo de los 500 pacientes estudiados) y la otra fué el investigar la presencia de las manifestaciones en pacientes con SaFP.

También se han asociado la presencia de aFL con valvulopatía cardíaca¹¹² y con hipoadrenalismo que se ha encontrado en pacientes con SaFP¹¹³. La corea no estreptocócica que también ha sido propuesta como relacionada a la presencia de aFL en LEG, pero no ha sido apoyada claramente en estudios mayores debido posiblemente a su baja frecuencia. Sin embargo, se ha visto que ocurre en pacientes con SaFP¹¹⁴. Algunas manifestaciones clínicas se asocian preferentemente con aFL de clase IgG, como son la pérdida fetal repetida, la trombosis venosa y la trombocitopenia, en tanto que se asocian con aFL de clase IgM la anemia hemolítica, las úlceras en piernas, el livedo reticularis, la hipertensión pulmonar y la mielitis transversa.

Los pacientes con SaF pueden tener títulos altos de los aFL en forma persistente detectados por ELISA, aún cuando el ensayo de AL retorne a la normalidad. Ishii y colaboradores¹¹⁵ analizaron un grupo de pacientes con LEG e identificaron dos subgrupos: uno que mostró persistentemente títulos altos de aFL y otros con incrementos eventuales pero generalmente con títulos bajos (normales) de los aFL. El subgrupo con aFL persistentemente altos presentan las manifestaciones clínicas asociadas al SaF, sin variación en los títulos del anticuerpo con la actividad de la enfermedad y una baja frecuencia de nefritis lúpica. El subgrupo con títulos intermitentemente altos presenta sólo algunos síntomas del SaF, los títulos de los anticuerpos aumentan con los periodos de exacerbación de la enfermedad y tienen una alta frecuencia de nefritis lúpica.

4.6.9 EPITOPES RECONOCIDOS POR LOS aFL

Los aCL tienen una amplia reactividad cruzada contra otros fosfolípidos de carga negativa¹¹⁶. Esto es verdad particularmente en anticuerpos de clase IgG de pacientes con LEG, en tanto que, los anticuerpos de clase IgG de pacientes con sífilis, los de clase IgM de pacientes con LEG, SaFP y sífilis reconocen además FL zwitteriónicos^{73, 117, 118}. En algunos pacientes se han reportado aFL que reconocen fosfatidilanolamina (FTE), estos anticuerpos no muestran reactividad cruzada contra cardiolipina, por lo que se ha propuesto que el reconocimiento es específicamente de la *Liso*FTE, un producto de degradación de la FTE que tiene reactividad cruzada parcial con CL¹¹⁹. El reconocimiento específico de la FTE es importante debido a que los anticuerpos que reaccionan contra este FL lo hacen cuando se encuentra en fase hexagonal II (que es una conformación espacial diferente a la que forma la capa lipídica), no existiendo reconocimiento del FL en la fase lamelar¹²⁰. Los fosfolípidos *in vivo* se disponen en fase lamelar (bicapa). Con ello se puede pensar que al tomar una conformación no usual los FL pueden ser antigénicos, lo que desencadena la respuesta inmune contra ellos.

Un estudio interesante en ratones realizado recientemente por Rauch y Janoff¹²¹, mostró que la FTE en fase hexagonal es más inmunogénica que en fase lamelar en ausencia de adyuvantes. Los aFL resultantes de esta inmunización fueron fuertemente reactivos contra FTE, mostraron reactividad cruzada contra cardiolipina y tuvieron actividad funcional de AL. Otro punto importante relacionado con el epítipo involucrado en la reactividad de los aFL es la cabeza polar de los FL, que confiere la especificidad de algunos anticuerpos. Esta especificidad también se ve afectada por la cadena de ácidos grasos. El reconocimiento de dicha cadena depende del tamaño de ésta¹¹⁷. La importancia de la cabeza polar de los FL se ha observado tanto en anticuerpos derivados de pacientes con sífilis como en aquellos derivados de pacientes con LEG¹²². Por otro lado existe el reporte de un estudio en el que se encontró que la unión de los aFL es dependiente de la cadena de ácidos grasos y requiere de cadenas de 14 átomos de carbono como mínimo¹²³.

De acuerdo a los estudios reportados por Pengo y colaboradores¹²⁴, es muy probable que no todos los anticoagulantes "Lúpicos" circulantes sean el mismo aFL. En un estudio en el que se fraccionó el plasma de dos pacientes con títulos altos tanto de aFL como de AL se encontró, que cada una de las actividades se localizaron en fracciones diferentes¹²⁵. Valesini y colaboradores aislaron anticuerpos aCL y encontraron que estos prolongaban el tiempo parcial de tromboplastina activada de forma dosis-dependiente¹²⁶. En otro estudio se encontró que 15 sueros con AL positivo tuvieron aFTE y fueron inhibidos en el reconocimiento de éste FL con tromboplastina. Sin embargo, la mayoría mostró reactividad cruzada con CL¹²⁷.

Se ha observado que la reactividad cruzada es principalmente entre FL cargados negativamente y el DNACs pudiendo extenderse al reconocimiento de plaquetas y células endoteliales^{128, 129}.

Por otro lado, en 1990 se postuló la aparente importancia de la β_2 glicoproteína-I (β_2 GP-I) para la detección de los aFL *in vitro*. Tres grupos en forma simultánea reportaron que los aFL purificados de sueros de pacientes con SaF reaccionaban con fosfolípidos de carga negativa en presencia de la β_2 GP-I sin mostrar reactividad contra fosfolípidos aniónicos solos ni contra β_2 GP-I sola en el ensayo de ELISA¹³⁰⁻¹³². Aparentemente los aFL reconocen un epítipo del complejo formado entre la β_2 GP-I y fosfolípidos de carga negativa, dicho complejo, se propuso que podría funcionar como un modelo de acarreador-hapteno¹³³.

En diversos trabajos se ha reportado que los aFL de los pacientes con enfermedades autoinmunes como LEG y SaFP reconocen a los fosfolípidos aniónicos sólo

si está presente la β_2 GP-I¹³⁴⁻¹³⁶ y que los aFL de los pacientes con enfermedades infecciosas, como la sífilis, tienen mayor reactividad contra la CL sola, e inclusive al estar presente la β_2 GP-I en el ELISA la reactividad de los aFL no se modifica o disminuye, probablemente por competencia con los fosfolípidos.

La diferencia en el requerimiento de la β_2 GP-I entre los aFL de los pacientes con enfermedades autoinmunes y los aFL de pacientes con enfermedades infecciosas permitió a Matsuura y colaboradores¹³⁷ clasificar a los aFL en dos grupos: los aFL autoinmunes que requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*, se encuentran presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes y se asocian a ciertas manifestaciones clínicas como trombosis, trombocitopenia, pérdida fetal recurrente, etc. El segundo grupo, el de los aFL no autoinmunes, no requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*, se encuentran presentes en pacientes con infecciones como sífilis y no se asocian a manifestaciones clínicas. Según lo anterior, los aFL autoinmunes están reconociendo el complejo β_2 GP-I-FL y los no autoinmunes reconocen al FL propiamente dicho^{134, 138}.

Recientemente Viard y colaboradores¹³⁹ publicaron que los pacientes con LEG con manifestaciones trombóticas, tienen anticuerpos de clase IgG dirigidos contra la β_2 GP-I. Hallazgo que fue confirmado por Arviux y colaboradores¹⁴⁰ y por Shoenfeld y colaboradores¹⁴¹. La β_2 GP-I es un anticoagulante natural que inhibe la vía intrínseca de la cascada de la coagulación y la actividad de protrombinasa de las plaquetas humanas^{142, 143}, funciones que ubican a la β_2 GP-I como un potente inductor de procesos trombóticos¹⁴⁴, en el caso de ser blanco de autoanticuerpos. En 1995 Cabral y colaboradores¹⁴⁵ estudiaron un grupo de pacientes con SaFP y encontraron que el 86% tuvieron a β_2 GP-I de clase IgG, sus estudios de inhibición con micelas de CL mostraron que los a β_2 GP-I y los aCL son autoanticuerpos diferentes que pueden estar en forma simultánea en pacientes con SaFP.

Los pacientes con LEG pueden tener además las manifestaciones clínicas del SaF¹¹¹. La presencia de aFL en estos pacientes se asocia a manifestaciones hemocitopénicas y vasculares^{54, 146}, sin embargo, existe un grupo de pacientes con LEG que tienen SaF pero sin aFL séricos¹⁴⁶. En 1995 Cabiedes y colaboradores¹⁴⁷ estudiaron un grupo de pacientes con LEG y SaF con y sin aFL séricos y encontraron que las manifestaciones clínicas del SaF se asocian con mayor fuerza a la presencia de a β_2 GP-I que a la presencia de aFL. Aparentemente la generación de procesos trombóticos asociada a la presencia de aFL en enfermedades autoinmunes, se debe a aFL y/o a β_2 GP-I que reconocen a la β_2 GP-I nativa o modificada por FL de carga negativa.

Lo anterior sugiere que los anticuerpos dirigidos contra los fosfolípidos propiamente dichos son anticuerpos cuyo origen fue un proceso infeccioso, o bien que son anticuerpos naturales que reconocen FL aniónicos y/o neutros.

4.6.10 HETEROGENEIDAD FUNCIONAL E INMUNOQUIMICA DE LOS aFL

La mayoría de los aCL tiene reactividad cruzada con otros FL aniónicos, sin embargo, sólo algunos reconocen también FL zwitteriónicos. Esta reactividad puede estar relacionada con el isotipo del anticuerpo, de ésta manera tenemos que anticuerpos contra FL aniónicos pueden ser de clase IgG o IgM en tanto que anticuerpos contra FL zwitteriónicos son con mayor frecuencia IgM. En la tabla 6 se muestra la clasificación de los FL de acuerdo a su carga y al isotipo de los anticuerpos reactivos contra cada uno de ellos.

Tabla 6
Carga de los fosfolípidos e isotipo de los anticuerpos anti-fosfolípidos

Fosfolípidos	Isotipo
Aniónicos	
Cardiolipina (CL)	IgG, IgM
Fosfatidilserina (FTS)	IgG, IgM
Fosfatidilinositol (FTI)	IgG, IgM
Zwitteriónicos	
Fosfatidilcolina (FTC)	IgM
Fosfatidiletanolamina (FTE)	IgG, IgM
Esfingomielina (EM)	IgG, IgM

Tomada de la referencia número 148

Como se mencionó, los aCL requieren de la β_2 GP-I para ser detectados en el ELISA. Esta regla se cumple para los aCL presentes en el suero de los pacientes con LEG y en el suero de los pacientes con SaFP, lo que sugiere, que el requerimiento de la β_2 GP-I. El requerimiento del cofactor no necesariamente en un fenómeno de todo o nada. Algunos sujetos pueden tener aCL detectables en ausencia del cofactor y con la adición de β_2 GP-I el reconocimiento del anticuerpo puede incrementarse¹⁴⁹. De ésta manera, en la mezcla policlonal de aFLs presentes en un suero, pueden existir cuatro tipos de anticuerpos, aquellos que requieren del cofactor para reconocer a los FL aniónicos, aquellos que en presencia del cofactor se incrementa su reconocimiento, aquellos que no requieren del cofactor para reconocer al fosfolípido y aquellos que reconocen al fosfolípido propiamente dicho.

Existen aFL tanto de clase IgG como de clase IgM que pueden ser detectados porque producen prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTa), sin corregir con la adición de plasma normal. Esto indica, que está presente un inhibidor (AL) más que una deficiencia de factores de la coagulación. Algunos de los AL tienen reactividad cruzada contra CL en el ELISA. Por otro lado, también se han reportado sueros en los que existe tanto el AL como los aCL, que no muestran reactividad cruzada entre si. Bevers y colaboradores demostraron que algunos aFL de clase IgG requieren de protrombina más que de β_2 GP-I como cofactor para reaccionar con FL¹⁵⁰. Se desconoce aún si los aFL de clase IgM con actividad AL requieren o no de la protrombina como cofactor.

Los anticuerpos contra FL zwitteriónicos son principalmente y en algunas instancias, exclusivamente de clase IgM^{73, 149}. Tal es el caso de los anticuerpos reportados contra FTC que son todos de clase IgM¹⁴⁹. La reactividad cruzada que muestran estos anticuerpos con CL fué lo que permitió su detección.

En experimentos realizados por Reininger y colaboradores en los que se inocularon ratones irradiados, con células B de ratones NZB de diferentes edades, se encontró que las células provenientes de ratones viejos producen más anticuerpos contra ERBr, éste fenómeno coincide con el desarrollo de anemia hemolítica que lleva a la muerte a los ratones receptores¹⁵¹. Por lo tanto, los autoanticuerpos naturales pueden ser patogénicos

tanto en ratones como en el hombre. Recientemente se ha identificado un grupo de pacientes con una variante del SaF que se manifiesta principalmente por el desarrollo de anemia hemolítica¹⁵² y la presencia de aFTC, esta manifestación se ha identificado también en pacientes con SaFP¹⁴⁹ y en pacientes con LEG¹⁵³.

Alarcón-Segovia y Cabral propusieron una clasificación de los aFL, que ayuda a describir a los nuevos aFL y permite caracterizar mejor a los ya conocidos (tabla 7).

TABLA 7
Clasificación de los aFL

-
- I. aFL reactivos contra fosfolípidos aniónicos**
 - A. Reconocen CL en el ELISA (aCL)
 - 1.- Requieren de β_2 GP-I como cofactor
 - 2.- No requieren de β_2 GP-I como cofactor
 - B. Con actividad AL
 - 1.- Requieren de trombina como cofactor
 - 2.- No requieren de trombina como cofactor
 - C. Reconocen CL por ELISA y tienen actividad de AL

 - II. aFL reactivos contra fosfolípidos zwitteriónicos**
 - A. Reactivos contra FTC en el ELISA y de eritrocitos tratados con bromelina (EBr).
 - 1.- Con reactividad cruzada contra CL en el ELISA
 - 2.- Sin reactividad cruzada contra CL en el ELISA
 - B. Reactivos contra otros fosfolípidos zwitteriónicos

 - III. aFL escondidos (aCLE)**

 - IV. aFL reactivos contra otras proteínas plasmáticas**
 - A. Reactivos contra proteína S unida a FL
 - B. Reactivos contra proteína C activada unida a FL.
-

Tomado de la referencia número 148

La clasificación se apoya en los siguientes puntos: 1) los aFL's más que un simple anticuerpo constituyen una familia de autoanticuerpos; 2) un aFL puede tener reactividad cruzada con otros fosfolípidos, así como con otros antígenos (v.g. DNA, vimentina, etc.); 3) en el suero de un paciente puede haber una mezcla de varios tipos de aFL con características Inmunoquímicas y propiedades biológicas diferentes; 4) algunos aFL pueden ser autoanticuerpos codificados por genes de línea germinal, en tanto que otros pueden ser dirigidos por antígeno y sufrir mutaciones o hipermutaciones somáticas; y 5) aun cuando sean codificados por genes de línea germinal contra un sólo FL puede haber heterogeneidad de reconocimiento debida a la participación de diversos genes que codifican para los fragmentos que constituyen los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de los aFL.

4.6.11 ANTICUERPOS ANTI-CARDIOLIPINA ESCONDIDOS (aCLE)

En 1989 Cheng y colaboradores¹⁵⁴ comunicaron que el calentamiento de sueros humanos normales (SHN), de pacientes con LEG y de pacientes con sífilis, a 56°C durante 30 minutos descubre anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) que previamente no eran detectables. La actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor se inhibe con liposomas de cardiolipina y se abate al depletar los sueros de la fracción IgG al pasarlos por columna de proteína A (Prot-A). El incremento de los títulos de aCL detectados por ensayo inmunoenzimático ELISA es evidente tanto en el suero de individuos sanos como de pacientes con LEG y sífilis. Los datos presentados en el reporte sugieren la presencia de un factor sérico termolábil que impide, en condiciones normales, la detección de los aCL por ELISA¹⁵⁴.

Los sueros que han sido analizados para VDRL, -técnica que utiliza la inactivación con calor-, no muestra una alta frecuencia de positividad, lo cual sugiere que la potenciación por calor de los anticuerpos que reconocen CL pura en el ELISA son una población diferente de aFL de la que reconoce la mezcla de CL, FTC y colesterol en el VDRL. Las diferencias antigénicas entre la CL inmovilizada en las placas de ELISA y la CL del antígeno VDRL habían sido ya reportadas por Harris¹⁵⁵ y colaboradores en 1988 para los aCL "nativos".

El fenómeno de potenciación de la actividad aCL ocurre dentro de límites muy estrechos de temperatura, entre los 45 y 60 °C^{156, 157}. Temperaturas menores no liberan al anticuerpo y temperaturas mayores parecen desnaturalizarlo de manera irreversible, pues pierde su capacidad de reconocer a la CL en las placas de ELISA. Cuando se mantiene constante la temperatura a 56°C y se varía el tiempo de incubación, se observa un incremento rápido de los niveles de aCL de isotipo IgG (aCL-IgG) e IgM (aCL-IgM) a los 30 minutos, fenómeno que se mantienen por dos horas aproximadamente¹⁵⁷. En este tiempo se alcanza el máximo de liberación de los aCLE y posteriormente comienza el descenso, posiblemente porque el anticuerpo se desnaturaliza.

Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que existen aFTC a títulos bajos, con reactividad cruzada con CL en el suero de sujetos clínicamente sanos¹⁵⁸. Estos anticuerpos son exclusivamente de isotipo IgM y tienen una importante polirreactividad cruzada con estructuras como DNACd, DNACs, vimentina, ácido fosfatídico (AF) y fosforicolina (FRC). Además, son inhibidos con gamaglobulina agregada (GGA) y reconocen eritrocitos humanos y de ratón tratados con bromelina. Las características de los aFTC sugieren que pertenecen a la familia de los autoanticuerpos naturales.

La des-regulación inmune trae como consecuencia una producción exagerada de autoanticuerpos, incluyendo aFL, que puede ser cardinal en pacientes con LEG⁸⁵. En pacientes con SaFP puede también ocurrir una des-regulación inmune que al parecer es diferente a la que ocurre en pacientes con LEG u otras enfermedades autoinmunes, pues da origen a la producción exagerada de autoanticuerpos de una sola familia, la de los aFL.

Recientemente Cabral y colaboradores publicaron el caso de un paciente con anemia hemolítica autoinmune que presentó títulos altos de aFTC de clase IgM con reactividad cruzada con CL¹⁵⁹. Los aFL eluidos de los eritrocitos del paciente al momento de hemólisis activa reconocieron CL y FTC por ELISA y se unieron a ERBr, así como a eritrocitos almacenados. Los aCLE también reconocen eritrocitos bromelinizados o envejecidos por almacenamiento¹⁵⁹ y eritrocitos de camero¹⁶⁰. En el trabajo de Hasselaar y colaboradores¹⁵⁷ los aCLE estudiados no mostraron reactividad cruzada con DNACd, sin embargo, no se probó ningún otro antígeno. Se desconoce si estos anticuerpos reconocen otras moléculas como DNACs, FRC o vimentina.

Hasta la fecha se han descrito dos categorías de aFL presentes en sujetos clínicamente sanos, una de ellas, la más estudiada es la de los autoanticuerpos que reconocen FTC, que como ya se mencionó son exclusivamente de isotipo IgM, se encuentran a bajas concentraciones, son polirreactivos y no requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*. Su capacidad hemolítica sugiere que participan en la depuración de eritrocitos envejecidos o que han sufrido algún daño en su integridad. La otra categoría de aFL es la de los aCLE que se detectan sólo después del tratamiento de sueros humanos normales a 56 °C durante 30 minutos. Se desconoce aún, la naturaleza del inhibidor termolábil que los oculta y las características de los anticuerpos que componen esta familia de aFL.

5. HIPOTESIS

Los anticuerpos anti-cardiolipina escondidos son autoanticuerpos que reconocen fosfolípidos tanto de carga negativa como neutros y no tienen reactividad cruzada con otras moléculas (DNAcd, DNACs, vimentina, etc.), por lo que el factor termolábil que oculta su actividad debe ser de naturaleza fosfolipídica.

6. OBJETIVOS

1. Estudiar la frecuencia de los aCLE en una población clínicamente sana de México.
2. Determinar el isotipo de los aCLE en la población sana.
3. Determinar si los aCLE se encuentran presentes en sujetos con enfermedades autoinmunes (LEG y SaFP) e infecciosas (sífilis).
4. Determinar los requerimientos del β_2 glicoproteína-I de los aCLE.
5. Determinar si los aCLE reconocen otros fosfolípidos (de carga negativa: FTS, FTI, FTE, AF o de carga neutra: FTC, FTG) u otros antígenos (DNAcd, DNACs, vimentina o GGA).
6. Identificar el posible papel como anticoagulante circulante de los aCLE.
7. Aislar y purificar los aCLE.
8. Identificar la naturaleza fisicoquímica del factor termolábil que oculta a los aCLE de sujetos sanos.
9. Determinar si los aCLE cruzan la barrera filogenética de mediante su estudio en los ratones normales (Balb/c) y en los autoinmunes (NZB).

7. SUJETOS DE ESTUDIO

Se estudiaron 100 sueros de individuos sanos (SHN), 50 de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG; 25 con manifestaciones clínicas y serológicas de SAF y 25 sin manifestaciones), 22 sueros de pacientes con síndrome de anti-fosfolípidos primario (SaFP) y 25 de pacientes con sífilis de acuerdo a las siguientes definiciones:

INDIVIDUOS SANOS. Sujetos clínicamente sanos de ambos sexos entre 18 y 60 años de edad en cuyos sueros los exámenes de laboratorio para sífilis, hepatitis B y VIH fueron negativos.

PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO. Individuos que reunieron los criterios propuestos por el Colegio Americano de Reumatología¹⁶¹ y los criterios propuestos por Alarcón-Segovia y colaboradores para la clasificación de pacientes con síndrome de anti-fosfolípidos asociado a lupus eritematoso generalizado¹⁴⁶.

PACIENTES CON SÍNDROME DE ANTI-FOSFOLÍPIDO PRIMARIO. Individuos que reunieron los criterios de clasificación propuestos por Alarcón-Segovia y colaboradores¹⁶².

PACIENTES CON SÍFILIS. Individuos con datos clínicos de la enfermedad, VDRL y FTA positivo, sin datos clínicos de otra infección o enfermedad concomitante.

Para la búsqueda del fenómeno en ratones normales y autoinmunes se estudiaron 20 sueros de dos cepas murinas: 10 de ratones autoinmunes *NZB* y 10 de ratones normales *Balb/c*.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Liberación de los aCLE por calentamiento. De 50 a 500 μ l de suero (sin tratar o adsorbido con micles de fosfolipido) se depositaron en tubos eppendorf de 700 μ l, se sellaron con papel sera (Parafilm) y se pusieron en baño maría a 56 °C durante 30 minutos. Al terminar el tratamiento se dejaron a TA hasta que se enfriaron. Cuando no se usaron inmediatamente se guardaron a 4 °C (no más de 2 días). La pérdida de volumen por evaporación se midió depositando una alícuota de 100 μ l de sueros sin tratar en dos tubo eppendorf, uno de ellos se dejó a TA por 30 minutos y el otro se metió en un baño maría a 56 °C y se incubó por 30 minutos. Al terminar la incubación se dejó que los sueros tratados a 56 °C se enfriaran a TA y se midió el volumen en ambos tubos.

8.2 ELISA estándar y modificado para la detección de aFL. Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Inc, Danemark 97F 4-39454) con 50 ml de FL (AF, CL, FRC, FTC, FTE, FTG, FTI y FTS; SIGMA Chemicals Co, St Louis MO.) a una concentración de 50 mg/ml, disueltos en alcohol etílico (J. T. Baker). El etanol se evaporó con nitrógeno gas durante 30 minutos aproximadamente, cambiando de posición la placa para que el nitrógeno cayera directamente sobre los pozos. Una vez que se evaporó el etanol, se bloquearon los sitios inespecíficos con 350 μ l de una solución al 10% de suero bovino fetal (SBF, SIGMA ensayo estandar) o con 350 μ l de una solución al 1.5 % de albumina sérica bovina (ASB, SIGMA ensayo modificado) en PBS (NaCl 0.15M, Na₂HPO₄ 0.01M, KH₂PO₄ 0.01M pH 7.4) por 2 horas a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces por tres minutos cada lavado, se secaron invirtiéndolas y golpeándolas contra una superficie absorbente y se guardaron toda la noche a 4 °C. Las diluciones de los sueros (1:100) se hicieron en SBF al 10% (ensayo estándar) o en ASB al 1.5 % (ensayo modificado) y se congelaron toda la noche. A la mañana siguiente las diluciones de las muestras se descongelaron a TA y las placas se pusieron a TA 15 minutos antes de empezar el ensayo. Se aplicaron 200 μ l de cada muestra por duplicado en los pozos de las placas sensibilizadas. La aplicación de las muestras se hizo en el menor tiempo posible ya que la incubación empieza al aplicar la primera muestra. Las placas con las muestras se incubaron por una hora a TA y posteriormente se lavaron 3 veces como se mencionó anteriormente. El anticuerpo anti-humano conjugado con la enzima fosfatasa alcalina específico contra IgG o IgM (anticuerpo anti-cadenas γ o μ humanas de SIGMA) se diluyó 1:10 000 en SBF al 10% (ensayo estándar) o en ASB 1.5% (ensayo modificado). Los títulos del anticuerpo marcado se monitorizaron periódicamente. Las placas con el conjugado se incubaron por una hora a TA. Transcurrida la incubación se hicieron 3 lavados como se mencionó y se agregaron 200 μ l por pozo del sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato, SIGMA) a una de concentración de 1mg/ml disuelto en solución amortiguadora de dietanolamina (J. T. Baker) al 10% y 0.0005 M de MgCl₂ (J.T. baker) pH 9.8. Las placas con el sustrato se incubaron a 37°C una hora en la oscuridad y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en lector de microELISA (Labsystems Multiskan MS type 352).

Para la detección de los aFL en los sueros de ratón se siguió la misma metodología, pero se diluyeron los sueros 1:10 en los amortiguadores mencionados, se aplicaron a los pozos de las placas sensibilizadas 100 μ l los componentes (sueros diluidos, conjugados, y sustrato de la enzima) y se sustituyeron los anticuerpos conjugados anti-humano por anticuerpos anti-ratón (específicos contra cadenas γ y μ de ratón conjugados con fosfatasa alcalina, SIGMA) diluidos 1:1000 en los amortiguadores mencionados. El ensayo en general se corrió de la manera antes mencionada.

8.3 ELISA para detectar actividad anti-DNA. Los anticuerpos contra DNA se midieron de acuerdo a la técnica reportada por Koike¹⁶³ con algunas modificaciones. Se sensibilizaron placas de polipropileno de 96 pozos (Nunc) con 100 µl de albúmina sérica bovina metilada (ASB-M) (SIGMA) a una concentración de 0.1% en PBS, las placas se incubaron durante 2 horas a TA. Transcurrida la incubación se descartó la solución de ASB-M y se adicionaron 50 µl de DNA nativo o desnaturalizado (DNA de timo de ternera, SIGMA) a una concentración de 10 mg/ml en PBS que contenía EDTA 1mM (PBS-EDTA) y se incubó por una hora a TA. El DNA se obtuvo calentando el DNA de timo de ternera a 100 °C por 10 minutos. Después de tres lavados con PBS-EDTA se adicionaron 300 µl por pozo de ASB al 1.5 % en PBS-EDTA (PBS-EDTA-ASB) para bloquear los sitios inespecíficos y se incubaron las placas durante una hora a TA. Posteriormente se lavaron las placas 5 veces con aproximadamente 300 µl de PBS-EDTA que contenía 0.05% de Tween 20 (BIO-RAD). Las muestras se diluyeron 1:100 en PBS-EDTA-ASB, en cada placa se incluyó una curva de diluciones seriadas del suero de un paciente con LEG con títulos altos de anticuerpos anti-DNA medidos por la técnica de Farr (RIA). A cada pozo y por duplicado se adicionaron 100 µl de la dilución y se incubó una hora a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBS-EDTA-Tween las placas se secaron mediante golpeteo contra una superficie absorbente. Se adicionaron 100 µl/pozo del segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina (específico de cadenas γ o μ , SIGMA) disuelto en PBS-EDTA-ASB a una concentración de 1:10 000 y se incubaron las placas nuevamente una hora a TA. Se lavaron nuevamente las placas 5 veces con 300 µl de PBS-EDTA-Tween y se secaron como se mencionó anteriormente. Por último se adicionaron 100 µl/pozo del sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato, SIGMA) disuelto en amortiguador de dietanolamina (dietanolamina 10%, MgCl₂ 0.0005M pH 9.8) y se incubaron a 37°C por una hora a TA. Se adicionaron 50 µl de una solución de NaOH 3N para detener la reacción y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microELISA (Labsystems Multiskan MS type 352).

8.4 ELISA para detectar la actividad de factor reumatoide (FR). Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc) con 100 µl/pozo de una solución de IgG (SIGMA) cuya concentración era de 10.8 µg/ml y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavaron las placas tres veces con aproximadamente 300 µl de albúmina sérica bovina (SIGMA) al 1.5 % y Tween-20 (BIO-RAD) al 0.05% (PBS-ASB-Tween), en cada lavado se agitaron las placas uno o dos minutos para eliminar perfectamente el material que no se adhirió. Los sueros se diluyeron 1:100 en PBS-ASB-Tween. 100 µl/pozo de las diluciones de los sueros se adicionaron en la placa por duplicado. Como control del ensayo se incluyó una curva dosis-respuesta de un suero con FR(+) detectado por nefelometría, a las siguientes diluciones: 1:5120, 1:10240, 1:20480, 1:40960, 1:81920 y 1:163840. Las placas con las muestras se incubaron por dos horas a TA. Después de la incubación las placas se lavaron tres veces como se mencionó anteriormente. Se adicionaron 100 µl del anticuerpo anti-humano conjugado con fosfatasa alcalina (específico contra la cadena μ o γ humana, SIGMA), a una dilución de 1:10 000 en PBS-ASB al 0.5%. Las placas con el segundo anticuerpo se incubaron por una hora a TA. Posteriormente se hicieron tres lavados con 300 µl de PBS-ASB-Tween agitando durante cada lavado dos minutos. Por último se adicionaron 100 µl/pozo del sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato, SIGMA) disuelto en amortiguador de dietanolamina (dietanolamina 10%, MgCl₂ 0.0005M pH 9.8) y se incubaron a 37°C por una hora a TA. Se adicionaron 50 µl de una solución de NaOH 3N para detener la reacción y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en lector de microELISA (Labsystems Multiskan MS type 352).

8.5 Adsorción de los sueros con mFL. Las micelas de los fosfolípidos (FL) se prepararon de acuerdo a la técnica descrita por Cabral y colaboradores⁷³. Dos mg de FL (SIGMA) disueltos en etanol (o el solvente orgánico en el que se encontraban) se depositaron en un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml y se evaporó el solvente con nitrógeno líquido. En el caso de los extractos clorofomo-metanólicos, estos se depositaron en tubos eppendorf, se evaporó el solvente y se siguió la misma metodología que para los FL comerciales. Los FL se resuspendieron en 1 ml de PBS-SBF al 10% que contenía 1.0 μ l de Tween 20, se depositaron en un tubo de polipropileno (12 X 75, ELKAY) y se homogeneizaron 15 minutos (en un homogeneizador automático, Vortex). La suspensión se centrifugó a 5000 g por 15 minutos a 4°C y se homogeneizó nuevamente 15 minutos. La suspensión de micelas de FL se usó inmediatamente después de su preparación. 100 μ l de la suspensión de micelas se depositaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 5000 g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 μ l de los sueros, la mezcla se homogenizó suavemente y se incubó media hora a TA, posteriormente se centrifugó a 5000 g y se recuperó el sobrenadante (suero adsorbido) que se depositó en otro tubo eppendorf que contenía micelas del FL. La operación se repitió de 10 a 15 veces por suero. Los sueros depletados de aFL se pasaron a tubos eppendorf nuevos y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

8.6 Purificación de la fracción IgG (IgG1, IgG2 e IgG4) de sueros humanos y murinos (columna de proteína-A). De 500 a 1 000 μ l de suero tratado a 56 °C durante 30 minutos, se pasaron por una columna de Proteína-A sefarosa (*S. aureus*) recirculando la muestra por la columna durante una hora mediante una bomba peristáltica. Posteriormente se lavó la columna con PBS 1X (4 veces el volumen de cama) (efluído). La fracción IgG (eluido) se recuperó de la columna lavando esta con glicina 0.5 M pH 3 (SIGMA) y se recibió en 2.5 ml de boratos 4X (JT Baker). La recolección de las fracciones se monitorizó mediante un detector de UV (LKB BROMMA modelo 2210). El eluido se dializó contra 4 litros de PBS 1X por 72 horas con dos cambios de solución de diálisis. Al terminar la diálisis ambas fracciones se concentraron por filtración (aparato de concentración por filtración AMICON, modelo 8010) con una membrana de 1200 Kd. Ya concentradas las fracciones se les determinó proteínas por el método de Lowry¹⁶⁴ y por PAGE-SDS^{165, 166}. Ambas fracciones se guardaron a 4 °C (menos de 3 días).

8.7 Depleción de los sueros humanos y del suero bovino de β_2 GP-I. Las muestras (de 200 a 300 μ l de suero humano o 10 ml de suero de bovino) se pasaron por una columna de heparina-agarosa (SIGMA) recirculando la muestra por la columna durante una hora mediante una bomba peristáltica. Posteriormente se lavó la columna con PBS 0.5 X (4 veces el volumen de cama) (efluído). La β_2 GP-I se eluyó de la columna con PBS 1M NaCl pH 7.2-7.4. El eluido se dializó contra 4 litros de PBS 0.5X por 72 horas con dos cambios de solución de diálisis. Al terminar la diálisis ambas fracciones se concentraron por filtración (aparato de concentración por filtración AMICON, modelo 8010) con una membrana de 1200 Kd. Ya concentradas las fracciones se les determinó proteínas por el método de Lowry¹⁶⁴ y por PAGE-SDS^{165, 166}. La presencia o ausencia de la proteína se determinó por inmunopunto (IP) y por electroinmunotransferencia (EIT) con un anticuerpo comercial específico a β_2 GP-I humana (Behring werke Akettiengesellschaft, Ingelheim).

8.8 Separación de las subpoblaciones de aCL de los pacientes con SaFP. Los aCL no escondidos o "nativos" de los pacientes con SaFP se purificaron de acuerdo al siguiente esquema: primero se inhibieron los sueros con mCL que contenían β_2 GP-I (100 μ g/ml). Los aCL se eluyeron de las mCL con 500 μ l de glicina 0.5M pH 3.0 (SIGMA) y se centrifugaron a 5000 g. El

sobrenadante se recuperó y se dializó por 72 horas contra cuatro volúmenes PBS 1X. Esta fracción, contenía aCL y β_2 GP-I. La β_2 GP-I se eliminó de la fracción pasándola por una columna de heparina-agarosa (ver el punto 8.7 depleción de los sueros humanos y del suero bovino de β_2 GP-I). El eluido de esta columna contenía aCL tanto dependientes como independientes de la β_2 GP-I, pero no β_2 GP-I. La separación de los aCL dependientes de los independientes de la β_2 GP-I de la fracción anterior se hizo adsorbiéndola nuevamente con mCL en ausencia de β_2 GP-I. El sobrenadante de las micelas contenía los aCL dependientes de la β_2 GP-I y el eluido de las micelas contenía los aCL independientes de la β_2 GP-I.

Los aCLE se purificaron de la siguiente manera: una vez depletados los sueros de los pacientes con SaFP de los aCL no escondidos, se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y se pasaron por una columna de proteína-A sefarosa (ver el punto 8.6 Purificación de la fracción IgG [IgG1, IgG2 e IgG4] de sueros humanos y murinos). La fracción IgG eluida, dializada y concentrada se adsorbió con mCL en ausencia de β_2 GP-I. Las mCL se centrifugaron y del sobrenadante se recuperaron los aCL dependientes de β_2 GP-I. Los aCL independientes de la β_2 GP-I se eluyeron de las mCL con 500 μ l de glicina 0.5M pH 3.0 (SIGMA) y se centrifugaron a 5000 g, esta fracción se dializó y concentró hasta aproximadamente 500 μ l. Ya purificados los aCL independientes y dependientes, y los aCLE dependientes e independientes de la β_2 GP-I se caracterizaron las cuatro subpoblaciones en función de los requerimientos del cofactor.

8.9 Electroinmunotransferencia (EIT). Para la determinación de la presencia o ausencia de β_2 GP-I en los sueros humanos, en el suero bovino, y para caracterizar la pureza de la β_2 GP-I purificada humana, se corrieron geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10% con la técnica descrita por Laemli¹⁶⁵. Las concentraciones de los amortiguadores tanto de corrimiento como de transferencia se hicieron como lo indica el fabricante del equipo de electroforesis y electrotransferencia (BIO RAD).

Soluciones:

A. Solución de acrilamida.- Acrilamida (BIO RAD Laboratories Richmond CA.) 29.1% peso/volumen (P/V), NN'-Metilenbis-acrilamida (BIO RAD) 0.9% (P/V). Guardada en botella ámbar y a 4°C dura 2 semanas.

B. Amortiguador de Tris-HCl pH 8.8.- Tris-HCl (SIGMA) 1.875 M pH 8.8. A 4°C dura 4 semanas.

C. Amortiguador de Tris-HCl pH 6.8.- Tris-HCl (SIGMA) 1.25 M pH 6.8. a 4°C dura 4 semanas.

D. Solución de SDS.- Dodecil sulfato de sodio (SDS, BIO RAD) al 10% P/V en agua destilada desionizada (H_2O_{DD}). A Temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) dura 4 meses.

E. Solución de persulfato de amonio.- Persulfato de amonio (BIO RAD) al 10% en H_2O_{DD} . Preparar fresco.

F. Amortiguador de tanque Tris-Glicina 10X.- Glicina (SIGMA) 14.42%, Trizma Base (SIGMA) 3.03% y SDS al 1.0% en H_2O_{DD} . A temperatura ambiente la solución dura 2 meses. Para usarse se diluyó uno a diez en H_2O_{DD} .

G. Amortiguador de muestra.- Tris-HCl (SIGMA) 1.25 M pH 6.8, SDS (SIGMA) 1.0%, β -Mercapto-etanol (SIGMA) 5% V/V, Glicerol (J.T. Baker) 11.6% V/V, azul de bromofenol (SIGMA) 0.01%

El gel separador al 10% de acrilamida se preparó de acuerdo a la siguiente formulación: 5 ml de solución A, 6.8 ml de H_2O_{DD} y 3 ml de solución B. La mezcla se degasificó poniéndola en un matraz Kitasato y sometiéndola a vacío por 15 minutos. Se adicionaron 150 ml de solución D y 7.5 ml de TEMED (BIO RAD). Finalmente se adicionaron 50 ml de la solución E.

Se homogeneizó cuidadosamente y se aplicó al aparato de electroforesis. Sobre el gel separador se adicionaron 5 ml (aproximadamente) de 1-butanol (J.T. Baker) y se dejó gelificar por 45 minutos a TA.

El 1-butanol se decantó y se enjuagó el gel 3 veces con 5 ml de H_2O_{DD} . El gel concentrador se preparó de acuerdo a la siguiente formulación: 800 ml de solución A, 3.6 ml de H_2O_{DD} y 500 ml de solución C. Se degasificó la solución como se mencionó anteriormente y se le agregó 50 ml de solución D, 5 ml de TEMED y 17 ml de solución E. Se homogenizó cuidadosamente y se aplicó sobre el gel separador. Inmediatamente después se colocó el peine (plantilla para carriles) y se dejó gelificar por 45 minutos. Se retiró el peine y se lavó tres veces con 5 ml de H_2O_{DD} .

La preparación de las muestras y de los marcadores de peso molecular (marcadores de peso molecular bajo y alto, BIO RAD) se hizo de la siguiente manera: se mezclaron 0.1 mg de muestra en 1 ml de solución G, se homogeneizaron perfectamente y se incubaron a 37 °C por 15 minutos. Las muestras se pusieron en agua hirviendo por 5 minutos y se enfriaron a TA. Se centrifugaron 2 minutos a 3500 g y se aplicaron en los carriles de corrimiento del gel concentrador. Los parámetros de corrimiento fueron los siguientes 20 miliampers, 200 volts y 2 watts. El tiempo de corrimiento fue de aproximadamente dos horas.

Al finalizar el corrimiento el gel se retiró del aparato de electroforesis y se depositó en un recipiente que contenía 35 ml de amortiguador de transferencia (metanol 20%, glicina 0.192 M y trizma-base 0.025 en H_2O_{DD}).

La transferencia se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin y colaboradores¹⁶⁸. En un cassette de la cámara de transferencia se pusieron en el siguiente orden los elementos: 1) esponja; 2) tres rectángulos de papel filtro Whatman # 3 de 9X10.5 cm; 3) gel de poliácridamida-SDS; 4) papel de nitrocelulosa (BA85 0.45 mm, Schleicher & Schuell) de 9X10.5 cm; 5) tres rectángulos de papel filtro Whatman # 3 de 9X10.5 y 6) esponja. Todos los elementos se mojaron previamente en amortiguador de transferencia (Metanol al 20%, Glicina 0.192 M y Trisma-base 0.025 M). Se cerró el cassette y se metió en la cámara de transferencia. El papel de nitrocelulosa quedó entre el gel y el electrodo positivo. El amortiguador de transferencia debe estar a 4°C y durante la transferencia debe ser enfriado por un sistema recirculante. Los parámetros de transferencia fueron: 120 volts, 30 miliampers por 75 minutos. Una vez que se completó la transferencia se retiró el papel de nitrocelulosa y se bloqueó por 2 horas con leche descremada (Svelty) al 3.0% en PBS. Los marcadores de peso molecular y mitad del papel de nitrocelulosa se colorearon (sin ser bloqueados) con amido black (2.0 g Amido black, SIGMA, 90 ml de metanol J. T. Baker, 20 ml de ácido acético glacial J. T. Baker y 90 ml de H_2O_{DD}) se destiñeron hasta que las bandas estuvieron bien definidas con solución decolorante (90 ml de metanol J. T. Baker, 20 ml de ácido acético glacial J. T. Baker y 90 ml de H_2O_{DD}). La otra mitad del papel de nitrocelulosa se lavó tres veces con PBS 0.05% de Tween 20 (BIO RAD) con agitación constante. Posteriormente se aplicó la dilución del anticuerpo comercial específico $\alpha\beta_2GP-I$ humana (Behring werke Akettien-gesellschaft, Ingelheim) diluido 1:800 en PBSS/leche al 3% y se incubó por 2 hora a TA con agitación constante. Se lavó tres veces como se mencionó anteriormente y se adicionó el segundo anticuerpo anti-conejo marcado con fosfatasa alcalina (monoclonal anti-cadena γ de conejo, SIGMA) diluido 1:10000 en PBS/leche al 3% y se incubó a TA con agitación constante por una hora. Se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween y un lavado de 10 minutos con amortiguador de Tris (Trizma base 0.05M pH 8.8). El sustrato revelador (Naphtol AS-MX phosphato de SIGMA a una concentración de 1 mg/ml y Fast Red SIGMA a una concentración de 2 mg/ml en amortiguador de tris) se preparó durante el último lavado y se aplicó sobre el papel de nitrocelulosa permitiendo que ésta solución cubriera bien al papel. Se incubó

aproximadamente 30 minutos a TA con agitación constante, hasta que el control positivo mostró una coloración bien definida. Finalmente se lavó con H₂O_{DD}.

8.10 Detección de β_2 GP-I en los sueros humanos y en el suero bovino por inmunopunto (IP). Para la determinación de la presencia o ausencia de β_2 GP-I en los sueros humanos y en el suero bovino se cortaron cuadrados de 2 cm de lado de papel de nitrocelulosa (BA85 0.45 mm, Schleicher & Schuell), se activaron con amortiguador de transferencia (Glicina 0.192M, Trizma base 0.025M y Metanol 20 % en H₂O_{DD}) por 15 minutos y se dejaron secar a TA. Se hicieron tres aplicaciones de las muestras (suero bovino o sueros humanos), en un sólo punto. Entre cada aplicación se dejó secar perfectamente. Cada cuadrado de papel de nitrocelulosa se bloqueó una hora con leche descremada (Svelty) al 3% en PBS. Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS 0.05% de Tween 20 (BIO RAD) con agitación constante. Posteriormente se aplicó el anticuerpo comercial específico a β_2 GP-I humana (Behring werke Akettiengesellschaft, Ingelheim) diluido 1:800 en PBS/leche al 3% y se incubó por 2 hora a TA con agitación constante. Se lavó tres veces como se mencionó anteriormente y se adicionó el segundo anticuerpo anti-conejo marcado con fosfatasa alcalina (monoclonal anti-cadena y de conejo, SIGMA) diluido 1:10000 en PBS/leche al 3% y se incubó a TA con agitación constante por una hora. Se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween y un lavado de 10 minutos con amortiguador de Tris (Trizma base 0.05M pH 8.8). El sustrato revelador (Naphtol AS-MX phosphato de SIGMA a una concentración de 1 mg/ml y Fast Red SIGMA a una concentración de 2 mg/ml en amortiguador de tris) se preparó durante el último lavado y se aplicó sobre el papel de nitrocelulosa permitiendo que ésta solución cubriera bien al papel. Se incubó aproximadamente 30 minutos a TA con agitación constante, hasta que el control positivo mostró una coloración bien definida. Finalmente se lavó con H₂O_{DD}.

8.11 Determinación de la reactividad contra antígenos nucleares y citoplásmicos por IFI. Como sustrato se empleó la línea celular HEp-2 (de carcinoma de laringe humano). Las células crecidas en cajas de cultivo (de 75 cm²) con medio mínimo esencial (MEM, GIBCO), suplementado con SBF (SIGMA) al 10%, L-Glutamina (SIGMA) 2.8X10⁻³ mM, penicilina (SIGMA) 10 UI/ml, estreptomina (SIGMA) 0.01 mg/ml, bicarbonato de sodio (J.T. Baker) 20 mg/ml y HEPES 10 mM (GIBCO, BRL Gaithemburg MD), se propagaron en cajas de Petri que contenían 5 portaobjetos cubiertos con 35 ml del mismo medio. Cuando en los portaobjetos se observó una monocapa confluyente de células se retiraron del medio de cultivo, se secaron a TA y se fijaron con acetona pura a -20°C por 4 minutos. Los portaobjetos con las células fijadas se guardaron a -70°C hasta su uso. Inmunofluorescencia indirecta: Los porta objetos se dejaron descongelar a TA y se delimitaron los círculos primero con lápiz diamante y luego con lápiz cera en donde se pondrán las muestras. Se aplicaron 10 μ l de la dilución 1:100 de los SHN tratados a 56 °C durante 30 minutos y se incubó la laminilla a TA en cámara húmeda por 1 hora. Se hicieron dos lavados con PBS de 10 minutos cada uno y se dejó secar a TA. Se depositaron 10 μ l de segundo anticuerpo (anti-humano polivalente marcado con FITC, SIGMA) diluido 1:600 en PBS que contenía azul de Evans (Behringweker AG, Marburg Lahn RFA) a una dilución de 1:100 y se incubó 1 hora a TA en cámara húmeda. Se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS y se dejó secar la laminilla. Para eliminar la refringencia se agregó glicerol (J.T. Baker) antes de colocar el cubreobjetos. La lectura se hizo en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

8. 12 Purificación de β_2 GP-I. La β_2 GP-I se purificó de plasma fresco humano de acuerdo a la técnica descrita por Polz y colaboradores¹⁶⁷ con algunas modificaciones. 20 ml de

plasma humano fresco humano se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos para eliminar los residuos sólidos y posteriormente se pasó por una columna de heparina-Agarosa (SIGMA) con volumen de cama de 45 ml que esta equilibrada con PBS 0.5X, se incubó el plasma dentro de la columna por 30 minutos. Posteriormente se lavó exhaustivamente hasta que el detector de UV regresó a su estado basal. Se eluyeron las proteínas que se pegaron a la columna con PBS 2M de NaCl (aproximadamente 70 ml), y el eluido se dializó contra 4 litros PBS 0.5X durante 48 horas con tres cambios (Muestra 1). El dializado se concentró por filtración hasta aproximadamente 10 ml (Muestra 2) y se precipitó con ácido perclórico al 70 % proporción 1:33 (1 ml de ácido perclórico a 33 ml del dializado). La mezcla se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 5000 g por 30 minutos a 5 °C. Al sobrenadante que contenía la β_2 GP-I se le ajustó el pH a 8.0 (con NaOH 5.0 M) y se dializó (en bolsas de diálisis con punto de corte de 12000 a 14000) contra 4 litros de PBS 0.5X por 48 horas con 3 cambios de la solución. El sobrenadante se concentró por filtración (con membranas que retienen 12000 KD, AMICON) hasta aproximadamente 6-8 ml (Muestra 3). Se determinó proteínas (que puede ser por el método de Lowry¹⁸⁴) a las tres muestra 1, 2 y 3. El primer análisis de la proteína purificada se hizo mediante IP. Si la muestra 3 que es la que interesaba estaba contaminada con otras proteínas se hicieron geles de gradiente para eliminar los contaminantes.

a) Preparación del gradiente 5-20 %

soluciones:	solución
Acrilamida al 29.1 %, bis-acrilamida al 0.9 %.....	A
H ₂ O _{dd}	B
Trisma-base 1.875 M pH 8.8.....	C
SDS al 10 %.....	D
TEMED (SIGMA T-9281).....	E
Persulfato de amonio (BIO-RAD 161-0700) al 10%.....	F

Amortiguador de tris-glicina (144.2 gr de glicina, 30.3 gr de trisma base, 10.0 gr de SDS en 10 litros). Para un gel de la cámara de electroforesis de Bio-Rad Miniprotean II.

Al terminar el corrimiento electroforético, los geles se retiraron de la cámara y se lavaron medio minuto con H₂O_{dd} posteriormente se sumergieron en una solución fresca de cloruro de cobre al 5% hasta que las bandas de proteínas fueron claras (esta tinción es una tinción negativa, es decir que las bandas de proteína no se tiñen, lo que se tiñe es el gel ya que el cloruro de cobre precipita al SDS dando una coloración blanca y las proteínas quedan de color azul transparente). Cuando se puedan identificar las bandas de proteínas se corta la de 50 KD (que corresponde a la β_2 GP-I) y se coloca en amortiguador tris-glicina (amortiguador de corrida de los geles de poliacrilamida).

b) Electroelución:

Cuando se tuvieron entre 15 y 20 bandas de β_2 GP-I se colocaron en una bolsa de diálisis con amortiguador de corrida y se electroeluyeron en una cámara de electroforesis horizontal con el mismo amortiguador de corrida de tris-glicina. El corrimiento se hizo por 4 horas a 100-120 volts. Es importante que durante todo el tiempo de corrida el amortiguador permanezca frío (máximo 15 °C). Al terminar la electroelución se retiró el amortiguador de adentro de la bolsa de diálisis (contiene la β_2 GP-I) y se dializó contra PBS durante 48 horas a TA y 48 horas a 4°C. Posteriormente se concentró hasta aproximadamente 5 ml y se le determinaron proteínas como se mencionó anteriormente. Para corroborar la pureza de la proteína se corrió en un gel

de 10% poliacrilamida-SDS. Una alícuota de la preparación se envió al laboratorio del Dr. Possani (Instituto de Biotecnología Laboratorio 7, Cuernavaca Morelos) en donde estudiaron la pureza de la proteína por HPLC y la identidad de la misma por secuenciación de aminoácidos, la pureza reportada por el Dr. Possani fue de más del 95% y la secuenciación de los primeros aminoácidos corroboró que la proteína purificada era β_2 GP-I.

8.13 Diálisis contra amortiguadores hipermolares y de pH bajo. 500 μ l de SHN se depositaron en bolsas de nitrocelulosa (punto de corte 12-14 000 Kd) o de nitrocelulosa benzoilada (1200 Kd) y se dializaron por 17 ± 1 hora a 4 °C contra los siguientes amortiguadores hipermolares: 1) PBS 1X; 2) PBS NaCl 1.5 M; 3) Glicina 1.5 M; y 4) Tris-base 1.5 M. Todos ellos a pH 7.2-7.4 y con azida de sodio al .05 %. y contra los siguientes amortiguadores: a) Tris-HCl; y PBS a diferentes pH's (entre 7 y 1 con variación de una unidad de pH). Terminadas las diálisis se recuperaron los sueros y se guardaron en tubos eppendorf a - 20 °C hasta que fueron ensayados. A las bolsas y a las soluciones de diálisis se les hicieron extracciones con solventes orgánicos (cloroformo y cloroformo-metanol)

8.14 Extracciones con cloroformo y cloroformo-metanol. A las soluciones de diálisis (hipermolares y de diferentes pH) se les hicieron extracciones con cloroformo de la siguiente manera: Se agregó a los 4 litros de solución de diálisis 200 ml de cloroformo y se recuperó la fase orgánica, este procedimiento se repitió dos veces. El extracto clorofórmico de las soluciones de diálisis se evaporó con nitrógeno gas hasta aproximadamente 1 ml y se estudiaron los diferentes extractos por CCF.

Las bolsas de diálisis se extrajeron con 5 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (65-25; V/V). El procedimiento se repitió tres veces. Los extractos cloroformo-metanólico se evaporaron con nitrógeno gas hasta 0.5 ml. Y se estudiaron por CCF.

8.15 Cromatografía en capa fina (CCF)¹⁶⁸. Por CCF se estudiaron los extractos de cloroformo y cloroformo-metanol. En placas de silica gel H (Merck) se aplicaron 15 μ l de las muestras de los extractos. Se corrieron con el sistema de solventes cloroformo-metanol-agua (65-25-4 respectivamente; V/V). Las placas se revelaron en una cámara cerrada con iodo resublimado. Las muestras se compararon con fosfolípidos puros (AF, CL, FTC, FTS, FTI, EM, FTE de SIGMA).

8.16 Determinación del tiempo de protrombina (TP). El tiempo de protrombina se midió en un fibrómetro de Behring (Behring fibríntimer OVFV 03) utilizando los reactivos de la casa comercial (Thromborel ®). Para estudiar si los aCLE tienen reactividad contra los FL que participan en la cascada de coagulación se aplicó un sistema de autocontroles que consistió en mezclar SHN en proporción 1:1 con PFN_{pp} y medir por quintuplicado el TP. Los tiempos de esta medición sirvieron de control para los mismos sueros, pero tratados a 56 °C durante 30 minutos para corroborar que el TP se prolongó por la presencia de los aCLE liberados en el SHN, se midió el TP con SHN₅₆ inhibidos con mCL y mFTS. También se midió la prolongación del TP del PFN_{pp} en presencia de IgG's purificadas de SHN₅₆. La determinación del TP consistió en agregar 0.1 ml de muestra (0.05 ml de plasma + 0.05 ml de SHN o SHN₅₆ o IgG o de SHN₅₆ inhibido con mFL o IgG inhibidas con mFL) + 0.2 ml de Thromborel ® a 37 °C en una celdilla del fibrómetro esperar 60 segundos y medir la formación del coágulo de fibrina.

8.17 Determinación del tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTa). El tiempo de tromboplastina parcial activada se midió en un fibrómetro de Behring (Behring fibríntimer OVFV 03) utilizando los reactivos de la casa comercial (Pathromtin o Neothromtin

®). Se uso el mismo sistema de autocontroles que para el TP. El TPTa de cada muestra se midió por quintuplicado. Los tiempos de esta medición sirvieron de control para los mismos sueros, pero tratados a 56 °C durante 30 minutos. Para corroborar que el TPTa se prolongó por la presencia de los aCLE liberados en el SHN, se midió el TPTa con los SHN₅₆ inhibidos con mCL y mFTS. También se midió la prolongación del TPTa del PFN_{pp} en presencia de IgG's purificadas de SHN₅₆. La determinación del TPTa consistió en agregar 0.1 ml de muestra (0.05 ml de plasma + 0.05 ml de SHN o SHN₅₆ o IgG o de SHN₅₆ inhibido con mFL o IgG inhibidas con mFL) + 0.1 ml de Pathromtin o Neotromtin ® a 37 °C en una celdilla del fibrómetro esperar 120 seg y medir la formación del coágulo de fibrina.

8.18 Tratamiento de los SHN con fosfolipasas (A₂, B, C y D). Los SHN y los pozos de placas de micro ELISA se trataron con fosfolipasas, teniendo en cuenta que tanto el suero humano como el suero bovino fetal tienen inhibidores de las fosfolipasas, razón por la cual los SHN's se diluyeron 1:20 en PBS (a diferentes pH's) y se les agregó una concentración relativamente alta de fosfolipasas (10 unidades Internacionales de cada una de ella, disueltas en PBS a diferentes pH's). Las digestiones de los sueros y de los pozos de las placas de ELISA se incubaron por 17 ± 1 hora a diferentes temperaturas, de acuerdo a las condiciones óptimas de acción de las fosfolipasas, las cuales fueron: para la fosfolipasa A₂ (de veneno de abeja *Apis mellifera* SIGMA) pH = 8.9, 25 °C; fosfolipasa B (de diferentes especies de *vibrio* SIGMA) pH = 8.0, 37 °C; fosfolipasa C (tipo IV de *C. perfringens*, *C. welchii* SIGMA) pH = 7.3, 35 °C; y fosfolipasa D (tipo III de cacahuete SIGMA) pH = 5.6, 30 °C. Una vez terminadas las digestiones, se neutralizó el pH de las mezclas, se diluyeron con PBS 10 % de suero bovino fetal (para inhibir el efecto de las fosfolipasas) y les determinó la actividad aCL resultante del tratamiento. En el caso de los pozos de las placas de microELISA sensibilizados con CL, después de la digestión con las fosfolipasas se hicieron 2 lavados con PBS y se bloquearon con SBF al 10 % (procedimiento que tuvo un doble efecto, bloquear los sitios inespecíficos e inhibir a las fosfolipasas). La casa comercial que extrajo las fosfolipasas (SIGMA) proporcionó entre otra, la siguiente información: una unidad de fosfolipasa A₂ hidroliza a pH = 8.9 y 25 °C, 1.0 µmol/min de L-a-fosfatidilcolina y produce L-a-lisofosfatidilcolina más ácidos grasos; una unidad de fosfolipasa B produce a pH = 8.0 y 37 °C, 1.0 µmol/min de glicerolfosforilcolina a partir de L-a-lisofosfatidilcolina de yema de huevo; una unidad de fosfolipasa C produce a pH = 7.3 y 37 °C, 1.0 µmol de fósforo orgánico soluble en agua a partir de L-a-lisofosfatidilcolina de yema de huevo; y una unidad de fosfolipasa D produce a pH = 5.6 y 30 °C, 1.0 µmol/hr de colina a partir de L-a-lisofosfatidilcolina de yema de huevo.

8.19 Análisis estadístico. El análisis estadístico se hizo mediante la prueba *t* de student, y en los casos en los que una o más de las premisas para la prueba *t* no se cumplieron se usó la prueba U de Mann-Whitney.

9. RESULTADOS.

9.1 Definición de cociente aCLE.

El término cociente aCLE, se acuñó para definir al aumento de la actividad anti-cardiolipina de sueros humanos normales (SHN), después del tratamiento a 56°C durante 30 minutos. Sólo se empleó para definir frecuencia e isotipo de las inmunoglobulinas que constituyen a los aCLE. La expresión matemática que define al cociente aCLE es:

$$\text{Cociente aCLE} = \frac{\bar{X} \text{ DO}_{405} \text{ del suero a } 20^\circ\text{C}}{\bar{X} \text{ DO}_{405} \text{ del suero tratado a } 56^\circ\text{C, } 30'}$$

Los valores obtenidos son adimensionales por ser un cociente. En el ensayo de ELISA, la variación permitida intraensayo es del 10% e interensayo del 15%, por ello propusimos que cocientes aCLE > 1.2 son positivos.

Como en algunos casos los volúmenes que se manejaron fueron muy pequeños, se realizó el siguiente ensayo para determinar la pérdida de volumen por manipulación y evaporación en las muestras tratadas a 56 °C durante 30 minutos. De 50 SHN se tomaron 110 µl de muestra por duplicado (en tubos Eppendorf de 0.5 ml). A uno de los tubos se le incubó durante 30 minutos a 56 °C, se esperó a que alcanzara la temperatura ambiente y se midió el volumen de suero recuperado en ambas alícuotas. La pérdida de volumen se muestra en la siguiente tabla:

Tabla I
PERDIDA DE VOLUMEN POR MANIPULACION Y EVAPORACION
SUEROS HUMANOS NORMALES

n	volumen original	volumen recuperado en µl		valor de p*
		20 °C	56 °C	
50	110	98.5 ± 1.3	94.2 ± 1.9	NS

* Valores de p para la prueba t de student.

9.2 Frecuencia e isotipo de los aCLE en sujetos sanos.

El análisis por isotipo de inmunoglobulinas de los 100 SHN, arrojó los resultados mostrados en la tabla II.

Tabla II
FRECUENCIA E ISOTIPO DE LOS aCLE DE SHN

Isotipo	Cociente aCLE		
	> 1.2	en el límite	< 1.2
IgG	94.0	5.0	1.0
IgA	0	54.0	46.0
IgM	0	33.3	66.6

El 94.0% de los sueros estudiados mostraron cocientes aCLE mayores a 1.2 para el isotipo IgG, en tanto que para los isotipos IgA e IgM los cocientes aCLE estuvieron todos en el límite o fueron menores a 1.2. Estos resultados muestran que los aCLE de sujetos sanos son exclusivamente de isotipo IgG. La frecuencia observada de aCLE en nuestra población sana fue del 94%, el 6 % restante fueron SHN cuyos títulos de aCL no escondidos estuvieron muy por arriba de lo normal⁷⁹ (arriba de 1.9 unidades arbitrarias), lo que explica que no se les pudiera detectar aCLE, porque los títulos altos de aCL no escondidos impidió la detección de los aCLE.

9.3 Cinética de liberación de los aCLE de sueros humanos normales incubados a 56°C.

En 1990 Cheng y colaboradores¹⁵⁶ reportaron que el máximo de liberación de los aCLE ocurre a los 56 °C y que temperaturas mayores aparentemente desnaturalizan al anticuerpo, de manera irreversible, porque pierde su capacidad de reconocer al fosfolípido que se encuentra unido a la placa de ELISA. Los resultados de nuestros estudios muestran que la liberación de los aCLE ocurre desde los primeros minutos de incubación a 56°C y alcanza su máximo aproximadamente a los 30 minutos, posteriormente se observa una pérdida progresiva de la capacidad de reconocer al fosfolípido, lo que sugiere que el anticuerpo se modifica irreversiblemente con el tratamiento por periodos prolongados de exposición a esa temperatura (figura 1).

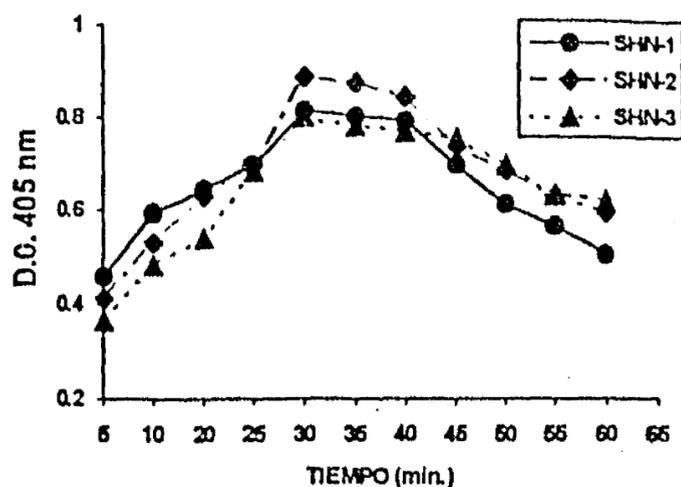


Figura 1. Efecto del tiempo de incubación a 56 °C. Los resultados son el promedio de triplicados de dos experimentos.

La figura ejemplifica la pérdida de la capacidad de los aCLE de reconocer a su antígeno después de haber sido desnaturalizados por la temperatura, hasta el grado de no recuperar su conformación original.

9.4 Depleción de los sueros de la fracción IgG (IgG1, IgG2 e IgG4).

En los SHN el reconocimiento de la CL, después del tratamiento con calor se debe, al parecer, exclusivamente a anticuerpos de isotipo IgG, como lo mostramos en el análisis por isotipos. Para corroborar el hallazgo, se depletaron 10 SHN de la fracción IgG y se les midió la actividad aCL resultante de dicho tratamiento. Los resultados se muestran en la figura 2.

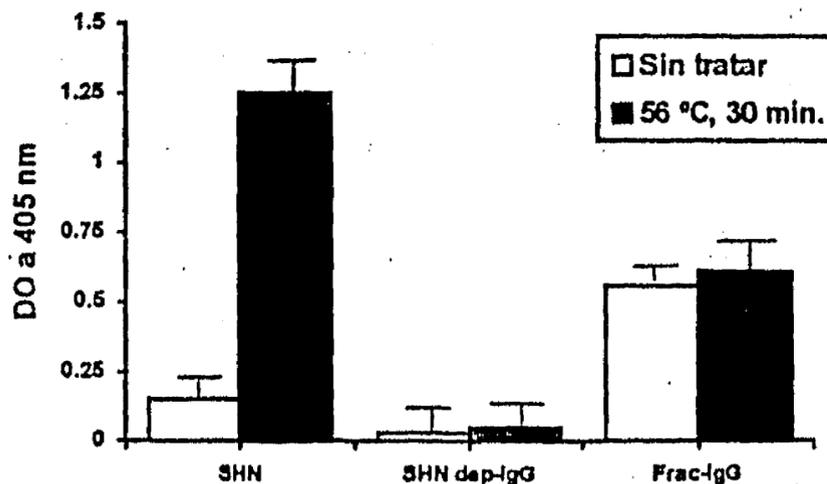


Figura 2. Actividad aCL remanente de 10 SHN depletados de la fracción IgG (IgG1, IgG2 e IgG4). Los resultados son el promedio de duplicados de tres ensayos. SHN = actividad aCL de los sueros humanos normales; SHN dep-IgG = actividad aCL de los sueros humanos normales depletados de la fracción IgG; Frac-IgG = actividad aCL de las fracciones IgG.

Al tratar los SHN a 56 °C durante 30 minutos, los títulos de aCL se incrementaron hasta 1.25 DO en promedio, el incremento se abate al depletar los sueros de la fracción IgG y no se observó aumento de la actividad aCL, al tratar nuevamente los sueros depletados, a 56 °C durante 30 minutos. La figura muestra también la actividad aCL de las fracciones IgG's sin tratar y tratadas a 56 °C durante 30 minutos. No se observó diferencia significativa entre la actividad aCL de las fracciones de IgG antes y después del tratamiento.

9.5 Inhibición con micelas de CL (mCL) de la actividad aCL potenciada con el tratamiento a 56 °C durante 30 minutos.

La figura 3 muestra el efecto que se observó al inhibir con mCL 25 SHN, previamente tratados a 56 °C durante 30 minutos.

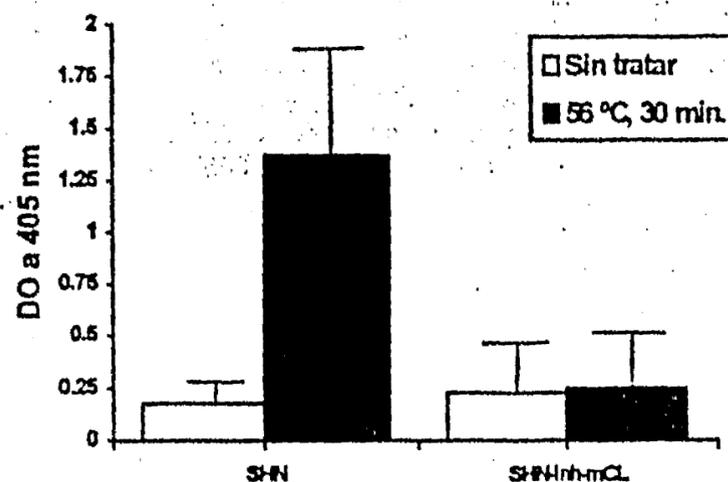


Figura 3. Inhibición con mCL de la actividad aCL potenciada por el tratamiento a 56 °C durante 30 minutos de 25 SHN. Los resultados son el promedio de duplicados. SHN = actividad aCL de los sueros humanos normales; SHN-Inh-mCL = actividad aCL remanente de los sueros inhibidos con micelas de cardiolipina.

Como se puede ver las adsorciones con mCL inhibieron la actividad aCL potenciada por calor a valores prácticamente basales. El tratamiento con el fosfolípido depletó de los SHN todos los aCLE.

En la figura 4 se muestra la actividad aCL de las fracciones IgG's que se obtuvieron al pasar por separado 10 SHN previamente tratados a 56 °C durante 30 minutos, por una columna de proteína A-sefarosa. Como se puede ver las fracciones IgG adsorbidas con mCL perdieron la actividad aCL, la cual fue recuperada cuando se trataron a 56 °C durante 30 minutos los complejos aCLE-mCL, la diferencia fue significativa ($p < 0.001$). El mismo fenómeno se observó cuando se inhibieron las fracciones de IgG con mCL pretratadas a 56 °C durante 30 minutos. Al comparar la actividad aCL de las fracciones IgG inhibidas con las mCL sin tratar y tratadas a 56 °C durante 30 minutos se observó como las micelas tratadas se desnaturalizaron de manera irreversible pues perdieron la capacidad de inhibir la actividad aCL de las fracciones, la diferencia fue significativa (actividad aCL de las fracciones IgG inhibidas con mCL vs inhibidos con mCL_{56°C, 30'}; $p < 0.001$).

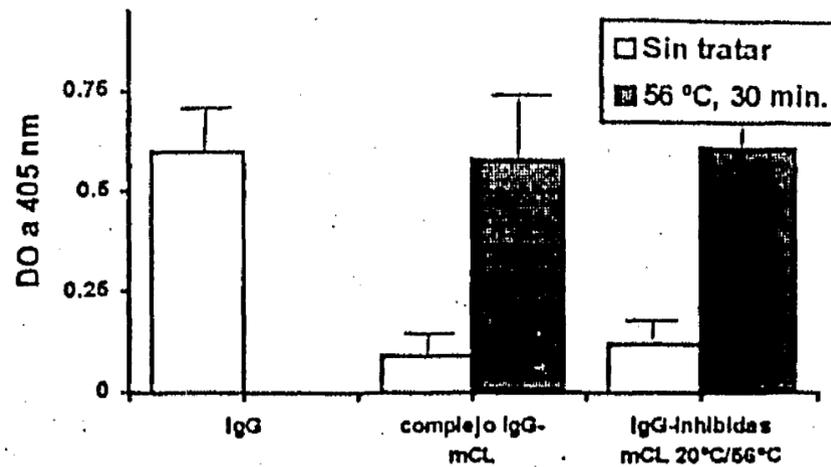


Figura 4. Inhibición de la actividad aCL de las 10 fracciones de IgG purificadas de SHN pretratados a 56 °C durante 30 minutos. Los resultados son el promedio de duplicados de tres ensayos. IgG = fracciones IgG purificadas de los 10 SHN pretratados a 56 °C durante 30 minutos ; complejo IgG-mCL = fracciones IgG inhibidas con mCL; IgG-Inhibidas mCL 20°C/56°C = fracciones IgG inhibidas con mCL sin tratar y tratadas a 56°C durante 30 minutos.

9.6 Detección de los aCLE en el suero de pacientes con LEG, SaFP y sífilis.

Los aCLE se pueden detectar en sujetos sanos, cuyos sueros son negativos para aCL no escondidos, como se mostró en el apartado 9.2. Los SHN en los que se detectaron títulos altos de aCL (tabla III), la aplicación de la fórmula matemática para calcular el cociente aCLE, aparentemente no funcionó, pues se encontraron cocientes aCLE menores o iguales a 1.2 con DO muy por arriba de la media de la población. Este mismo fenómeno se observó en los pacientes con LEG y SaFP que tienen títulos altos de aCL (tabla III). Si bien los aFL de los pacientes con enfermedades autoinmunes e infecciosas son diferentes, como se reportó en 1992 por Matsuura y colaboradores¹³⁷, y por nosotros¹⁴⁸, es importante conocer si los individuos con títulos altos de aCL no escondidos tienen aCLE. La contestación de la pregunta anterior puede ayudarnos en la caracterización del factor termolábil que oculta a los aCLE, pues se sabe que los aCL no escondidos de los pacientes con sífilis reconocen tanto fosfolípidos de carga negativa como neutros solos o mezclas de ellos, en tanto que los aFL de los pacientes con enfermedades autoinmunes (LEG y SaFP) reconocen a la β_2 GP-I sola o modificada por la presencia de FL de carga negativa. Los resultados de la detección de los aCLE en los pacientes con LEG, SaFP y sífilis se muestran en la tabla III.

Los sueros de los tres grupos de individuos que tenían títulos altos aCL-IgG no escondidos, se trataron con mCL hasta hacer negativa por completo la actividad aCL y

posteriormente se incubaron a 56 °C durante 30 minutos para "liberar" a los aCLE de su inhibidor termolábil. Los resultados se muestran en la figura 5.

Tabla III
DETECCION DE LOS aCLE EN LOS SUEROS DE SUJETOS
SANOS Y DE PACIENTES CON LES, SaFP Y SÍFILIS

GRUPO	aCLE-IgG (DO ₄₀₀)		p [†]
	20 °C	56 °C	
SHN [#] (n = 94)	0.16 ± 0.09	1.73 ± 0.15	< 0.001
SHN ^{##} (n = 6)	0.71 ± 0.17	0.745	NS
LEG, aCL(-) (n = 25)	0.17 ± 0.08	1.87 ± 0.27	< 0.001
LEG, aCL(+) (n = 25)	3.19 ± 1.7	3.11 ± 1.61	NS
SaFP [§] (n = 14)	1.67 ± 0.47	1.86 ± 0.18	NS
SaFP [¶] (n = 8)	0.29 ± 0.15	1.33 ± 0.41	< 0.001
SIFILIS (n = 25)	0.59 ± 0.12	1.24 ± 0.18	< 0.001

Los resultados son el promedio de duplicado

‡ Valores de p para la prueba t de Student

Sueros humanos normales, aCL negativos.

Sueros humanos normales, aCL positivos a títulos altos.

§ Sueros de pacientes con SaFP con títulos altos de aCL.

¶ Sueros de pacientes con SaFP con títulos moderadamente altos de aCL.

La figura 5 muestra como los aCLE coexisten en los sueros de los sujetos sanos y de los pacientes con enfermedades autoinmunes (LEG y SaFP) que tienen aCL no escondidos a títulos altos. Al depletar los sueros de los aCL no escondidos mediante adsorciones exhaustivas con mCL la actividad aCL disminuyó hasta valores normales (0.12 ± 0.09 DO). La incubación a 56 °C durante 30 minutos de los sueros depletados de los aCL no escondidos, liberó los aCLE en los tres grupos estudiados (SHN con aCL no escondidos a títulos altos, sueros de pacientes con LEG y SaFP con títulos altos de aCL no escondidos). La diferencia entre la actividad aCL de los sueros sin tratar vs los sueros inhibidos con micelas de CL fue significativa (p < 0.001). El incremento en la actividad aCL, por el tratamiento a 56 °C durante 30 minutos, de los sueros depletados de los aCL no escondidos fue significativo (p < 0.001). Los resultados mostrados en la figura 5 confirman

la hipótesis de que los aCLE y los aCL no escondidos pueden coexistir en un mismo individuo.

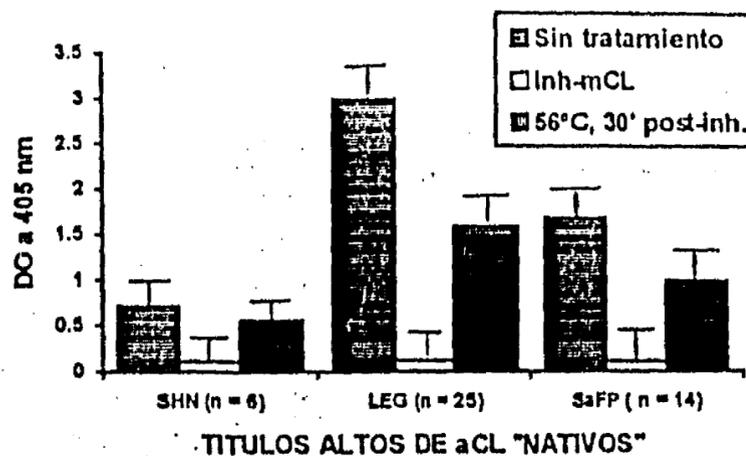


Figura 5. Adsorción de los aCL no escondidos con mCL. Los resultados son el promedio de 2 determinaciones. Cada suero se inhibió 10 veces con 100 μ l de mCL a una concentración de 1 mg/ml. Inhibidos v.s sin tratar $p < 0.001$; Inhibidos vs tratados a 56 $^{\circ}$ C, 30' post-inh $p < 0.001$; Sin tratamiento vs tratados a 56 $^{\circ}$ C durante 30 minutos: SHN = NS, LEG $p < 0.01$ y SaFP $p < 0.01$.

9.7 Requerimiento de β_2 -glicoproteína-I (β_2 GP-I) por los aCLE de sujetos sanos.

Los anticuerpos aFL séricos de los pacientes con enfermedades autoinmunes y los que se encuentran presentes en el suero de los pacientes con enfermedades infecciosas difieren entre sí por sus requerimientos de la β_2 GP-I¹³⁰⁻¹³². Si los aCLE de los sujetos clínicamente sanos requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*, probablemente los aFL que encuentran presentes a títulos altos en los sueros de los pacientes con enfermedades autoinmunes son el resultado de una des-regulación de los mecanismos que inhiben a los aCLE en estos pacientes. Para demostrar la hipótesis anterior se estudiaron 25 SHN por el método de ELISA convencional y usando un ELISA modificado por nosotros que consistió en sustituir el suero bovino fetal por albúmina sérica bovina en la solución de bloqueo y como diluyente de las muestras y del conjugado (ver materiales y métodos). Se utilizó además β_2 GP-I humana purificada (ver materiales y métodos). La tabla IV muestra los resultados obtenidos del estudio. Como se puede ver los SHN estudiados no tienen aCL no escondidos ni dependientes de la β_2 GP-I como lo muestra el ELISA de CL libre de β_2 GP-I exógena (β_2 GP-I bovina) y el de CL más β_2 GP-I exógena. Al tratar los SHN a 56 $^{\circ}$ C durante 30 minutos la actividad aCL se incrementó aproximadamente 10 veces y no se encontró diferencia significativa cuando estuvo presente el cofactor, lo que demuestra que los aCLE de los sujetos clínicamente sanos no requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*.

Tabla IV
DEPENDENCIA DE β_2 GP-I POR LOS aCLE-IgG DE 25 SHN

E L I S A				
Muestra	ESTANDAR	MODIFICADO	ESTANDAR	MODIFICADO
	NO ESCONDIDOS		ESCONDIDOS	
SHN (n = 25)	0.15 ± 0.05	0.12 ± 0.02	1.42 ± 0.25	1.64 ± 0.11

No se observó diferencia significativa entre los aCL no escondidos y los ocultos en el ensayo estándar y modificados.

9.8 Participación de la β_2 GP-I exógena (suero bovino fetal) y de la endógena en la detección de los aCLE.

Recientemente McIntyre y colaboradores¹⁶⁸ publicaron que todos los individuos tienen aCL séricos a títulos altos, los cuales se generan como respuesta a infecciones del medio ambiente. Los autores proponen que dichos anticuerpos solo son detectados *in vitro* después de tratar los sueros a 56 °C durante 30 minutos, porque el tratamiento con calor destruye a la β_2 GP-I que compite con los aCL por la cardiolipina. Para probar esta hipótesis y comprobar los resultados presentados en la tabla IV, que muestran que los aCLE de los sujetos sanos no requiere de la β_2 GP-I para ser detectados *in vitro*, se diseñaron una serie de experimentos que consistieron en sensibilizar placas de ELISA con CL (de manera habitual, ver materiales y métodos) y bloquear los sitios inespecíficos con suero de bovino recién nacido (SBRN) sin tratar y SBRN depletado de β_2 GP-I por cromatografía de afinidad (columna de heparina-agarosa, ver materiales y métodos), los SHN para este estudio también se depletaron de β_2 GP-I. La presencia o ausencia de β_2 GP-I en el SBRN y en los SHN se confirmó por inmunopunto (Dot Blot) con un anticuerpo a β_2 GP-I humana comercial (Behringwerke Aktiengesellschaft, Ingelheim) (figura 6).

NBCS	NBCS dep. β_2 GP-I	SHN 1	SHN 1 dep. β_2 GP-I
SHN 2	SHN 2 dep. β_2 GP-I	SHN 3	SHN 3 dep. β_2 GP-I
CONTROL (+)	CONTROL (-)	ASB al 3.0 %	ASB al 6.0 %

Figura 6. Detección de β_2 GP-I en el SBRN y en los SHN sin tratar y depletados de β_2 GP-I. NBCS = suero de bovino recién nacido sin tratar; SBRN dep. β_2 GP-I = suero de bovino recién nacido depletado de β_2 GP-I; SHN = sueros humanos normales; SHN dep. β_2 GP-I = sueros humanos normales depletados de β_2 GP-I; Control (+) = β_2 GP-I humana purificada; Control (-) = PBS; ASB al 3.0 y 6.0 % = albúmina sérica bovina al 3.0 y 6.0 %.

La figura 6 muestra como los SHN y el SBRN pasados por columna de heparina-agarosa perdieron toda la β_2 GP-I, también se puede ver que la ASB a la concentración que se usó como bloqueante y diluyente (3.0% y aún al doble de la concentración) en el ELISA no contiene β_2 GP-I detectable por la técnica de inmunopunto. El sistema anterior estaba completamente libre de β_2 GP-I y permitió estudiar el efecto de la β_2 GP-I en la detección de los aCLE de los sujetos clínicamente sanos. Los resultados de dichos estudios se muestran en las tablas V y VI.

Tabla V
EFFECTO DE LA β_2 GP-I EXOGENA EN LA DETECCION DE LOS aCLE DE SUJETOS SANOS

TRATAMIENTO	DILUYENTE	aCLE-IgG DO ₄₀₅ n = 7
—	GELATINA	0.06 ± 0.04
56 °C, 30 min.	GELATINA	1.08 ± 0.29 [¥]
—	SBRN	0.08 ± 0.03
56 °C, 30 min.	SBRN	1.14 ± 0.27 [¥]
—	SBRN sin β_2 GP-I	0.03 ± 0.03
56 °C, 30 min.	SBRN sin β_2 GP-I	0.90 ± 0.19 [¥]

Los resultados son el promedio de duplicados de dos ensayos.
[¥] No hay diferencia significativa al comparar los títulos de los aCLE (56 °C, 30 min.) detectados con los diferentes diluyentes.

Al comparar las DO_{405} de los aCL no escondidos no se encontró diferencia significativa cuando se usó gelatina o SBRN como diluyente, en tanto que cuando se usó SBRN depletado de β_2 GP-I las DO_{405} disminuyeron ($p < 0.01$). No se observó diferencia significativa cuando se detectaron los aCLE de los 7 SHN diluidos en PBS/gelatina, PBS/SBRN o PBS/SBRN depletado de β_2 GP-I. Los resultados apoyan la noción de que los aCLE de sujetos sanos no requieren de la β_2 GP-I para ser detectados *in vitro*, y permite rechazar la hipótesis de McIntyre y colaboradores¹⁶⁹ que propone que la β_2 GP-I del SBRN es el inhibidor termolábil de los aCLE, porque impide la detección de estos anticuerpos antifosfolípidos *in vitro*, por competencia con el antígeno. La participación de la β_2 GP-I endógena, es decir la propia de los SHN, en la detección de los aCLE se muestra en la tabla VI.

Tabla VI
DETECCION DE aCLE-IgG EN SHN DEPLETADOS DE β_2 GP-I

Muestra	SIN DEPLETAR		DEPLETADOS DE β_2 GP-I	
	20 °C	56 °C	20 °C	56 °C
SHN (n = 7)	0.12 ± 0.03	0.69 ± 0.23	0.10 ± 0.05*	0.65 ± 0.20§

Los resultados están expresados en DO_{405} y son el promedio de duplicados de dos ensayos.

* NS vs sin depletar de β_2 GP-I.

§ NS vs sin depletar de β_2 GP-I.

La tabla VI muestra los resultados de los experimentos realizados en el sistema libre de β_2 GP-I endógena (SHN depletados de β_2 GP-I, ver figura 6), como bloqueante y diluyente en los ELISA's se utilizó albúmina sérica bovina libre de β_2 GP-I (ver figura 6). No se encontró diferencia significativa en los títulos de aCL no escondidos ni en los aCLE en presencia o ausencia de β_2 GP-I endógena, con lo que se demostró que la β_2 GP-I propia de los SHN no compite con los anticuerpos anticardiolipina no escondidos ni con los "ocultos" por el fosfolípido. El factor termolábil que oculta a los aCLE puede existir libre en el suero y ser los aCLE el reactivo limitante en la formación del complejo aCLE-inhibidor. Para probar esta hipótesis se realizaron los siguientes experimentos: se incubaron (a 37°C durante una hora y toda la noche a 18 °C) mezclas de los 7 SHN, que previamente habían sido tratados a 56 °C durante 30 minutos ($SHN_{56^\circ C, 30'}$), con el mismo volumen de suero autólogo sin calentar. Una vez terminada la incubación se diluyó la mezcla 1:50 y se determinó la actividad aCL resultante. Los resultados se muestran en la tabla VII.

Tabla VII
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD aCL DE SHN_{56°C, 30'} INCUBADOS CON UN VOLUMEN IGUAL DE SUERO AUTOLOGO SIN CALENTAR

TRATAMIENTO	MEZCLA V/V CON:	ACTIVIDAD aCL DO ₄₀₅ n = 7
—	—	0.20 ± 0.05
56 °C, 30'	PBS	1.30 ± 0.14
56 °C, 30'	SHN SIN TRATAR	1.15 ± 0.08

Los resultados son la media de duplicados de dos ensayos.
 No se observó diferencia significativa entre los SHN_{56 °C, 30'} diluidos V/V con PBS y con SHN autólogo sin tratar.

Como diluyente y bloqueante en los ensayos se utilizó gelatina al 0.3% en PBS o SBRN al 10 %. Teóricamente en estos ensayos existía 4 µg/pozo de β₂GP-I humana (autóloga) o bovina (cuando el diluyente fue SBRN al 10 % en PBS), cantidad que se sabe, es suficiente para mostrar actividad de cofactor y puede competir con los aCLE por el fosfolípido. Además, cuando se depletaron los SHN de la β₂GP-I la actividad aCL de los aCLE no se potenció. Una posible explicación es que el tratamiento con calor, es decir a 56 °C durante 30 minutos, induce cambios irreversibles en la conformación de los aCLE que impiden el reconocimiento de la β₂GP-I. De no ser así, nuestros resultados muestran que el inhibidor termolábil que oculta a los aCLE no es la β₂GP-I.

9.9 CARACTERIZACION DE LOS aCL DEL SUERO DE PACIENTES CON SaFP.

En la tabla VIII mostramos los resultados de los aCL detectados en los pacientes con SaFP. Como se puede ver, el 86 % de los pacientes tuvieron aCL de clase IgG no escondidos dependientes de β₂GP-I para su detección *in vitro*.

TABLA VIII
ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA DE CLASE IgG DETECTADOS EN EL SUERO
DE LOS PACIENTES CON SaFP

MUESTRA	ELISA		ELISA	
	ESTANDAR	MODIFICADO	ESTANDAR	MODIFICADO
SAFP	NO ESCONDIDOS		ESCONDIDOS	
1	1.65	0.15	1.81	0.52
2	0.76	0.12	1.57	0.53
3	0.34	0.05	0.78	0.54
4	0.17	0.04	0.98	0.34
5	1.54	0.18	1.95	0.57
6	2.00	0.24	2.00	0.55
7	0.25	0.04	1.71	0.96
8	0.49	0.03	1.24	0.27
9	1.79	0.15	2.00	0.54
10	1.09	0.04	1.71	0.37
11	0.24	0.04	1.62	0.61
12	0.12	0.03	1.12	0.27
13	2.00	0.11	2.00	0.55
14	1.98	0.06	2.00	0.67
15	0.70	0.11	1.45	0.43
16	2.00	0.15	1.95	0.59
17	0.19	0.06	1.17	0.71
18	2.00	0.23	1.99	1.33
19	0.53	0.09	1.99	0.43
20	1.93	0.09	1.84	0.06
21	2.00	2.00	1.84	0.60
22	1.98	1.76	2.00	1.06
MEDIA ± DE	1.17 ± 0.78 [†]	0.10 ± 0.07 [‡]	1.67 ± 0.39 [†]	0.57 ± 0.27 [‡]

Los resultados están expresados en DO₄₀₅ y son el promedio de duplicados de dos ensayos.

[†] p < 0.001 cuando se comparan los títulos con los obtenidos en el ELISA modificado.

[‡] De los pacientes 1 al 20 (pacientes 21 y 22 = 1.9 ± 0.17 DO₄₀₅/nm).

Los resultados muestran que el tratamiento con calor descubrió dos grupos más de aCL-IgG (uno dependiente y otro independiente de β₂GP-I para su detección *in vitro*) en los 22 sueros de pacientes con SaFP, lo anterior se apoya en el incremento de aproximadamente tres veces las DO₄₀₅ de los aCL-IgG detectados en el ensayo estandar comparadas con las DO₄₀₅ obtenidas en el ensayo modificado, en el que no existe β₂GP-I exógena.

Los sueros 21 y 22 también tuvieron aCL-IgG que se detectaron en ausencia de β₂GP-I, lo que sugiere, que en estos dos sueros existen cuatro subpoblaciones de aCL-IgG: (i) dos subpoblaciones de aCL-IgG no escondidos, una de las cuales es dependiente del cofactor para ser detectada y otra que es detectada independientemente de la presencia de la β₂GP-I; y (ii) otras dos subpoblaciones de aCLE-IgG, una de las cuales requiere del la β₂GP-I para reconocer al fosfolípido y otra que reconoce a la cardiolipina con o sin el cofactor.

9.9.1 CARACTERIZACION DE LAS SUBPOBLACIONES DE aCL NO ESCONDIDOS EN LOS SUEROS DE LOS PACIENTES CON SaFP.

Para comprobar la existencia de cuatro subpoblaciones de aCL que sugieren los datos presentados en la tabla VIII, se adsorbieron los dos sueros de pacientes con SaFP (21 y 22) con una mezcla de micelas de cardiolipina y β_2 GP-I humana purificada. La figura 7 muestra la pureza e identidad de la β_2 GP-I purificada humana utilizada en los ensayos siguientes de caracterización de las subpoblaciones de aCL no escondidos. La figura 7A es la tinción con amido negro (A) y la figura 7 B la electroinmuno-transferencia. Como se puede ver, la tinción de proteínas (amido negro) mostró una sola banda, que cuando se probó su identidad por electroinmunotransferencia con un antisuero comercial específico a β_2 GP-I humana (Behring werke Akettiengesellschaft, Ingelheim) se confirmó que era β_2 GP-I.

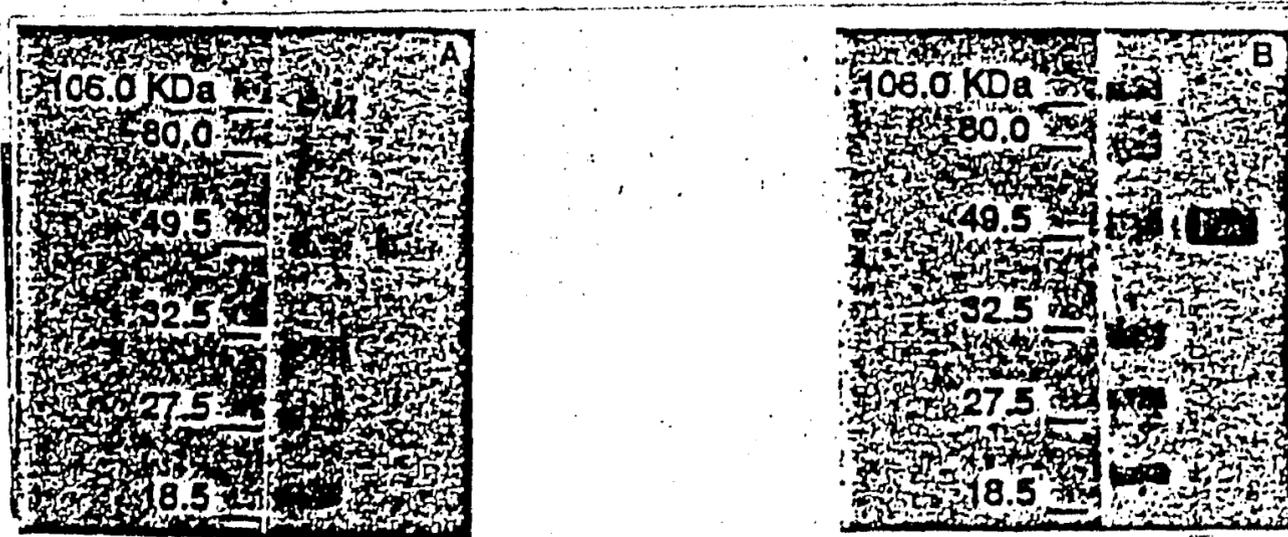


Figura 7. Electrotransferencia de la β_2 GP-I humana purificada a partir de plasma fresco normal. A Tinción con amido negro. B Inmuno tinción con un anticuerpo comercial a β_2 GP-I humana.

En la figura 8 se muestra la actividad aCL de los sueros 21 y 22 (tabla VIII) después de la inhibición con mCL y con mCL + β_2 GP-I. Los resultados muestran como al adsorber los sueros con mCL en presencia del cofactor se alcanzó un 90 % de inhibición de la actividad, en tanto que al inhibir con mCL sin β_2 GP-I el porcentaje de inhibición fue del 65% ($p < 0.05$). Los porcentajes de inhibición se obtuvieron comparando las DO_{405} de los sueros tratados con PBS con las DO_{405} de los mismos sueros adsorbidos con las mCL o mCL + β_2 GP-I.



Figura 8. Inhibición de la actividad aCL de los sueros 21 y 22 (tabla VIII) con micelas de cardiopina (mCL) o con micelas de cardiopina en presencia de β_2 -glicoproteína-I (mCL+ β_2 GP-I). Para comparación la figura muestra la actividad aCL de los sueros sin inhibir (PBS). Los resultados son el promedio de duplicados de dos ensayos.

Aparentemente las mCL forman un complejo con la β_2 GP-I y proporcionan el o los epítopes que reconocen los aCL no escondidos autoinmunes (aquellos que requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*) y los infecciosos (los que reconocen a los fosfolípidos propiamente dichos) de los pacientes con SaFP. Lo anterior se deduce de los requerimientos de β_2 GP-I que tienen los aCL-IgG que se eluyeron de las mCL- β_2 GP-I. Los aFL eluidos se pasaron por una columna de heparina-agarosa para eliminar la β_2 GP-I y las dos subpoblaciones de aCL no escondidos se separaron por adsorción con mCL en ausencia de β_2 GP-I. El eluido y el sobrenadante de las mCL se ensayaron en el ELISA modificado (libre de β_2 GP-I). La figura 9 muestra la caracterización de las subpoblaciones de aCL-IgG no escondidos que se detectaron en los dos pacientes con SaFP (21 y 22). Como se puede ver una subpoblación de aCL-IgG no escondidos reconoció a la CL de manera dosis-respuesta de la cantidad de β_2 GP-I adicionada al pozo y otra reconoció a la cardiopina en la placa de ELISA, de manera independiente de la concentración del cofactor presente.

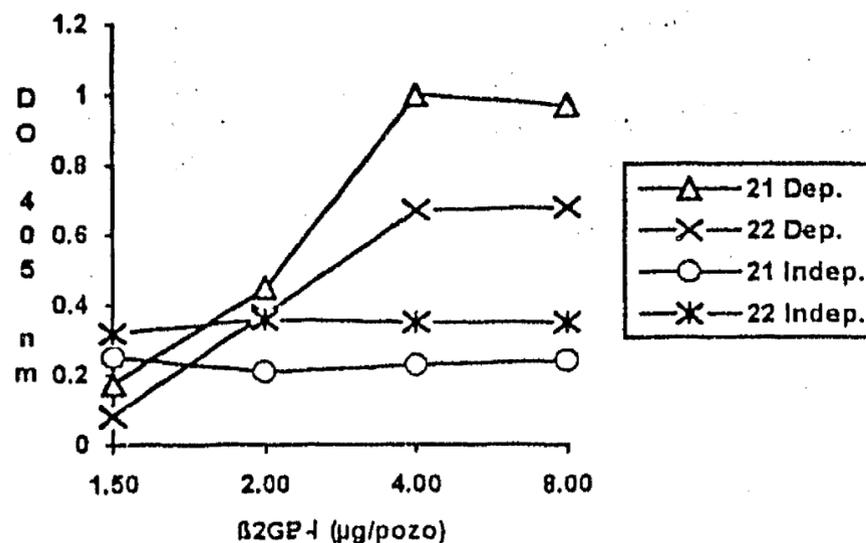


Figura 9. Caracterización de los aCL no escondidos de los pacientes con SaFP. Las placas de ELISA se sensibilizaron con CL y posteriormente se adicionó la β_2 GP-I a las concentraciones que se muestran en las abscisas. Las DO_{405} de los pozos que contenían sólo β_2 GP-I fueron 0.03 ± 0.03 . La concentración de aCL-IgG purificada (dependiente o independiente del cofactor) que se ensayó fue de 10μ g/pozo.

Es importante recalcar que no se detectó actividad $\alpha\beta_2$ GP-I libre de fosfolípidos, en ninguna de las dos subpoblaciones de aCL no escondidos de los pacientes con SaFP. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que existieran en el suero de estos pacientes anticuerpos $\alpha\beta_2$ GP-I libre de fosfolípidos. Los métodos de purificación y separación empleados no contemplaron en ningún momento el estudio de estos anticuerpos.

9.9.2 CARACTERIZACION DE LAS SUBPOBLACIONES DE aCLE DEL SUERO DE PACIENTES CON SaFP.

Los aCLE de los pacientes con SaFP (21 y 22) se purificaron a partir de los sueros depletados de los aCL no escondidos. Para liberar a los aCLE de su inhibidor termolábil se incubaron los sueros a 56 °C durante 30 minutos y se pasaron por una columna de cromatografía de proteína A-sefarosa. La figura 10 muestra como la incubación provocó un incremento de aproximadamente 10 veces la actividad aCL-IgG y como, al depletar los sueros de la fracción IgG (IgG1, IgG2 e IgG4) disminuyó la actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor.

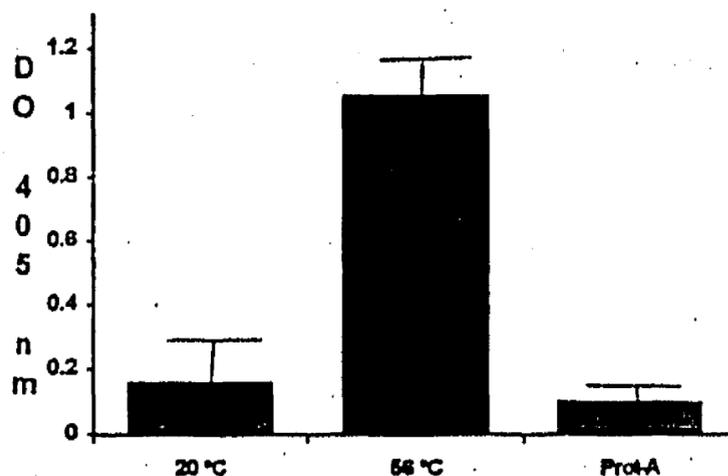


Figura 10. Purificación de los aCLE de los pacientes con SaFP (21 y 22) mediante columna de proteína A. La figura muestra la actividad aCL de los sueros depletados de los aCL no escondidos (20 °C) y la liberación de los aCLE cuando se trataron a 56 °C por 30 minutos (56 °C). La actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor se abatió depletando los sueros de la fracción IgG (Prote-A).

La fracción IgG (IgG1, IgG2 e IgG4) eluida de la columna de proteína A-sefarosa se adsorbió con micelas de cardioplipina en ausencia del cofactor. La actividad aCL del eluido y del sobrenadante de las mCL se estudió en el ELISA modificado. Como se muestra en la figura 11, se identificaron dos subpoblaciones de aCLE-IgG: una que fue detectable de manera dosis-dependiente de la presencia de la β_2 GP-I y otra que fue independiente de esta proteína para su detección *in vitro*.

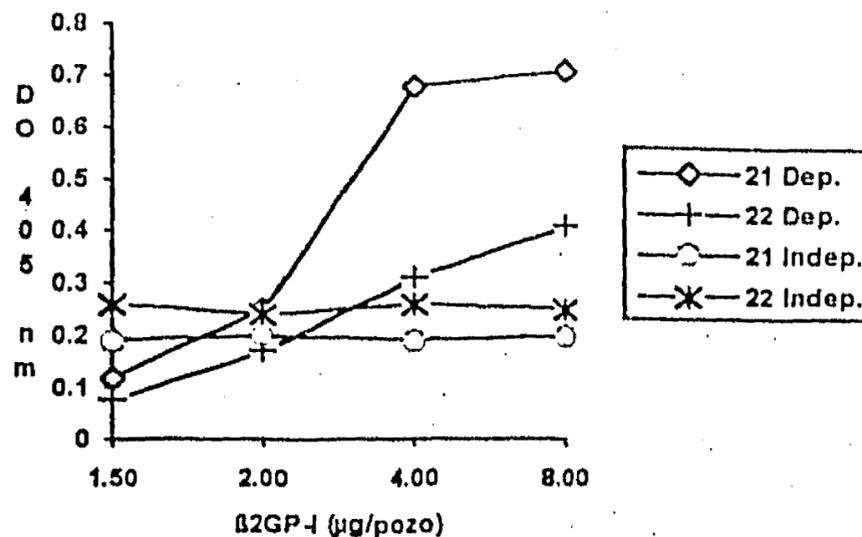


Figura 11. Caracterización de los aCLE de los pacientes con SaFP. Las placas de ELISA se sensibilizaron con CL y posteriormente se adicionó la β_2 GP-I a las concentraciones que se muestran en las abscisas. Las DO_{405} de los pozos que contenían sólo β_2 GP-I fueron 0.04 ± 0.03 . La concentración de aCL-IgG purificada (dependiente o independiente del cofactor) que se ensayó fue de $10 \mu\text{g/pozo}$.

Las placas de microELISA con las que se detectaron los aCLE se sensibilizaron con CL y posteriormente se adicionó la β_2 GP-I a las concentraciones que se muestran en las abscisas. Las DO de los pozos que contenían sólo β_2 GP-I fueron 0.04 ± 0.03 . La concentración de IgG purificada (aCLE-IgG dependiente e independiente del cofactor) que se ensayó por pozo fue de $10 \mu\text{g}$.

9.10 DETECCIÓN DE aFL EN LOS SUEROS DE RATONES NORMALES (BALB/C) Y EN LOS DE RATONES AUTOINMUNES (NZB).

Todos los ratones (normales y autoinmunes) tienen anticuerpos naturales de clase IgM que reconocen eritrocitos autólogos e isólogos tratados con bromelina (ERBr)^{43, 58}, procedimiento que expone la fosfatidilcolina (FTC) de la cara externa de la membrana del eritrocito^{1, 59, 60}. Estos anticuerpos se han encontrado también en otras especies como la rata, el conejo¹⁷⁰ y en el humano¹⁵⁸. Los anticuerpos que reconocen FTC son de isotipo IgM y los producen principalmente las células B Ly-1⁺ (CD5⁺), un subgrupo de células B al que se le atribuye la principal producción de autoanticuerpos naturales. Se ha postulado además, que estos anticuerpos tienen una importante función en la depuración de eritrocitos envejecidos o que han sufrido cambios en su integridad. Su papel fisiológico es muy importante ya que atraviesan la barrera filogenética de especies.

En el caso de los aCLE se desconoce si se encuentran presentes en el suero de otras especies. La detección de los aCLE en otras especies puede ayudar a esclarecer el origen y patogenia de los aCL, razón por la cual, estudiamos por ELISA 10 sueros de ratones BALB/C Y 10 sueros de ratones autoinmunes NZB, usando como antígeno CL, FTC, CL- β_2 GP-I y FTC- β_2 GP-I. La detección de los aCLE se hizo tratando una alícuota de

cada suero a 56 °C durante 30 minutos. La tabla IX muestra las DO de los aFL detectados en los sueros de los 20 ratones.

Como se puede ver los aCL-IgG se incrementaron sustancialmente en ambos grupos de ratones, al tratar los sueros a 56 °C durante 30 minutos. En los ratones NZB los aFL no escondidos están presentes a títulos más altos que en los balb/c. Al calentar los sueros los títulos se equipararon en ambos grupos. Con respecto a los aCL-IgM se observó que en los sueros de los ratones normales cuando se trataron con calor no se liberaron los aCLE, sin embargo, en los sueros de los ratones NZB los títulos de aCL-IgM se incrementaron 12 veces. Los títulos de aCL-IgM siempre fueron más altos en los sueros de los ratones NZB que en los sueros de los ratones balb/c (tanto en los tratados como en los no tratados a 56 °C durante 30 minutos).

TABLA IX
ACTIVIDAD aFL DE LOS SUEROS DE RATONES NORMALES Y AUTOINMUNES
(MEDIA±DE DO_{405nm})

GRUPO	CARDIOLIPINA		FOSFATIDILCOLINA	
	20 °C	56 °C	20 °C	56 °C
	IgG			
BALB/C (n=10)	0.12 ± 0.12	0.75 ± 0.40 [#]	0.05 ± 0.04	0.24 ± 0.15 [*]
NZB (n=10)	0.38 ± 0.22 ⁺	0.77 ± 0.30 ⁺⁺	0.06 ± 0.04	0.14 ± 0.06 ^{**}
	IgM			
BALB/C (n=10)	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.02
NZB (n=10)	0.25 ± 0.14 ^{&}	0.48 ± 0.14 ^{&&}	0.24 ± 0.14 [°]	0.15 ± 0.06 ^{°°}

p=0.0004 vs 20 °C; *p=0.002 vs balb/c; **p=0.003 vs 20 °C; &p=0.00005 vs balb/c; &&p=0.001 vs 20 °C; +p=0.0004 vs 20 °C; ++p=0.003 vs 20 °C; °p=0.001 vs balb/c y °°p=0.00002 vs balb/c.

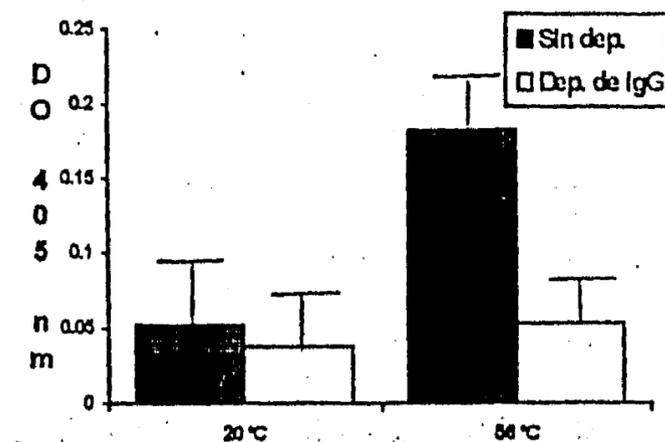
Como se puede observar las DO de los aFTC-IgG en los ratones normales se incrementaron aproximadamente 5 veces al tratar los sueros a 56 °C durante 30 minutos, en los sueros de los ratones NZB las DO también se incrementaron con respecto a los sueros sin tratar (el incremento fue de aproximadamente 8 veces). En los aFTC-IgM se observó un fenómeno diferente, tanto en los sueros de los ratones balb/c como en el de los NZB las DO de los aFTC bajaron después del tratamiento a 56°C durante 30 minutos. En los sueros no tratados con calor los ratones NZB tienen DO más altas de aFTC-IgM que los ratones normales balb/c. Aunque las DO en ambos grupos de estudio bajaron después de la incubación a 56°C durante 30 minutos, la diferencia se mantuvo.

9.10.1 CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD aFL POTENCIADA POR EL TRATAMIENTO A 56 °C DURANTE 30 MINUTOS (SUEROS MURINOS).

9.10.1.1 DEPLECION DE LA FRACCION IgG (IgG1, IgG2 E IgG4).

La figura 12 muestra el efecto que se observó al depletar los sueros murinos de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG4 por adsorción con proteína-A (columna de proteína A-sefarosa).

12a Sueros de ratones Balb/c



12b Sueros de ratones NZB

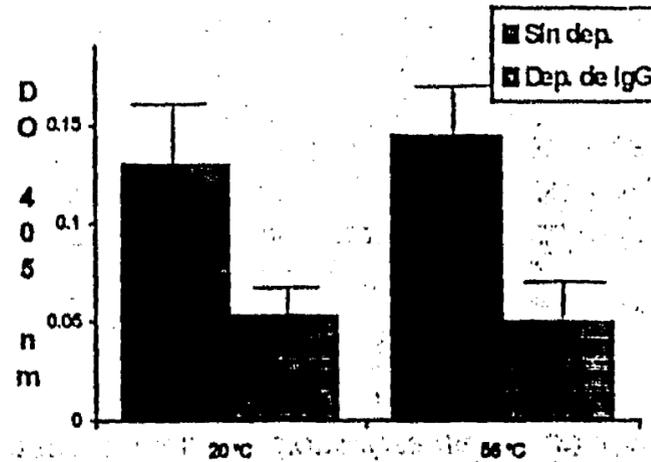


Figura 12. Inhibición de los aCL no escondidos y de los aCLE de los sueros de los ratones normales Balb/c y NZB. La figura 12a muestra la actividad aCL de los sueros de ratones normales balb/c sin tratar y tratados a 56 °C, 30', también muestra la pérdida de la actividad aCL potencia por calor cuando se depletaron los sueros de la fracción IgG. La figura 12b muestra la actividad de los aCL no escondidos de los sueros de ratones autoinmunes NZB sin tratar (20 °C) y adsorbidos exhaustivamente con mCL. Los sueros adsorbidos con mCL se trataron a 56 °C, 30' para observar la actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor. La actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor se abatió al depletar los sueros de la fracción IgG. Los resultados son el promedio de duplicados de dos ensayos.

La figura 12a muestra la actividad aCL de los sueros de los ratones normales balb/c sin tratar y tratados a 56 °C, 30'. Al depletar los sueros tratados a 56 °C, 30', de la fracción IgG se observó que la actividad aCL se abatió. La diferencia fue significativa cuando se compararon las DO_{405} de los sueros sin tratar con los sueros tratados a 56 °C, 30' ($p < 0.001$); y cuando se compararon los sueros tratados a 56 °C, 30' con los depletados de la fracción IgG. La figura 12b muestra la actividad aCL de los sueros de ratones autoinmunes NZB sin tratar y adsorbidos exhaustivamente con mCL, la diferencia fue significativa ($p < 0.001$). Los sueros adsorbidos con mCL se trataron a 56 °C, 30' para observar la actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor, la diferencia fue significativa ($p < 0.001$). La actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor se abatió al depletar los sueros de la fracción IgG, la diferencia fue significativa ($p < 0.001$).

En el caso de los ratones autoinmunes NZB en los que existen aCL no escondidos el fenómeno de liberación de los aCLE no se pudo observar a menos de que se eliminaran los aCL no escondidos, por tal motivo, los sueros de los ratones NZB se adsorbieron previamente con mCL, hasta eliminar la actividad aCL. Posteriormente se calentaron los sueros y se observó la liberación de los aCLE. Al depletar los sueros -preadsorbidos con mCL y calentados- de la fracción IgG se observó también que la actividad aCL se abatió.

Los resultados presentados en las figuras anteriores muestran que la actividad aCL proporcionada por los aCLE que se encontraron presentes en los sueros de los ratones tanto normales como autoinmunes, se debe a aCLE de isotipo IgG, como en los humanos.

9.10.1.2 INHIBICION DE LA ACTIVIDAD aCL CON mCL

Una alícuota de cada suero de ambos grupos se calentó a 56 °C durante 30 minutos y se inhibió con mCL, la actividad aCL resultante del tratamiento se midió en el ELISA convencional y se comparó con los sueros sin tratar. Los resultados se muestran en la figura 13. La actividad aCL sólo se observó en los sueros de los ratones normales después del tratamiento a 56 °C, dicha actividad fue inhibida en más de un 90 % en promedio al adsorber los sueros con mCL (figura 13a). En los sueros de los ratones NZB se detectaron aCL no escondidos a títulos relativamente altos, los cuales fueron adsorbidos con mCL (figura 13b), al calentar los sueros a 56 °C durante 30 minutos, la actividad aCL se potenció en ambos grupos de sueros. La actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor se abatió por completo al adsorber nuevamente los sueros con mCL. Los resultados muestran que el efecto de potenciación de la actividad aCL que se observó por el tratamiento a 56 °C durante 30 minutos de los sueros de ratones Balb/c y NZB es muy similar al observado en el humano, es decir, esta dado por inmunoglobulinas de isotipo IgG y es inhibido con mCL.

Ratones

12a Sueros de ratones Balb/c

12b Sueros de ratones NZB

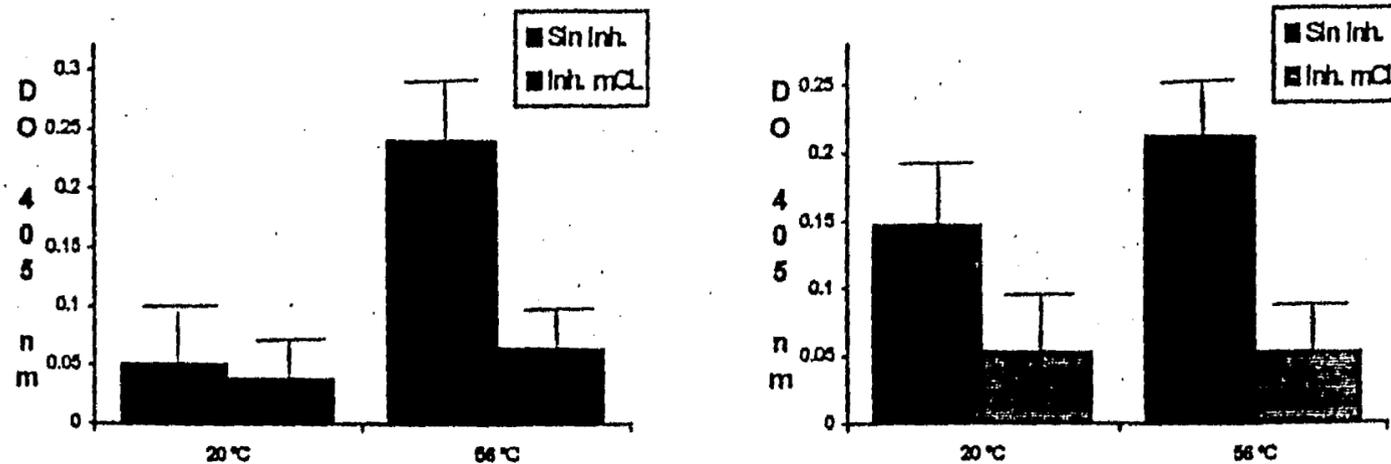


Figura 13. Inhibición de los aCL no escondidos y de los aCLE de los sueros de los ratones normales Balb/c y NZB con mCL. La figura 13a muestra la actividad aCL de los sueros de ratones normales balb/c sin tratar y tratados a 56 °C, 30'. La adsorción con mCL abate la actividad aCL potenciada por el tratamiento a 56 °C, 30'. La figura 13b muestra la actividad de los aCL no escondidos de los sueros de ratones autoinmunes NZB sin tratar. Al adsorber los sueros sin tratar mCL la aCL se negativizó. Los sueros adsorbidos con mCL se trataron a 56 °C, 30' para observar la actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor, dicha actividad también se negativizó al adsorber los sueros tratados a 56 °C, 30 minutos con mCL. Los resultados son el promedio de duplicados de dos ensayos.

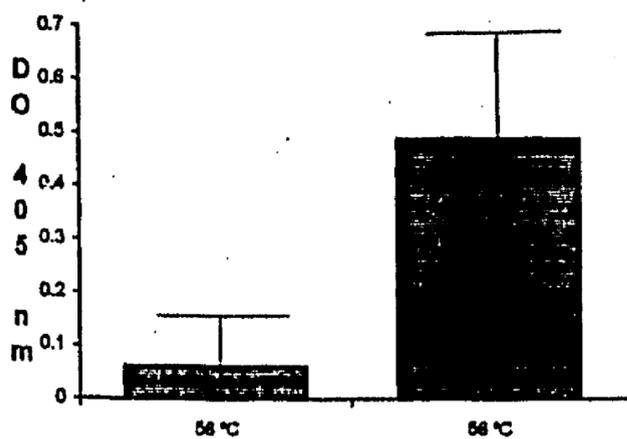
La figura 13a muestra como la actividad aCL potenciada por el tratamiento a 56 °C durante 30 minutos se negativiza cuando se adsorben los sueros de manera exhaustiva con mCL, la diferencia fue significativa cuando se compararon los sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos con los mismos sueros calentados y después adsorbidos con mCL ($p < 0.001$). La figura 13b muestra los resultados de la adsorción de los aCL no escondidos de los sueros de los ratones NZB, los cuales reconocieron la estructura formada por la CL en solución acuosa (micelas), la diferencia fue significativa cuando se compararon los títulos de aCL no escondidos de los sueros sin tratar con los adsorbidos con mCL ($p < 0.01$). Los aCLE de los ratones NZB también reconocieron a la cardiolipina de las micelas, pues como lo muestran los resultados los títulos se abatieron al adsorber los sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos, la diferencia fue significativa ($p < 0.01$).

9.10.1.3 REQUERIMIENTO DE β_2 GP-I POR LOS aCLE DE LOS RATONES BALB/C Y NZB

Para determinar los requerimientos del cofactor por los aFL detectados en los sueros de los ratones normales balb/c y NZB, se estudiaron ambos grupos en el ELISA estandar y el modificado (libre de β_2 GP-I exógena). La figura 14 muestra los resultados obtenidos. Como se puede ver, no se observó diferencia significativa al detectar los aFL en presencia (figura 14a) o ausencia de β_2 GP-I (figura 14b) en los sueros de los ratones normales balb/c. Cabe recalcar que en este grupo de sueros solo se detectaron aCL después del tratamiento de los sueros a 56 °C durante 30 minutos.

Sueros de ratones Balb/c

14a Liberación por calor de aCL ocultos (ELISA estandar)



14b Liberación por calor de aCL ocultos (ELISA modificado)

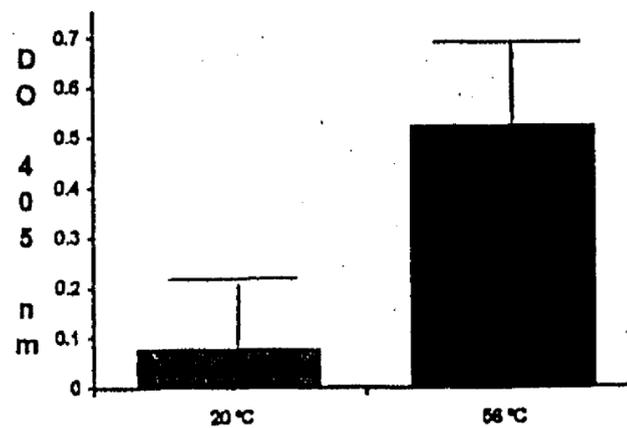


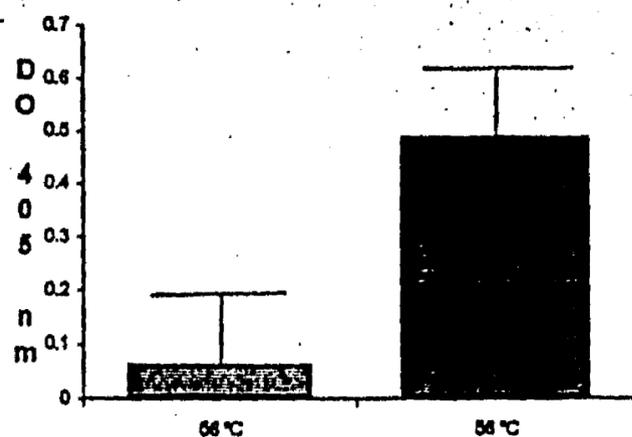
Figura 14. Requerimientos de β_2 GP-I por los aCL no escondidos y aCLE de los sueros de los ratones normales Balb/c. La figura 14a muestra la actividad aCL de los anticuerpos aCL no escondidos (20°C) y ocultos (56 °C) en presencia de β_2 GP-I exógena (ensayo estandar). La figura 14b muestra la actividad aCL de los aCL no escondidos (20 °C) y ocultos (56°C) en ausencia de β_2 GP-I exógena (ensayo modificado). No se observó

diferencia significativa al detectar la actividad aCL de los aCL no escondidos u ocultos en presencia o ausencia de β_2 GP-I.

En los ratones NZB, las DO_{405} fueron en promedio mayores en los sueros sin tratar comparados con los sueros de los ratones normales en las mismas condiciones ($p < 0.01$), no se observó diferencia significativa en los títulos de aCLE de los ratones autoinmunes comparados con los de los ratones normales. La figura 15 muestra los estudios de dependencia de la β_2 GP-I por los aFL detectados en los sueros de los ratones NZB. Como se puede ver los aFL no escondidos y ocultos no requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*. Es importante mencionar que la cepa de ratones autoinmunes NZB no presentan manifestaciones trombóticas.

Sueros de ratones NZB

15a Liberación por calor de aCL ocultos (ELISA estándar)



15b Liberación por calor de aCL ocultos (ELISA modificado)

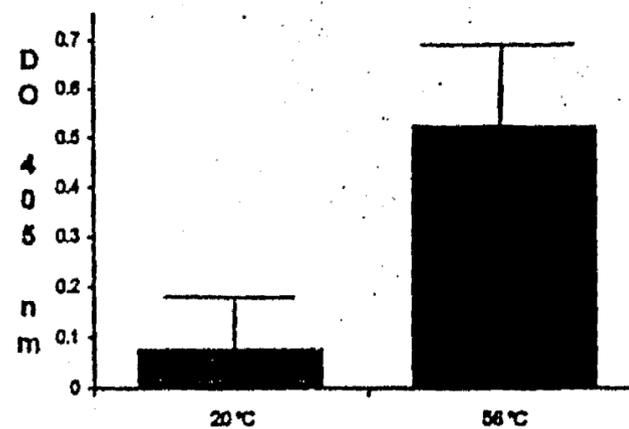


Figura 15. Requerimientos de β_2 GP-I por los aCL no escondidos y aCLE de los sueros de los ratones autoinmunes NZB. La figura 15a muestra la actividad aCL de los anticuerpos no escondidos (20°C) y ocultos (56 °C) en presencia de β_2 GP-I exógena (ensayo estándar). La figura 15b muestra la actividad aCL de los anticuerpos no escondidos (20 °C) y ocultos (56°C) en ausencia de β_2 GP-I exógena (ensayo modificado). No se observó diferencia significativa al detectar la actividad aCL de los aCL no escondidos u ocultos en presencia o ausencia de β_2 GP-I. Los ratones NZB tienen aCL séricos positivos sin manifestaciones trombóticas.

9.11 Reactividad de los aCLE contra fosfolípidos (estudios en humanos).

En un grupo de 25 sueros de sujetos clínicamente sanos se estudió la reactividad de los aCLE contra otros fosfolípidos. Los sueros se trataron a 56 °C durante 30 minutos y se estudiaron en el ELISA estándar contra los fosfolípidos tanto aniónicos como neutros. Se estudió además la reactividad contra la fosforicolina que es la cabeza polar de la FTC;

contra el ácido fosfatídico y el fosfatidilglicerol que son los intermediarios importantes en la síntesis de los fosfoglicéridos. En la figura 16 se muestra el esquema de reactividades de los aCLE contra los diferentes fosfolípidos. Como se puede ver el reconocimiento de los diferentes fosfolípidos es mayor después del tratamiento de los sueros a 56 °C durante 30 minutos, el aumento en promedio fue de 2.5 ± 0.45 DO₄₀₅. La desviación estándar es pequeña, lo que sugiere que el fenómeno que estamos observando es reactividad cruzada por el reconocimiento de epítopes comunes de las moléculas de fosfolípidos.

Analizamos los datos con la prueba *t* de student para muestras pareadas (tabla X). Como se puede ver el incremento en el reconocimiento de los fosfolípidos, debido a la "liberación" de los aCLE por el tratamiento con calor, es estadísticamente significativo en todos los casos.

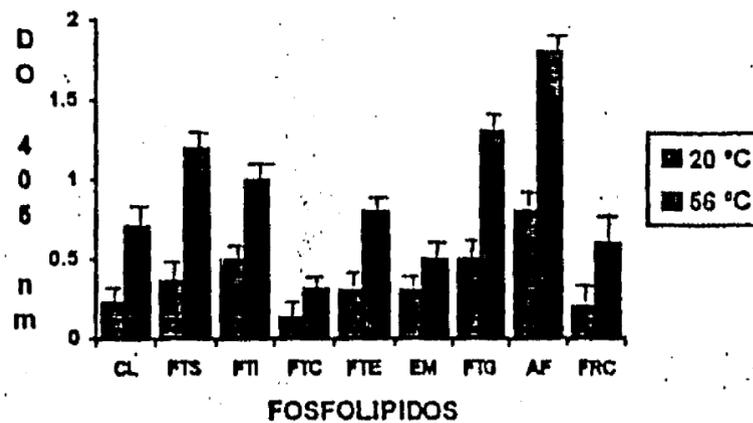


Figura 16. Reactividad de los aCLE de sujetos sanos contra fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos. Los resultados son el promedio de tres determinaciones. CL=cardiolipina; FTS=fosfatidilserina; FTI = fosfatidilcolina inositol; FTC=fosfatidilcolina; FTE=fosfatidiletanolamina; EM=esfingomielina mielina; FTG=fosfatidilglicerol; AF=ácido fosfatídico y FRC=fosforilcolina.

Tabla X.
Análisis estadístico de los 25 sueros humanos normales estudiados*.

FOSFOLIPIDOS	20 °C [‡]	56 °C [‡]	t [§]	valor de P [¶]
CL	0.23±0.17	0.71±0.20	5.97	=10 ⁻⁴
FTS	0.36±0.13	1.18±0.32	7.51	<10 ⁻⁶
FTI	0.48±0.13	1.03±0.16	8.31	=10 ⁻⁶
FTC	0.13±0.04	0.31±0.06	7.48	<10 ⁻⁶
FTE	0.29±0.11	0.81±0.23	6.58	<10 ⁻⁶
FTG	0.53±0.13	1.27±0.24	8.48	<10 ⁻⁶
AF	0.83±0.26	1.83±0.17	10.2	<10 ⁻⁶
FRC	0.25±0.08	0.65±0.18	6.29	<10 ⁻⁶
EM	0.26±0.08	0.52±0.16	4.57	=10 ⁻⁴

* Los resultados son el promedio de dos ensayos.

‡ Media ± D.E. de las densidades ópticas de las muestras leídas a 405 nm.

§ Prueba *t* de student pareada.

¶ Valores de P para la prueba *t* de student.

Para comprobar la reactividad cruzada de los aCLE se inhibieron exhaustivamente los sueros con micelas de cardioplipina (mCL). Los resultados se muestran en la tabla XI, el análisis estadístico se hizo mediante la prueba *t* de student, y en los casos en los que una o más de las premisas para la prueba *t* no se cumplieron se usó la prueba U de Mann-whitney.

Tabla XI
Actividad anti-fosfolípidos remanente de los sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos e inhibidos con micelas de cardioplipina*.

FL	Sin Inh.‡	Inh.‡	% de Inh.	t/T§	Valor P*
CL	0.79±0.08	0.09±0.02	88.5	155	<10 ⁻⁴
FTS	1.16±0.18	0.10±0.05	91.1	155	<10 ⁻⁴
FTI	0.93±0.11	0.13±0.04	86.5	155	<10 ⁻⁴
FTC	0.32±0.08	0.32±0.07	1.2	155	NS#
FTE	0.76±0.14	0.10±0.03	86.3	155	<10 ⁻⁴
FTG	1.11±0.11	0.25±0.05	77.6	23.3	<10 ⁻⁴
AF	1.45±0.25	0.22±0.04	84.5	155	<10 ⁻⁴
FRC	0.45±0.09	0.44±0.10	4.2	155	NS
EM	0.49±0.06	0.09±0.02	81.0	155	<10 ⁻⁴

* Los resultados son el promedio de duplicados.

‡ Media ± D.E. de las DO₄₀₅ nm de las muestras.

§ Valor de *t* para la prueba *t* de student, o T de U de Mann-Whitney en caso necesario.

* Valores de P.

No significativo.

Como se puede ver, las DO se abaten prácticamente en su totalidad, lo que sugiere que los aCLE reconocen un epitope común de las moléculas de fosfolípidos, que puede ser el glicerol, los ácidos grasos y/o el grupo fosfodiéster que son los epitopes comunes de los fosfolípidos tanto aniónicos (CL, FTS y FTI) como neutros (FTC, FTE y EM). Los aFL liberados por el tratamiento con calor que reconocen a la FTC y su cabeza polar, la FRC, no se inhiben con las micelas de cardioplipina, probablemente por que son un grupo de aCLE que reconocen o reaccionan con mayor especificidad contra la cabeza polar de la FTC. Para probar el punto anterior se inhibió otra alícuota de los sueros pretratados a 56 °C durante 30 minutos, pero ahora con micelas de FTC y con FRC disuelta en PBS posteriormente se determinó la actividad aFTC y aFRC remanente por ELISA (figura 17).

Cuando se inhibieron los sueros con micelas de FTC, el reconocimiento de éstos a la FTC y a la FRC en fase sólida, disminuyó de forma importante ($p < 10^{-4}$ en ambos casos). Al inhibir los sueros con la cabeza polar de la FTC, es decir, con la FRC no se observó ningún cambio en las actividades aFTC ni aFRC, probablemente porque estos anticuerpos reconocen a la cabeza polar unida al grupo fosfodiéster. Es posible también, que la molécula de FRC en fase líquida tenga una conformación tridimensional diferente a la que toma cuando está adherida a la placa de microELISA (fase sólida) y que los aCLE no la reconozcan en la conformación soluble. La diferencia en las DO observadas en el reconocimiento de la FTC comparadas con las observadas en el reconocimiento de la FRC, se puede explicar tomando en cuenta los tamaños de ambas moléculas. La FRC es mucho más pequeña que la FTC, por lo que al sensibilizar los pozos de la placa de microELISA

con 50 μ l de una solución de 50 μ g/ml de cada molécula, estamos agregando más moléculas de FRC que de FTC por pozo. Dicho de otra manera existe más antígeno en un pozo sensibilizado con FRC que con FTC.

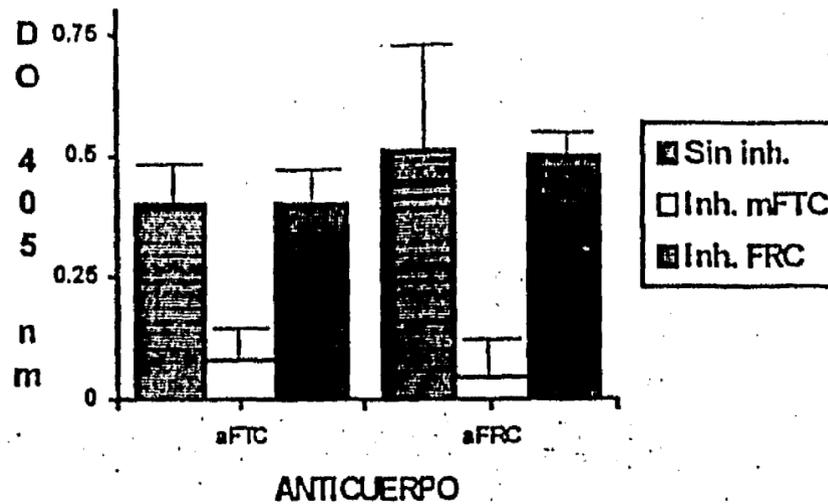


Figura 17. Actividad remanente de los 25 sueros humanos normales pretratados a 56 °C durante 30 minutos e inhibidos con mFTC, FRC y ensayados contra FTC y FRC en el ELISA. FTC=fosfatidilcolina y FRC =fosforilcolina.

En el trabajo publicado recientemente por Kouts y colaboradores¹⁷¹, estudiaron el tipo de interacciones que participan en el reconocimiento de los aFL inducidos en conejos a los que se les inmunizó con β_2 gGP-I humana. Los aFL producidos reaccionaron contra FL de carga negativa y contra β_2 GP-I. El mismo tipo de reconocimiento se observó en anticuerpos monoclonales de conejo anti- β_2 GP-I. Los autores demostraron que la reactividad contra los FL involucra principalmente fuerzas iónicas, mientras que contra la β_2 GP-I las interacciones son de otro tipo (enlaces puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y uniones hidrófobas). Lo anterior sugiere que el reconocimiento de los FL por los aFL "autoinmunes" es inespecífico y que esta dado exclusivamente por fuerzas electrostáticas. Extrapolando los resultados del estudio anterior a nuestra investigación, los aFL "ocultos" bien pueden ser anticuerpos "catiónicos" con reactividad cruzada por cargas. Para probar esta hipótesis se estudiaron los 25 sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos diluidos en un amortiguador de fuerza iónica alta (PBS, 1.5 M NaCL), para eliminar la participación de las fuerzas electrostáticas en el reconocimiento de los aCLE por los FL tanto aniónicos como neutros (figura 18).

Como se puede ver el reconocimiento de los FL con los que están sensibilizadas las placas de microELISA no se ve afectado por la presencia del amortiguador hipermolar en el líquido de reacción, lo que sugiere que en dicho reconocimiento participan además de fuerzas electrostáticas, enlaces puente de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y uniones hidrófobas. Estas últimas son las fuerzas de mayor energía que participan en la unión de los antígenos con los anticuerpos.

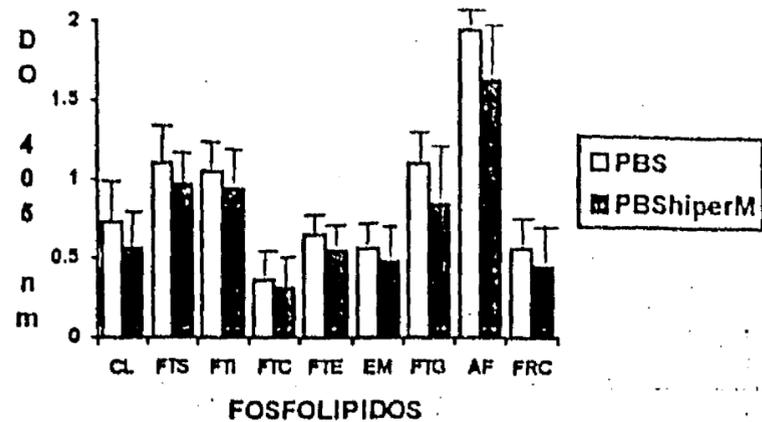


Figura 18. Efecto de un amortiguador de fuerza iónica alta (PBS 1.5 M NaCl) en la solución de reacción de los aFL "ocultos". Pozos sensibilizados con FL aniónicos y neutros. Los resultados son el promedio de de dos determinaciones. CL = cardiolipina; FTS = fosfatidilserina; FTI = fosfatidilinositol; FTC = fosfatidilcolina; FTE = fosfatidiletanolamina; EM = esfingomielina; FTG = fosfatidilglicerol; AF = ácido fosfátídico y FRC = fosforilcolina. No se encontró, diferencia significativa en presencia del amortiguador hipermolar.

9.12 Reactividad de los aCLE de sujetos sanos contra otros antígenos.

Se estudió la reactividad cruzada de los aCLE en el grupo de 25 sueros humanos normales. Por ELISA se determinó la reactividad contra DNACd, DNACs y la actividad de factor reumatoide¹⁵⁸ (tabla XII). Para la presente investigación se consideró que un estudio de reactividad contra antígenos tanto nucleares como citoplásmicos en células HEp-2 podría proporcionar información importante con respecto a la reactividad cruzada de los aCLE contra antígenos no fosfolipídicos. Los resultados del estudio se muestran resumidos en la tabla XII.

Tenemos datos que muestran que en los sueros de sujetos clínicamente sanos circulan anticuerpos anti-fosfatidilcolina (FTC) a títulos relativamente bajos. Estos anticuerpos tienen reactividad cruzada con una proteína constitutiva del citoesqueleto celular llamada vimentina¹⁵⁸. Los aFTC son de isotipo IgM y tienen características de autoanticuerpos naturales. En la tabla XII se muestran los resultados obtenidos del estudio la reactividad de los aCLE contra vimentina mediante dos técnicas inmuno-enzimáticas el Inmunopunto (IP) y la electroinmunotransferencia (EIT).

Tabla XII
Reactividad de los aCLE de sujetos sanos contra otros antígenos.

Reactividad contra*	20° C DO ₄₀₅ nm	56 °C DO ₄₀₅ nm	Control (+)	SHN Control (-)	Valores de P†
DNACd	0.059±0.01	0.061±0.01	0.743±0.02 [‡]	0.057±0.003	NS
DNACS	0.115±0.01	0.116±0.02	0.542±0.02 [‡]	0.107±0.010	NS
FR	0.235±0.02	0.237±0.01	1.91±0.05 [#]	0.224±0.008	NS
IFI (HEp-2)	Neg	Neg	Hom. 1:160 [‡]	Neg	—
Vimentina (IP) [‡]	Neg	Neg	Positivo [‡]	Neg	—
Vimentina (EIT)	Neg	Neg	Positivo [‡]	Neg	—

* n = 25

† Valores de P para la prueba de t de student. NS = No significativo.

‡ Suero de paciente con LEG activo.

Suero de paciente con AR seropositiva.

‡ IP = Inmunopunto.

§ EIT = Electroinmunotransferencia.

‡ Control (+) = Anticuerpo monoclonal. Clona V9 (SIGMA).

Los resultados de la tabla XII claramente muestran que no existe reactividad cruzada de los aCLE contra otros antígenos no fosfolípidicos. El hecho de que no se reconozcan estructuras compuestas por fosfolípidos en las células HEp-2 probablemente se debe a que en el proceso de permeado con solventes orgánicos, estas estructuras se modifican dejando fosfolípidos modificados o en concentraciones bajas que no dan un patrón de fluorescencia con la suficiente intensidad como para ser detectado. No existe tampoco reactividad cruzada con estructuras cargadas negativamente como el DNACd o el DNACS lo que corrobora los resultados encontrados al estudiar el tipo de fuerzas que participan en el reconocimiento de los aFL por los FL. Con los resultados presentados en el apartado 9.11 se infiere que los aCLE son oligorreactivos ya que tienen reactividad cruzada sólo con fosfolípidos tanto aniónicos como zwitteriónicos y no con otros antígenos intra y extracelulares, tampoco son factores reumatoides ocultos, son un grupo de autoanticuerpos con características propias que viajan en la circulación inhibidos por un factor termolábil que no es la β_2 GP-I.

9.13 Reactividad de los aCLE contra los fosfolípidos que participan en las reacciones de la cascada de la coagulación.

Los aFL se pueden detectar por tres métodos dependiendo de su reactividad. Uno de los métodos es la prueba de floculación del VDRL, en la que el antígeno está compuesto por fosfatidilcolina, cardiolipina y colesterol en proporciones variables. El otro método es el ELISA con el que se pueden detectar en forma diferencial los aFL y su isotipo, que reconocen FL aniónicos y/o neutros. El tercer método detecta a los aFL que interfieren con las pruebas de la coagulación dependientes de fosfolípidos en presencia exclusivamente de plasma humano¹⁵⁰. Las pruebas más difundidas que miden la presencia del anticoagulante lúpico son: el tiempo de protrombina (TP), el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTa) y el tiempo de veneno de víbora de Russell (TVVR)¹⁷². Hasta la fecha existen controversias con respecto a lo que se considera TP, TPTa y TVVR aumentados como consecuencia de la presencia de aFL patogénicos circulantes en el plasma o suero de los pacientes con manifestaciones tromboticas o hemocitopénicas asociadas a los aFL. Como el objetivo de nuestra investigación no es dar solución al problema anterior, sino estudiar si los aCLE tienen reactividad contra los fosfolípidos que participan en la cascada de la coagulación, aplicamos un sistema de autocontroles que consistió en mezclar sueros frescos normales en una proporción 1:1 con plasma fresco normal (PFN) pobre en plaquetas y medir por quintuplicado el TP y TPTa, los tiempos así obtenidos sirvieron de control para los mismos sueros, pero ahora tratados a 56 °C durante 30 minutos. Para corroborar que el TP y el TPTa se prolongó por los aCLE liberados, se realizaron nuevas mediciones, pero ahora con los mismos sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos e inhibidos exhaustivamente con micelas de CL, los resultados de las determinaciones se muestran en en la tabla XIII.

Tabla XIII
Reactividad de los aCLE contra los fosfolípidos que participan en la cascada de la coagulación.

Muestra ^a	TP (s)	TPTa (s)
PFN	13.3 ± 0.21	41.6 ± 3.30
PFN + a (1:1)	57.3 ± 2.52	122.0 ± 5.41
PFN + b (1:1)	58.4 ± 5.90	137.1 ± 10.5
PFN + c (1:1)	> 250	> 250
PFN + d (1:1)	98.1 ± 20.31	181.0 ± 27.5
PFN + e (1:1)	> 250	> 250

n = 10; **a** PBS; **b** Sueros humanos normales (SHN's); **c** SHN's calentados a 56 °C, 30 min.; **d** SHN's calentados a 56 °C, 30 min. e inhibidos 10 veces con mCL; y **e** SHN's calentados a 56 °C, 30 min. e inhibidos 10 veces con mCL y calentados nuevamente a 56 °C, 30 min.

La tabla XIII muestra los tiempos de formación del coágulo de fibrina, de dos técnicas que miden las reacciones de coagulación dependientes de fosfolípidos (TP y TPTa) en plasmas frescos normales pobres en plaquetas (PFN). Cuando se diluyeron los plasmas (PFN + PBS) con amortiguador de fosfatos (PBS) los tiempos de las pruebas se alargaron probablemente por que todas las proteínas y otros factores que participan en el

proceso de formación del coágulo de fibrina se diluyeron. El mismo fenómeno se observó al diluir los plasmas frescos pobres en plaquetas con sueros humanos normales (PFN + SHN), en los que se consumieron las proteínas y factores de la coagulación. Cuando los plasmas frescos se diluyeron con sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos (PFN + SHN_{56 °C, 30 min}) los tiempos de coagulación se prolongaron por más de 250 segundos (tiempo en el que el fibrómetro se detienen e indica falla). Al inhibir exhaustivamente los sueros humanos normales precalentados con micelas de cardiopina (PFN + SHN_{56 °C, 30 min} Inh mCL), los tiempos se abaten alcanzando prácticamente el tiempo de su control (PFN + SHN). Las diferencias se pueden explicar por la dilución extra que sufren los sueros al inhibirse con las micelas de cardiopina, que aunque ésta es mínima se refleja en los tiempos finales comparados con sus controles. Como se mostró en resultados anteriores, al calentar una segunda vez los sueros inhibidos con micelas de cardiopina el complejo formado por aCLE-mCL aparentemente se rompe, ya que se observó nuevamente un incremento en los tiempos de coagulación del plasma fresco normal.

En un sistema semi-purificado se repitieron los ensayos anteriores, se purificaron de 5 sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos la fracción IgG por columna de proteína-A. Como el intervalo de concentración para IgG sérica en el Laboratorio de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán es de 846.9 a 1868.9 mg/dl, se ajustó la concentración de nuestras IgG's puras a 1357.55 mg/dl en PBS y se mezclaron 1:1 con plasmas frescos normales pobres en plaquetas para determinar el efecto de los aCLE semi-purificados sobre el TP y el TPTa (tabla XIV).

Tabla XIV
Reactividad de los aCLE contra los fosfolípidos que participan en la cascada de la coagulación (sistema semi-purificado).

Muestra [#]	TP (s)	TPTa (s)
PFN	13.8 ± 0.33	45.6 ± 2.75
PFN + a	55.7 ± 3.56	138.0 ± 4.51
PFN + b	> 250	> 250
PFN + c	89.9 ± 17.31	187.0 ± 15.0
PFN + d	98.2 ± 11.75	169.3 ± 13.5

n = 5; a PBS; b IgG's purificadas de 5 sueros, ensayadas en forma independiente y por quintuplicado; c IgG's inhibidas con mCL; d IgG's inhibidas con mFTS.

Como se muestra en la tabla anterior, en el sistema semi-purificado se repite el fenómeno de prolongación del TP y TPTa por la presencia de los aCLE de sueros de sujetos sanos. La fracción IgG pura prolonga los tiempos de las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos (TP y TPTa). Al inhibir las IgG's, exhaustivamente con micelas de cardiopina o de fosfatidilserina (PFN + IgG's inh. con mCL ó PFN + IgG's inh. mFTS respectivamente) los tiempos de ambas pruebas disminuyeron, sin llegar a los valores de

los controles (PFN + PBS), y no se observó diferencia significativa con ninguno de los dos fosfolípidos. Cuando se agregaron mCL a diferentes concentraciones, no se inhibió el efecto anticoagulante de las IgG's purificadas de manera dosis-respuesta, la inhibición se alcanzó abruptamente hasta concentraciones de 0.5 mg/ml (figura 19).

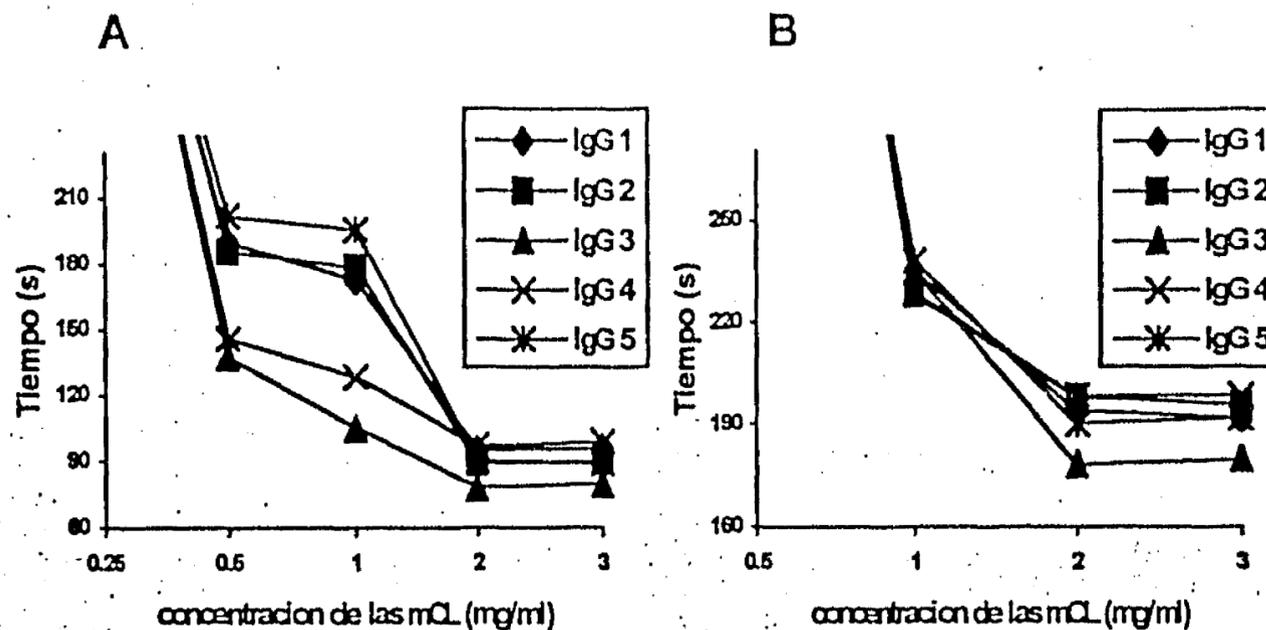


Figura 19. Inhibición con mCL del efecto anticoagulante de 5 IgG's purificadas de sueros tratados a 56 °C durante 30 minutos. La figura 19A muestra el TP en segundos de las IgG's inhibidas con diferentes concentraciones de mCL. La figura 19B muestra el TPTa de las IgG's inhibidas con diferentes concentraciones de mCL. La concentración de las IgG's se ajustó a 1357.5 mg/ml y se mezclaron V/V con plasmas frescos normales. Las concentraciones de mCL partieron de 0.004 mg/ml hasta 3 mg/ml, para simplificar la gráfica sólo se muestran las diluciones en las cuales se observó un efecto inhibitorio.

La gráfica muestra una caída abrupta en el TP y TPTa a concentraciones próximas a 0.5 mg/ml de micelas de cardiopina, no se observó una curva dosis-respuesta dependiente de la concentración de micelas, fenómeno que posiblemente se debió a la conformación que toman las moléculas de cardiopina en solución acuosa. A concentraciones grandes de cardiopina en solución la estructura que probablemente se forma es similar a un liposoma, es decir un centro hidrófobo con su superficie exterior hidrofílica, relativamente simétrico que proporciona a los aCLE una estructura reconocible y a la cual se unen estos aFL. Cuando las concentraciones de cardiopina son bajas las estructuras que se forman son muy heterogéneas y no son reconocidas por los aCLE.

Cuando se ensayaron los mismos sistemas variando las proporciones de PFNpp y de SHN_{56°C, 30 min} o de IgG's_{56°C, 30 min} se observó que el tiempo de formación del coágulo de fibrina depende de la cantidad de aCLE (provenientes de los SHN_{56°C, 30 min} o de las IgG's_{56°C, 30 min}) de manera dosis dependiente. En estos experimentos se partió de una dilución 1:1 hasta diluciones 1:1024 de los SHN's_{56°C, 30 min} y de 678.77 mg/ml hasta 0.66 mg/ml de las IgG's_{56°C, 30 min} (figura 20).

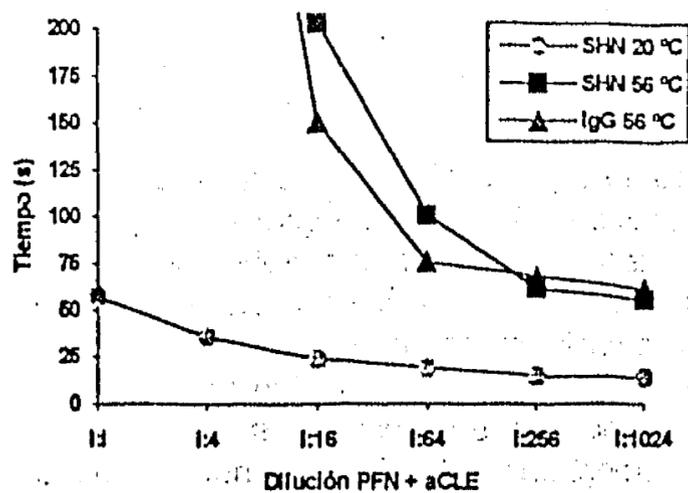


Figura 20. Curva dosis-respuesta que muestra el efecto de la cantidad de aCLE sobre el tiempo de protrombina (TP) de PFNpp. Relación PFNpp + SHN (n = 10) y PFNpp + IgG's (n = 5). TP del PFN = 13.3 ± 0.21 , y de las mezclas (V/V): PFNpp + PBS = 57.3 ± 2.52 ; PFN + SHN = 58.4 ± 5.90 .

Como se puede ver en la figura anterior, cuando la cantidad de aCLE (de SHN_{56 °C}, 30 min o de IgG's_{56 °C}, 30 min) disminuyó, los fosfolípidos del PFNpp saturaron los sitios de reconocimiento de los aFL presentes y éstos mostraron cada vez menos capacidad de prolongación del TP (figura 20) y del TPTa (figura 21). No se consideró necesario aumentar la proporción de SHN's_{56 °C}, 30 min o de IgG's_{56 °C}, 30 min, dado que a la dilución de la cual partimos (1:1 de los SHN_{56 °C}, 30 min o 678.77 mg/ml de las IgG's_{56 °C}, 30 min) el TP y el TPTa del PFNpp se prolongó prácticamente hasta el infinito.

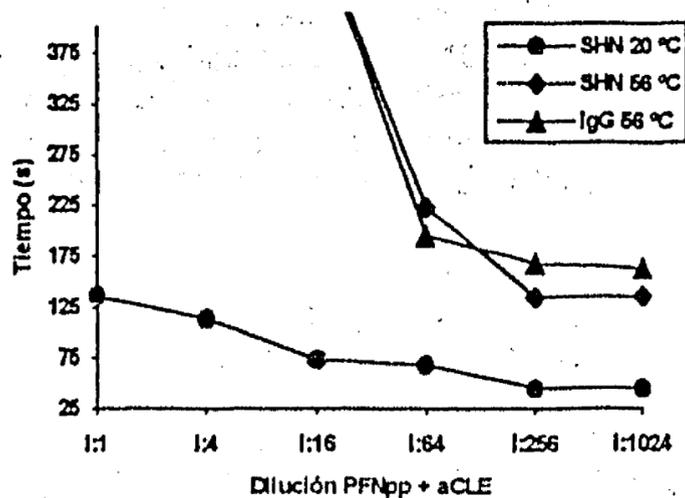


Figura 21. Curva dosis-respuesta que muestra el efecto de la cantidad de aCLE sobre el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTa) de PFNpp. Relación PFNpp + SHN (n = 10); PFNpp + IgG's (n = 5). TPTa del PFN = 41.6 ± 3.30 , y de las mezclas (V/V): PFNpp + PBS = 122.0 ± 5.41 ; PFN + SHN = 137.1 ± 10.5 .

9.14 Tratamientos que rompen el complejo aCLE-inhibidor.

La unión del antígeno con el anticuerpo tiene lugar a través de la formación de múltiples puentes no covalentes entre el antígeno y los aminoácidos del sitio de combinación del anticuerpo. Aunque las fuerzas de atracción (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de Van der Waals e hidrófobas) involucradas en estas uniones son individualmente débiles, en comparación con las uniones covalentes, la multiplicidad de los enlaces conduce a una considerable energía de unión. De este modo, si el antígeno y el sitio de combinación son complementarios, habrá suficiente energía de unión para resistir la disrupción termodinámica. Pero, si las nubes de electrones del antígeno y el anticuerpo se superponen, entran en juego fuerzas estéricas repulsivas que son inversamente proporcionales a la distancia entre las nubes. Probablemente, estas fuerzas sean vitales para determinar la especificidad de la molécula de anticuerpo frente a un antígeno particular y su poder de discriminación entre distintos antígenos; cualquier variación con respecto a la forma complementaria ideal originará un descenso de la energía de combinación total, por un aumento de las fuerzas de repulsión y una disminución de las de atracción. La unión antígeno-anticuerpo también se ve afectada por las características fisicoquímicas de las soluciones en las que se encuentra disuelto el sistema y por factores que alteran la integridad de las moléculas participantes. Es decir, que si el antígeno o el anticuerpo son modificados la unión antígeno-anticuerpo se verá también modificada. En este sentido, tenemos evidencias que muestran que al desnaturizar los aCLE con calor se libera el inhibidor que los oculta, hasta un punto en el que el anticuerpo se desnaturaliza irreversiblemente y pierde la capacidad de reconocer a la cardiolipina con la que se sensibilizaron las placas de micro-ELISA (figura 1). Además de la temperatura, se estudiaron otros factores fisicoquímicos y biológicos que rompen la unión aCLE-inhibidor, los cuales serán descritos a continuación.

9.14.1 Incubación y diálisis con amortiguadores hipermolares.

En un grupo de 10 SHN se estudió el efecto que tienen las concentraciones altas de sales sobre el complejo aCLE-inhibidor. Los 10 SHN que se eligieron para estos experimentos fueron del grupo de los 100 SHN y de los cuales se conocía su comportamiento al ser tratados con calor, y dado que su comportamiento era el esperado, es decir el tratamiento a 56 °C por 30 minutos liberó los aCLE, los usamos para la siguiente serie de experimentos.

Como se mostró en el apartado 9.11, el tratamiento con un amortiguador hipermolar (PBS 1.5 M de NaCl) en el líquido de reacción de los aCLE (SHN diluido 1:50 en PBS/SBF al 10%) disminuyó el reconocimiento de los fosfolípidos de la placa de micro-ELISA. El tiempo que permanecieron los aCLE en el amortiguador hipermolar fue de 1 hora \pm 5 minutos. En el ensayo que a continuación se describe el grupo de sueros fue incubado en el amortiguador hipermolar (PBS 1.5 M de NaCl, Glicina 1.5 M o trizma 1.5 M, todos a pH 7.2-7.4) por 17 horas \pm 1 hora. Los sueros disueltos en los diferentes amortiguadores hipermolares para ser aplicados a las placas de micro-ELISA se llevaron a su volumen final con 10% de SBF. En las placas de micro-ELISA previamente sensibilizadas con CL, se aplicaron 200 μ l de la muestra por duplicado y se continuó el ensayo de manera estándar para los aFL (ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la tabla XV.

Como se puede ver existe un incremento en el reconocimiento de la cardiolipina en la placa de micro-ELISA cuando los sueros son tratados con amortiguadores hipermolares;

lo que aparentemente significa que se rompe parte de el complejo aCLE-inhibidor. Sin embargo, no todos los complejos aCLE-inhibidor se rompen puesto que al calentar los sueros pre-tratados con los amortiguadores hipermolares se liberan más aCLE que reconocen a la cardiolipina. Dado que el complejo antígeno-anticuerpo es un sistema dinámico, es decir, que los complejos Ag-Ac se forman y disocian, lo que puede ocurrir es que los complejos no muy fuertes se rompen y no se vuelven a unir y son los que detectamos en el ELISA para aFL. Con la finalidad de corroborar el punto anterior se dializaron los sueros contra volúmenes grandes (4 litros) de los amortiguadores hipermolares y se les detectó nuevamente la actividad aCL resultante. El ELISA se corrió como se mencionó anteriormente en este mismo apartado. Los resultados se muestran en la figura 22.

Tabla XV
Efecto de concentraciones altas de sales sobre el complejo aCLE-inhibidor.

Muestra	SOLUCIONES AMORTIGUADORAS HIPERMOLARES (pH 7.2-7.4)					
	20 °C Control	PBS NaCl 1.5M	Glicina 1.5 M	Trizma 1.5M	56 °C	56 °C Post-T
1	0.09±0.01	0.26±0.07	0.27±0.03	0.24±0.02	1.60±0.08	1.46±0.12
2	0.12±0.02	0.31±0.06	0.29±0.05	0.27±0.01	1.72±0.12	1.35±0.08
3	0.11±0.01	0.28±0.05	0.28±0.07	0.26±0.03	1.51±0.09	1.13±0.13
4	0.24±0.05	0.41±0.08	0.40±0.02	0.39±0.02	1.70±0.21	1.38±0.15
5	0.10±0.02	0.26±0.05	0.27±0.05	0.30±0.01	1.49±0.09	1.15±0.11
6	0.15±0.03	0.37±0.08	0.36±0.06	0.34±0.05	1.73±0.20	1.28±0.26
7	0.15±0.01	0.42±0.07	0.41±0.05	0.46±0.02	1.61±0.09	1.25±0.18
8	0.17±0.03	0.43±0.09	0.42±0.03	0.47±0.03	1.81±0.15	1.33±0.17
9	0.19±0.01	0.26±0.03	0.41±0.07	0.35±0.01	1.75±0.11	1.48±0.15
10	0.13±0.01	0.31±0.06	0.34±0.08	0.33±0.02	1.68±0.16	1.35±0.18
Media±DE	0.14±0.04	0.34±0.07 [‡]	0.35±0.06 [‡]	0.34±0.08 [‡]	1.66±0.10	1.32±0.12

* Los resultados están expresados en DO_{405nm} y son el promedio de dos ensayos.

‡ p<0.01 vs controles; no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tres amortiguadores; p<0.001 vs tratados a 56°C; p<0.01 vs tratados a 56 °C posterior a la incubación con los diferentes amortiguadores.

Los resultados de la figura 22 muestran como al romperse el equilibrio aCLE + inhibidor ↔ aCLE-inhibidor por la concentración alta de sales de la diálisis, el inhibidor aparentemente atraviesa el poro de la membrana y se elimina por dilución, en tanto que el anticuerpo permanece en el interior y es detectable mediante el ELISA.

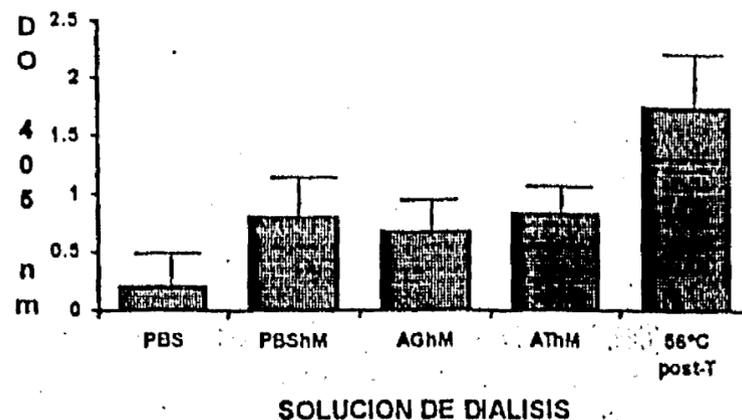


Figura 22. Actividad aCL de los SHN dializados durante 17 ± 1 hr a 4°C contra amortiguadores hipermolares. Los resultados son el promedio de tres ensayos. PBS = SHN dializados contra PBS; PBShM = SHN dializados contra PBS 1.5 M de NaCl; AGhM = SHN dializados contra amortiguador de glicina 1.5 M; AThM = SHN dializados contra amortiguador de trizma 1.5 M. $\text{DO}_{405\text{nm}}$ de los SHN sin tratar = 0.17 ± 0.07 ; $\text{DO}_{405\text{nm}}$ de los SHN 56°C , 30 min = 1.715 ± 0.24 .

Cuando los sueros se dializaron durante 17 horas contra PBS no se observó diferencia significativa al compararse con los sueros no tratados (control). La diálisis de los sueros contra amortiguadores hipermolares "liberó" mayor cantidad de aCLE que cuando sólo se trataron los sueros con los amortiguadores hipermolares pero sin diálisis ($p < 0.01$ vs controles). No se observó diferencia significativa entre los tres amortiguadores. El tratamiento de los sueros a 56°C "liberó" relativamente mayor cantidad de aCLE que la diálisis con amortiguadores hipermolares ($p < 0.01$). Es evidente que los aCLE son una familia de autoanticuerpos de origen policlonal que muestran diferentes afinidades por su inhibidor, como se pudo constatar con los resultados anteriores, en los que se observó la "liberación" de los aCLE por el contacto con amortiguadores hipermolares, el incremento fue mayor cuando se dializó contra dichos amortiguadores y aparentemente alcanzó su máximo de liberación cuando los sueros son tratados con calor. Lo anterior muestra la gama de afinidades que tienen los aCLE.

9.14.2 Incubación y diálisis con amortiguadores de pH bajo.

Uno de los principios en los que se fundamentan las técnicas inmunológicas de purificación de antígenos, es que los anticuerpos al desnaturalizarse sueltan o liberan a su antígeno. Los procesos de desnaturalización son tratamientos que modifican (en forma reversible) la estructura terciaria de las inmunoglobulinas y/o del antígeno. Algunos de los métodos de desnaturalización más empleados son: 1) temperaturas relativamente altas; 2) concentraciones altas de sales y 3) pH's bajos. A continuación presentamos los resultados de los experimentos que se hicieron para estudiar el efecto del pH sobre el complejo aCLE-inhibidor en los sueros humanos normales.

Se estudiaron 10 SHN de la siguiente manera: se diluyeron 1:1 en soluciones amortiguadoras (Tris-HCL y PBS) ajustadas a pH's entre 6.0 y 1.0, con variaciones de una unidad. Después de 17 horas de incubación se neutralizó el pH (7.2-7.4) y se detectó la actividad aCL mediante el ELISA estándar. Los resultados se muestran en la tabla XVI.

A pH's entre 6 y 4 no se observó diferencia significativa con respecto a los sueros sin tratar, pero al incubar los sueros con amortiguadores de $\text{pH} = 3$ se liberaron los aCLE,

fenómeno que fue más evidente a pH = 2. Aparentemente a pH's entre 6 y 4 no se liberaron los aCLE de su inhibidor, mientras que a pH's de 3 y 2 el complejo se rompe y el inhibidor se modifica porque ya no muestra la capacidad de ocultar a los aCLE. Lo que puede estar ocurriendo es que tanto los anticuerpos como el inhibidor se desnaturalizaron a pH's de 3 y 2, al neutralizar el pH los aCLE regresaron a su conformación original y por tanto recuperaron su capacidad de reconocer fosfolípidos, en tanto que el inhibidor se modificó de tal forma que perdió su capacidad de ocultar a los aCLE. La diálisis contra amortiguadores de pH = 1, aparentemente desnaturalizó de manera irreversible a los aCLE pues se perdió totalmente la actividad aCL ($DO_{405} = 0.09 \pm 0.06$) que no fue detectable en ninguno de los SHN.

Tabla XVI
Efecto del pH sobre el complejo aCLE-inhibidor*.

Muestra	pH 7 Control	pH DE LAS SOLUCIONES AMORTIGUADORAS (PBS Y TRIS-HCL)				
		6	5	4	3	2
1	0.13±0.06	0.18±0.04	0.16±0.07	0.19±0.09	0.31±0.11	1.15±0.21
2	0.15±0.07	0.19±0.09	0.23±0.11	0.22±0.13	0.41±0.15	1.36±0.30
3	0.11±0.03	0.15±0.08	0.25±0.08	0.21±0.18	0.46±0.20	1.47±0.26
4	0.09±0.07	0.17±0.07	0.21±0.12	0.18±0.08	0.26±0.09	1.27±0.26
5	0.16±0.08	0.19±0.09	0.24±0.13	0.21±0.17	0.37±0.21	1.39±0.23
6	0.13±0.06	0.21±0.10	0.12±0.08	0.18±0.07	0.38±0.17	1.42±0.37
7	0.09±0.02	0.23±0.09	0.17±0.07	0.23±0.11	0.54±0.10	1.67±0.42
8	0.18±0.06	0.16±0.10	0.27±0.12	0.26±0.15	0.37±0.12	1.45±0.36
9	0.15±0.03	0.18±0.06	0.21±0.15	0.18±0.10	0.40±0.15	1.54±0.46
10	0.17±0.05	0.15±0.07	0.19±0.09	0.22±0.13	0.42±0.17	1.78±0.38
Media±DE	0.14±0.03	0.18±0.02 [‡]	0.20±0.04 [‡]	0.21±0.03 [‡]	0.39±0.08 [¶]	1.45±0.18 [§]

* Los resultados están expresados en DO_{405nm} y son el promedio de dos ensayos.

‡ NS vs control; no hay diferencia estadísticamente significativa en el tratamiento con pH 6, 5 y 4 vs control.

¶ $p < 0.001$ vs control.

§ $p < 0.001$ vs controles; $p < 0.001$ vs incubados a pH = 2.

Al diluir en soluciones amortiguadoras de pH = 1 las DO_{405nm} observadas fueron de 0.09 ± 0.06 .

En general la desnaturalización de los anticuerpos y por ende la pérdida de la capacidad de unirse al antígeno, ocurre a pH's entre 5 y 2. Los aCLE liberaron al inhibidor aparentemente hasta pH's de 3 y 2, es posible que a pH's de 5 y 4 tanto el anticuerpo como el inhibidor se desnaturalicen en forma reversible y queden libres, de esta manera al neutralizar el pH pudo formarse nuevamente el complejo. Para probar lo anterior se dializó cada uno de los sueros en forma independiente contra PBS y Tris-HCL a diferentes pH's (7 a 1), durante 17 horas aproximadamente y se determinó la actividad aCL resultante de dicho tratamiento. Los resultados se muestran en la figura 23. Como se puede ver en la figura, el tratamiento de los SHN con amortiguadores de pH bajo positivizó aCL que previamente eran negativos. Al dializar contra amortiguadores de pH = 6 se observó un incremento en la liberación de los aCLE (significativo vs control; $p < 0.01$), que fue en aumento hasta alcanzar un máximo al dializar los sueros contra amortiguadores de pH = 2.

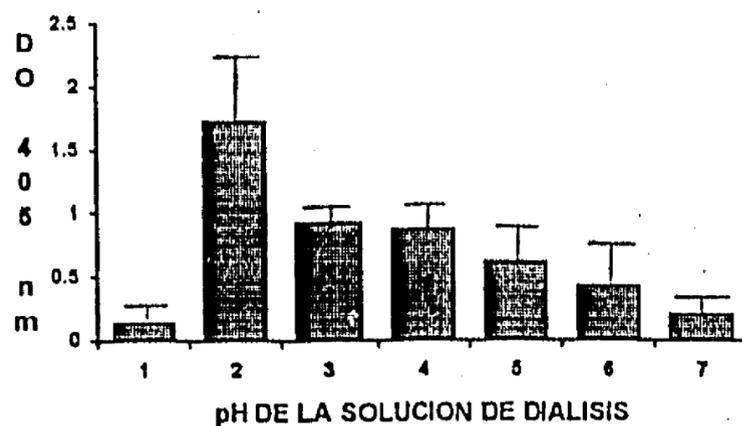


Figura 23. Actividad aCL de los 10 SHN dializados durante 17 ± 1 hr a 4°C contra amortiguadores de pH's bajos (PBS y Tris-HCL). Los resultados son el promedio de dos ensayos. $DO_{405\text{nm}}$ de los SHN sin tratar = 0.15 ± 0.08 ; $DO_{405\text{nm}}$ de los SHN $_{50^\circ\text{C}, 30\text{ min}}$ = 1.57 ± 0.23 .

Los resultados confirman nuestra hipótesis con respecto a que existe una disociación del complejo aCLE-inhibidor, con tratamientos desnaturizantes no "drásticos". Se demostró también que pH's de 2 y 3 rompen el complejo aCLE-inhibidor y modifican al inhibidor de tal forma que no recupera la conformación tridimensional que es reconocida por los aCLE. Las diálisis contra las soluciones amortiguadoras de pH = 1, desnaturizaron a los aCLE de forma irreversible, pues perdieron totalmente su capacidad de reconocer a la cardiolipina en las placas de micro-ELISA. Los experimentos anteriores permitieron conocer las características fisicoquímicas de la unión aCLE-inhibidor y fueron de mucha ayuda para separar a los aCLE de su inhibidor sin dañar a este último.

Los resultados de los experimentos que presentamos a continuación sugerían que el tamaño del inhibidor era menor a 1200 Kd, pues aparentemente atravesó las bolsas de diálisis de celulosa benzoilada que tienen un tamaño de poro promedio de 1200 Kd. Para estos ensayos estudiamos los mismos 10 SHN de los experimentos anteriores. Cada suero se dializó en forma independiente contra PBS y Tris-HCL a diferentes pH's (7 a 1), la diálisis se hizo durante 17 horas aproximadamente a 4°C y se determinó al finalizar ésta, la actividad aCL resultante del tratamiento (Figura 24).

Los resultados presentados en la figura 24 reproducen la liberación de aCLE al dializar los sueros contra los amortiguadores de pH's entre 7 y 1 en bolsas de diálisis de tamaño de poro promedio de 12 a 14 000 Kd. Como se puede ver a pH = 6 se observó un incremento en la liberación de los aCLE (fue significativo cuando se comparó con los controles; $p < 0.01$), que fue en aumento hasta alcanzar un máximo al dializar contra amortiguadores de pH = 2. Las diálisis en amortiguadores de pH's de 2 y 3 disociaron al complejo aCLE-inhibidor y modificaron al inhibidor de tal forma que no recuperó la conformación tridimensional que es reconocida por los aCLE. La diálisis contra las soluciones amortiguadoras de pH = 1, desnaturizó tanto al inhibidor como a los aCLE de forma irreversible, pues el tratamiento les hizo perder, a los aCLE, su capacidad de reconocer a la cardiolipina en las placas de micro-ELISA.

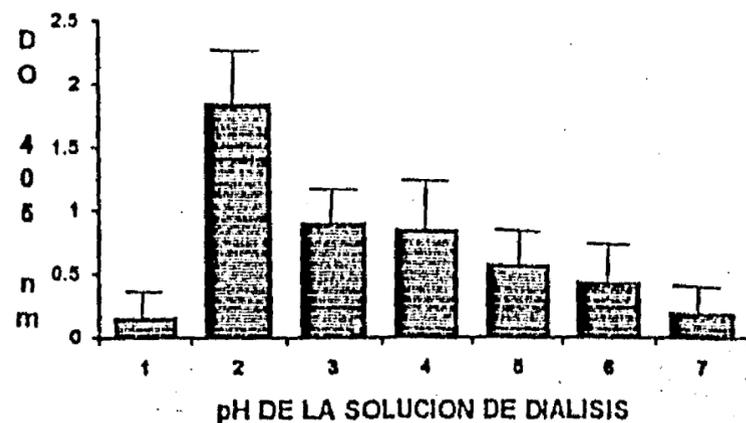


Figura 24. Actividad aCL de 10 SHN dializados en bolsa de diálisis de celulosa benzoilada (tamaño de poro promedio de 1200 Kd) durante 17 ± 1 hr a 4°C contra amortiguadores de pH's bajos (PBS y Tris-HCL). Los resultados son el promedio de dos ensayos. $\text{DO}_{405\text{nm}}$ de los SHN sin tratar = 0.17 ± 0.06 ; $\text{DO}_{405\text{nm}}$ de los SHN_{50°C, 30 min} = 1.62 ± 0.31 .

Con el inhibidor y los aCLE separados sin modificarse irreversiblemente, se tenía la estrategia de purificación y caracterización del inhibidor, las cuales se describen posteriormente.

9.14.3 Tratamiento de los SHN con fosfolipasas.

Aparentemente el inhibidor termolábil que oculta a los aCLE es una molécula pequeña de peso molecular menor a 1200 Kd, como lo sugieren los resultados del apartado anterior. Sabemos además que los aCLE tienen reactividad sólo contra fosfolípidos, evidencias que indican que el inhibidor puede ser un fosfolípido. Para probar ésto, se trataron los SHN con fosfolipasas A₂, B, C y D y se midió la actividad aCL resultante de las digestiones.

En los fosfolípidos, conocidos también como fosfátidos o fosfoglicéridos, uno de los grupos hidroxilo primarios de la glicerina se encuentra esterificado por el ácido fosfórico y los otros dos por ácidos grasos. Los fosfolípidos pueden ser hidrolizados por tratamientos con cambios suaves de pH, de tal forma que el producto de la hidrólisis son ácidos grasos en forma de jabones y el esqueleto de la molécula constituido por la glicerina-ácido fosfórico-alcohol queda inalterado. La hidrólisis de la molécula con cambios drásticos del pH origina la liberación de ambos ácidos grasos y del alcohol de cabeza polar. Puesto que el enlace entre el ácido fosfórico y la glicerina es relativamente estable a la hidrólisis alcalina, el producto de la hidrólisis es el fosfato de glicerilo, que puede escindirse mediante hidrólisis ácida, lo cual podría explicar que el tratamiento con amortiguadores de pH bajo modifiquen irreversiblemente al inhibidor termolábil dejando libre a los aCLE.

Los fosfoglicéridos también pueden ser hidrolizados por la acción de fosfolipasas específicas. La fosfolipasa A₁ separa, de modo específico, el ácido graso de la posición 1, y la fosfolipasa A₂, el de la posición 2 (Figura 25). La fosfolipasa B, que es una mezcla de las fosfolipasas A₁ y A₂, efectúa la separación sucesiva de los dos ácidos grasos de los fosfoglicéridos. La fosfolipasa C hidroliza el enlace entre el ácido fosfórico y la glicerina,

mientras que la fosfolipasa D elimina al grupo de cabeza polar, dejando al ácido fosfórico libre. Los fosfolípidos al igual que otros lípidos complejos, se pueden separar e identificar con facilidad por cromatografía en capa fina, técnica que nos permitió aislar y caracterizar al inhibidor.

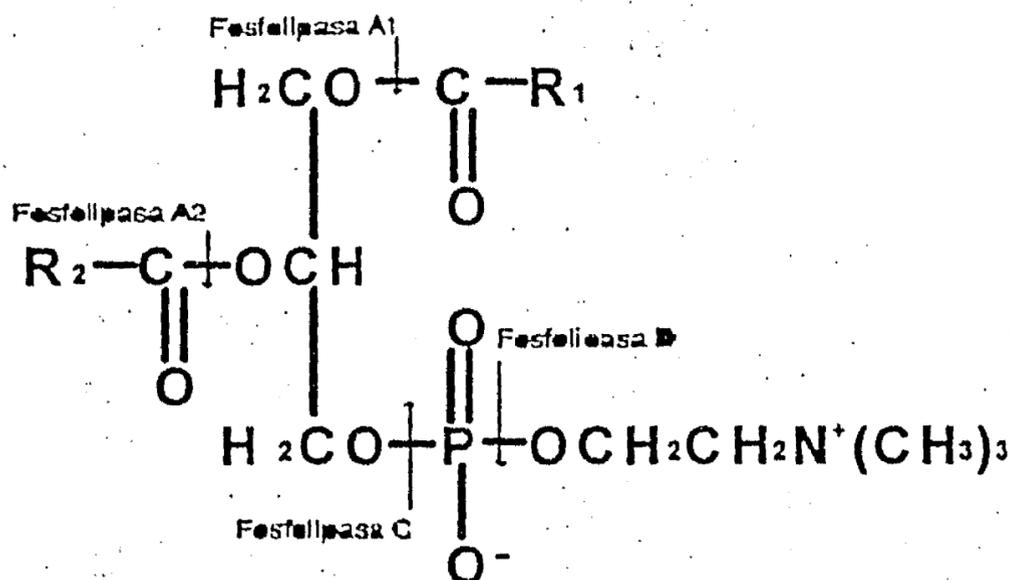


Figura 25. Representación esquemática de la molécula de fosfatidilcolina. Las flechas muestran los puntos de corte de las fosfolipasas específicas. R_1 y R_2 = ácidos grasos. La fosfolipasa B es una mezcla de las fosfolipasas A_1 y A_2 , efectúa la liberación sucesiva de los dos ácidos grasos de los fosfolípidos.

Los 10 SHN que hemos estudiado en los últimos apartados fueron digeridos con las fosfolipasas A_2 , B, C y D, teniendo en cuenta que: tanto en el suero humano como en el suero bovino fetal existen inhibidores de las fosfolipasas, razón por la cual los SHN's se diluyeron 1:20 en PBS y se les agregó una concentración alta de fosfolipasas (tabla XVII). Los SHN se digirieron por 17 ± 1.0 hr. a diferentes pH's y temperaturas, de acuerdo a las condiciones óptimas de acción de cada fosfolipasa (ver tabla XVII). La cantidad de fosfolipasa empleada para las digestiones fue de 10 unidades de cada una, para cada suero. Para la fosfolipasa D su capacidad máxima de acción es a $\text{pH} = 5.6$, como mostramos en el apartado anterior a este pH los aCLE se separan de su inhibidor de manera reversible sin modificar al inhibidor y al neutralizar el pH (7.2-7.4) el complejo se forma nuevamente. Es importante subrayar que una vez terminadas las digestiones, se neutralizó el pH de las mezclas, se diluyeron en PBS con 10 % de suero bovino fetal (para inhibir el efecto de las fosfolipasas) y se determinó la actividad aCL resultante del tratamiento. La casa comercial que extrajo las fosfolipasas (SIGMA) proporcionó entre otra, la siguiente información que creemos conveniente citar: una unidad de fosfolipasa A_2 hidroliza a $\text{pH} = 8.9$ y 25°C , $1.0 \mu\text{mol}/\text{min}$ de $\text{L}-\alpha$ -fosfatidilcolina y produce $\text{L}-\alpha$ -lisofosfatidilcolina más ácidos grasos; una unidad de fosfolipasa B produce a $\text{pH} = 8.0$ y 37°C , $1.0 \mu\text{mol}/\text{min}$ de glicerolfosforilcolina a partir de $\text{L}-\alpha$ -lisofosfatidilcolina de yema de huevo; una unidad de fosfolipasa C produce a $\text{pH} = 7.3$ y 37°C , $1.0 \mu\text{mol}$ de fósforo orgánico soluble en agua a partir de $\text{L}-\alpha$ -lisofosfatidilcolina de yema de huevo; y una unidad

de fosfolipasa D produce a pH = 5.6 y 30 °C, 1.0 $\mu\text{mol/hr}$ de colina a partir de L- α -lisofosfatidilcolina de yema de huevo.

Tabla XVII
FOSFOLIPASAS UTILIZADAS PARA LA DIGESTION DE LOS SHN.
ORIGEN, CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA DE MAXIMA ACCION.

FOSFOLIPASAS	ORIGEN	pH	TEMPERATURA (°C)	CONCENTRACION (UI)
A ₂	Veneno de abeja <i>Apis mellifera</i>	8.9	25	10
B	Especies de vibrio	8.0	37	10
C	Tipo IV <i>C. perfringens</i> (<i>C. welchii</i>)	7.3	37	10
D	Tipo III Cacahuete	5.6	30	10

Los resultados de las digestiones se muestran en la tabla XVIII, el análisis estadístico para comparar el efecto de las fosfolipasas se hizo mediante la prueba *t* de student, y en los casos en los que una o más de las premisas para la prueba *t* no se cumplieron se usó la prueba U de Mann-Whitney. Las digestiones con fosfolipasa A₂ no incrementaron la actividad aCL de los SHN, es decir que la liberación de los ácidos grasos en la posición 2 de la molécula del inhibidor no modifica la unión aCLE-inhibidor, en tanto que el tratamiento con la fosfolipasa B si incremento dicha actividad, lo cual sugiere que la unión de los aCLE con su inhibidor depende de que este último esté completo, que no se altere el ácido graso de la posición 1. Al digerir los sueros con la fosfolipasa C se observó el máximo incremento en la actividad aCL, lo que muestra que la unión de los aCLE con su inhibidor depende principalmente del grupo fosfato y en menor proporción de la cabeza polar del fosfolípido, hecho que se corrobora con la digestión con la fosfolipasa D, en la que al liberarse la cabeza polar del fosfolípido existe un incremento en la actividad aCL proporcionalmente menor a la digestión con fosfolipasa C. En conjunto, se puede concluir que ésta es una evidencia más que apoya el origen fosfolipídico del inhibidor termolábil que oculta a los aCLE.

Tabla XVIII
Digestión de 10 SHN con fosfolipasas específicas*.

FOSFOLIPASAS	Actividad aCL (DO ₄₀₅) antes de la digestión	Actividad aCL (DO ₄₀₅) después de la digestión	tratamiento a 56 °C, 30 min.	valor de P [†]
A ₂	0.09±0.06	0.08±0.03	1.85±0.26	NS
B	0.14±0.08	0.45±0.14	1.06±0.18	<0.01
C	0.07±0.06	0.84±0.17	1.24±0.31	<0.01
D	0.08±0.05	0.37±0.05	0.98±0.23	<0.01

* Los resultados son el promedio de un ensayo.

† Valores de P para la prueba t de student. Digeridos vs no digeridos.

Es importante determinar si las fosfolipasas no modificaron a la cardiolipina en las condiciones en las que se aplicaron a las placas de microELISA sensibilizadas, para determinar la actividad aCL de los sueros digeridos. Para esto se aplicaron 10 Unidades de cada fosfolipasa por triplicado a placas de microELISA sensibilizadas con CL, se incubó en las condiciones de temperatura y pH óptimas para cada una y se probó un SHN_{56 °C, 30 min.} cuya actividad aCL era conocida. Por otro lado, se diluyeron 10 Unidades de cada fosfolipasa, igual por triplicado, en PBS/suero bovino fetal al 10% a pH = 7.2 y a temperatura ambiente, después del tiempo de digestión, se lavó y se aplicó el SHN_{56 °C, 30 min.} control. Los ELISAs se corrieron de manera convencional. Los resultados se presentan en la tabla XIX.

Tabla XIX
Efecto de las fosfolipasas sobre la cardiolipina en las
placas de microELISA[#].

Fosfolipasas	DO ₄₀₅ + SBF al 10%	DO ₄₀₅ sin SBF
A ₂	1.715 ± 0.21	1.360 ± 0.25
B	1.823 ± 0.23	0.705 ± 0.18
C	1.694 ± 0.18	0.375 ± 0.23
D	1.816 ± 0.28	0.875 ± 0.27

Los resultados son el promedio de triplicados.

DO_{405nm} del SHN = 0.057 ± 0.035.

DO_{405nm} del SHN_{56 °C, 30 min.} = 1.834 ± 0.18.

La tabla XIX muestra el efecto de las fosfolipasas sobre la CL pegada a la placa de microELISA. Como se puede ver, cuando se diluyeron las fosfolipasas con SBF al 10 %, se inactivaron por los inhibidores del SBF y dejaron intactas las moléculas de CL que fueron reconocidas por el suero control. No obstante, al tratar las placas sensibilizadas con las fosfolipasas en las condiciones óptimas de temperatura y pH para estas, se observó que la fosfolipasa A₂, o no modifica al fosfolípido o los aCLE reconocen a la parte que no fue modificada (grupo fosfato, esqueleto del glicerol y cabeza polar). Las digestiones con la fosfolipasa B corroboran lo anterior.

En la digestión con la fosfolipasa C, con la que se elimina la cabeza polar junto con el fosfato, se observó una disminución clara del reconocimiento de la CL por los aCLE del suero control. Finalmente, la digestión con la fosfolipasa D, mostró también una disminución del reconocimiento de la CL por los aCLE pero no tan notable como el de la digestión con fosfolipasa C. Los resultados de estos ensayos corroboran el efecto de las fosfolipasas sobre el inhibidor cuando esta formando el complejo aCLE-inhibidor.

9.15 Caracterización del factor termolábil que oculta a los aCLE.

Desde el principio del trabajo tuvimos evidencias que sugerían que el inhibidor de los aCLE podía ser un fosfolípido, como se mostró en los estudios de inhibición de la actividad aCL con micelas de fosfolípido. Esta primera evidencia tomó más fuerza al tratar las micelas de fosfolípido a 56 °C durante 30 minutos y observar que perdían completamente su capacidad de inhibir la actividad aCL de los aCLE. En algún momento se pensó que el inhibidor podía ser la β_2 GP-I como lo propusieron McIntyre y colaboradores¹⁶⁹, sin embargo, nuestros experimentos demostraron fehacientemente que el cofactor de los aFL autoinmunes no es el inhibidor de los aCLE presentes en el suero de sujetos clínicamente sanos. En punto 9.11 se presentaron los resultados que muestran que los aCLE son oligorreactivos pues sólo reconocen fosfolípidos tanto de carga neutra (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina) como aniónicos (Cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol), lo que constituyó una evidencia más de que el inhibidor de los aCLE sólo podía ser un fosfolípido. El inhibidor termolábil aparentemente atravesó una membrana de diálisis de tamaño de poro promedio de 12 000 a 14 000 Kd, y aun más, aparentemente atravesó una membrana de diálisis de tamaño de poro promedio de 1200 Kd lo que sugirió que el inhibidor podía ser una molécula muy pequeña. La evidencia más fuerte, del origen fosfolípido del inhibidor, fue la liberación de los aCLE mediante digestiones con fosfolipasas, con lo que el camino para la caracterización del inhibidor que oculta a los aCLE estaba ya trazado, solo restaba definir la estrategia a seguir. En este sentido, se sabía que el complejo aCLE-inhibidor se disociaba sin modificarse irreversiblemente ninguno de los dos componentes, con diálisis a pH's de 3 a 4. Utilizando este sistema nos dimos a la tarea de dializar 10 SHN contra amortiguador de Tris-HCL 1.5 M pH = 4, en bolsas de diálisis de celulosa benzoilada (tamaño de poro promedio de 1200 Kd) durante 17±1 hora a 4°C. Terminada la diálisis, se comprobó que la actividad aCL de los 10 SHN hubiera aumentado (aumentó de 0.125±0.08 DO_{405nm} a 0.912±0.231 DO_{405nm}). El siguiente paso fue buscar el inhibidor en el líquido de diálisis, para lo cual hicimos extracciones con cloroformo, evaporamos el solvente hasta 200 μ l aproximadamente y analizamos por cromatografía de capa fina en placas del sílica gel H (Merk) con el sistema de solventes cloroformo-metanol-agua en proporción 65-25-4 respectivamente. Los resultados no fueron positivos pues no se encontró al fosfolípido. La

conclusión a la que llegamos fue que si el o los fosfolípidos no se encontraban dentro de la bolsa, ni en el líquido de diálisis, debían estar pegados a la bolsa de celulosa benzoilada. Por lo que se lavaron exhaustivamente las bolsas de diálisis con cloroformo-metanol en proporción 65-25 respectivamente, se evaporó el solvente hasta 0.5 ml y se analizó nuevamente por cromatografía en capa fina. Los resultados se muestran en la figura 9. Se determinó además, la presencia de proteínas por el método de Lowry¹⁶⁴ y en geles de PAGE^{165, 166}, todas las determinaciones fueron negativas (sensibilidad del método de Lowry = 2 µgr). Los resultados de la cromatografía en capa fina se muestran en la figura 26.

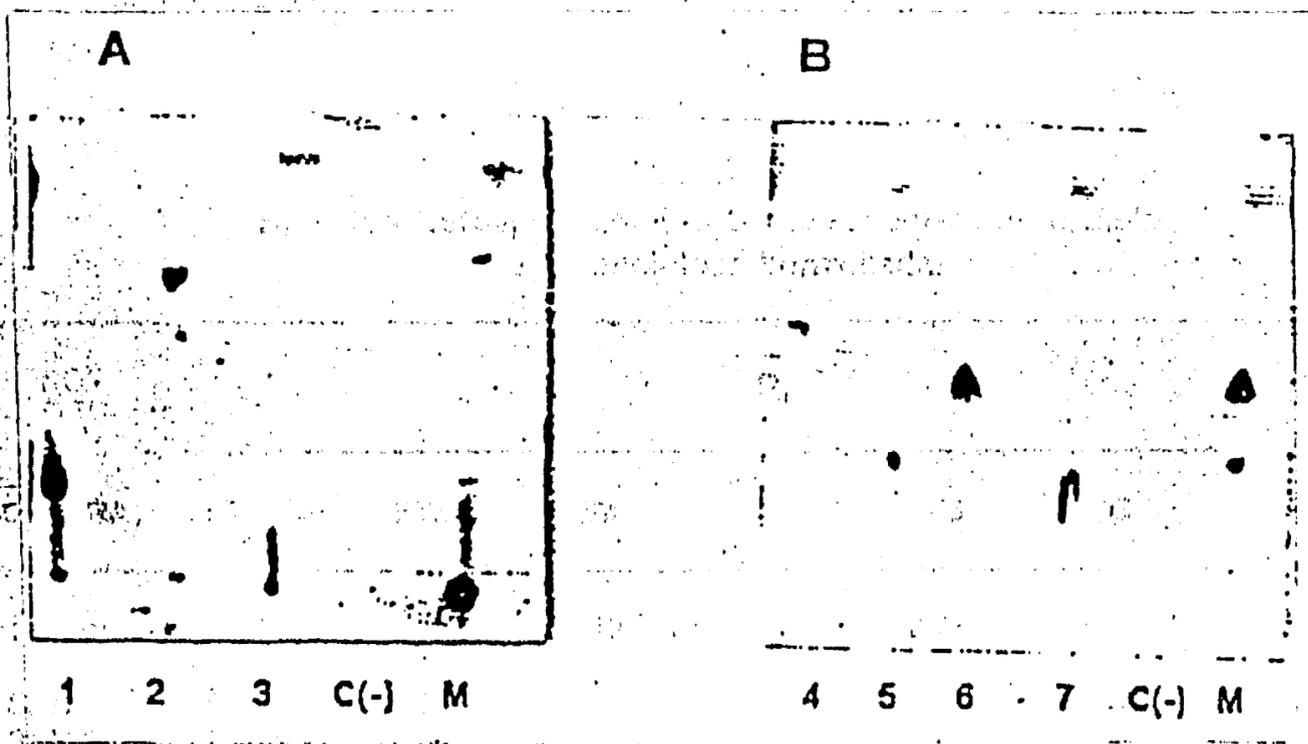


Figura 26. Identificación de los fosfolípidos extraídos de las bolsas de diálisis de nitrocelulosa benzoilada. Los controles fueron fosfolípidos puros de SIGMA y se aplicaron 20 µg de cada uno en una sola aplicación. A. Fosfolípidos neutros: 1 = Fosfatidilcolina; 2 = Fosfatidiletanolamina y 3 = Esfingomielina. B. Fosfolípidos aniónicos: 4 = cardiolipina; 5 = Fosfatidilserina; 6 = Fosfatidilglicerol y 7 = Fosfatidilinositol. Para A y B: C (-) = Concentrado de los lavados con cloroformo-metanol de bolsas de diálisis nuevas; M = Concentrado del extracto cloroformo-metanólico de la bolsa de diálisis de un los SHN.

La figura 26 muestra los resultados de un ensayo en el que se identificó a los fosfolípidos que se pegaron a la membrana de diálisis de nitrocelulosa benzoilada, después de dializar un SHN contra Tris-HCL 1.5 M pH = 4. En el cromatograma se encontró identidad con FTC y FTE de los fosfolípidos neutros; FTS y FTG de los fosfolípidos aniónicos, como lo muestran los R_f que son una medida de dicha identidad. En 1941 Martin y Synge¹⁷³ demostraron que los solutos cuando se desplazan sobre una superficie inerte, lo hacen más lentamente que el disolvente puro. Bajo condiciones determinadas, la velocidad del soluto es característica y se distingue por sus valores de R_f . El cálculo del R_f se hace de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{velocidad de migración del soluto}}{\text{velocidad de migración del solvente}}$$

Con la fórmula anterior se calcularon los R_f de los fosfolípidos eluidos de las bolsas de diálisis de los 10 SHN y se encontró una distribución homogénea. Los resultados se muestran en la tabla XX.

Tabla XX
 R_f de los fosfolípidos extraídos de las bolsas de diálisis de nitrocelulosa benzoilada.

MUESTRA	R_f						
	FTC	FTE	EM	CL	FTS	FTG	FTI
FL puros	0.25	0.72	0.12	0.57	0.28	0.50	0.30
SHN 1	0.25	0.75	—	—	0.28	0.49	—
SHN 2	0.26	0.76	—	—	0.27	—	—
SHN 3	0.25	0.73	—	—	0.29	0.50	—
SHN 4	0.25	0.72	—	—	0.29	—	—
SHN 5	0.26	0.71	—	—	0.28	—	—
SHN 6	0.24	0.72	—	—	0.28	0.50	—
SHN 7	0.25	0.73	—	—	0.28	—	—
SHN 8	0.25	0.72	—	—	0.29	—	—
SHN 9	0.26	0.73	—	—	0.29	—	—
SHN 10	0.24	0.72	—	—	0.27	0.50	—

Para comprobar que los fosfolípidos extraídos de las bolsas de diálisis son reconocidos por los aCLE de donde se liberaron, se sensibilizaron placas de micro ELISA con el extracto clorofomo-metanólico de los SHN 1, 2, 3, 4 y 5. Los blancos de este ensayo fueron pozos sensibilizados con los lavados de clorofomo-metanol (65-25 V/V) de bolsas de diálisis de celulosa benzoilada nuevas. El ensayo se corrió de manera estándar. En las placas de microELISA se probaron SHN con sus extractos autólogos y con los extractos heterólogos. Se probaron además las 5 IgG's_{56°C, 30 min} (concentración final = 678.77 mg/ml). Los resultados se muestran en la tabla XXI.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla XXI

Reactividad de los aCLE contra los fosfolípidos de los extractos (autólogos o heterólogos) de cloroformo-metanol de las bolsas de celulosa benzoilada*.

Placas sensibilizadas con los fosfolípidos extraídos con cloroformo-metanol de las bolsas de diálisis de los sueros:						
MUESTRA	Blanco Cloroformo/ Metanol	SHN 1	SHN 2	SHN 3	SHN 4	SHN 5
SHN 1	0.08±0.06	0.60±0.18	0.59±0.16	0.63±0.10	0.61±0.16	0.59±0.17
SHN 2	0.06±0.01	0.52±0.12	0.61±0.20	0.63±0.13	0.63±0.17	0.57±0.16
SHN 3	0.08±0.07	0.73±0.17	0.77±0.18	0.67±0.18	0.72±0.19	0.61±0.18
SHN 4	0.11±0.05	0.85±0.17	0.72±0.15	0.76±0.13	0.74±0.20	0.67±0.18
SHN 5	0.07±0.06	0.69±0.16	0.67±0.17	0.76±0.12	0.53±0.16	0.67±0.12
IgG ₅₆ 1	0.07±0.06	0.48±0.06	0.58±0.15	0.58±0.17	0.47±0.15	0.57±0.16
IgG ₅₆ 2	0.04±0.03	0.61±0.17	0.69±0.17	0.47±0.18	0.57±0.16	0.66±0.17
IgG ₅₆ 3	0.09±0.05	0.43±0.12	0.38±0.09	0.47±0.14	0.46±0.15	0.47±0.18
IgG ₅₆ 4	0.06±0.03	0.58±0.19	0.66±0.17	0.57±0.18	0.60±0.19	0.57±0.18
IgG ₅₆ 5	0.09±0.07	0.66±0.17	0.58±0.12	0.57±0.17	0.68±0.17	0.66±0.13

* Los resultados están expresados en DO_{405nm} y son el promedio de duplicados.

Como se puede ver en la tabla XXI, los aCLE liberados de los SHN_{dial} reconocieron los fosfolípidos eluidos de la membrana de diálisis de celulosa benzoilada. El reconocimiento es tanto autólogo como heterólogo, un mismo suero tiene prácticamente el mismo patrón de reactividad contra los diferentes extractos. En cuanto a las IgG₅₆ °C, 30 min purificadas, se observó un patrón de reconocimiento similar, las cinco reconocieron los extracto heterólogos.

Con los extractos de los sueros SHN 6, 7, 8, 9 y 10, se inhibieron los sueros autólogos de donde provenían (SHN_{dial}). Los extractos cloroformo-metanólicos se evaporaron hasta sequedad con nitrógeno gas en tubos eppendorf y se adicionaron 100 µl de PBS + 10 µl de PBS Tween 20 al 0.5%. Se homogeneizaron durante 20 minutos (en un Vortex) y se mezclaron con 100 µl de SHN_{dial} autólogo. La mezcla de inhibición se incubó durante 1 hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C con agitación. Los controles del experimento se detallan a continuación:

Control (-) = 100 µl de SHN_{dial} + 100 µl de PBS + 10 µl de PBS/Tween 20 al 0.5%.

Control (+) = SHN (6, 7, 8, 9 y 10) tratados a 56 °C durante 30 min.

Ambos controles se incubaron a 37 °C durante 1 hora y toda la noche a 4 °C con agitación. Todas las muestras y controles se llevaron a una dilución final de 1:50 (ensayo estándar). Los resultados se muestran en la figura 27.

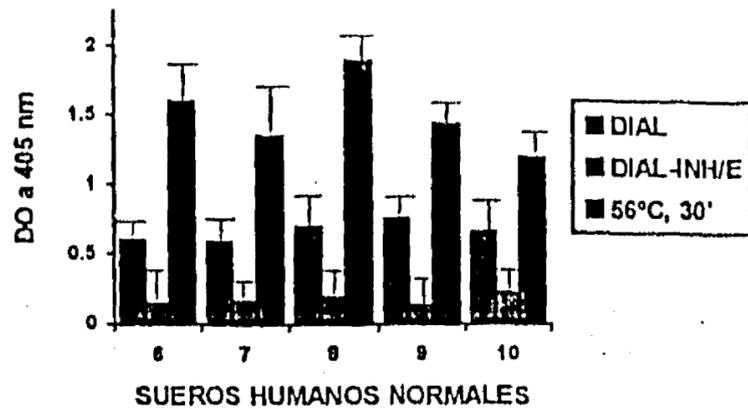


Figura 27. Actividad aCL liberada por la diálisis contra amortiguador de Tris-HCL pH = 3. durante 17 ± 1 h a 4°C e inhibida con los extractos cloroformo-metanólicos autólogos (5 SHN). Los resultados son el promedio de triplicados del ensayo de ELISA estándar aCL. Las $\text{DO}_{405\text{nm}}$ de los 5 SHN sin tratar fueron: 0.11 ± 0.05 . DIAL = SHN dializados. DIAL-INH/E = SHN dializados e inhibidos con el extracto cloroformo-metanólico autólogo. $56^\circ\text{C}, 30'$ = SHN tratados a 56°C durante 30 minutos.

Como se puede ver en la figura anterior, los fosfolípidos extraídos de las membranas de diálisis de celulosa benzoilada, inhiben la actividad aCL liberada por la diálisis contra el amortiguador de Tris-HCL 1.5 M de pH = 4. Con los experimentos anteriores se comprobó que el inhibidor termolábil que oculta a los anticuerpos anti-cardiolipina escondidos son los fosfolípidos neutros fosfatidilcolina, fosfatidiletanol-amina y los fosfolípidos aniónicos fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

10. Discusión

Los aFL son autoanticuerpos que se pueden detectar por ensayos inmunoenzimáticos en los que los fosfolípidos cargados negativamente, cardiolipina principalmente, son usados como antígeno^{53, 116, 174}. Recientemente, se encontró que la β_2 glicoproteína-I es un factor necesario para la detección *in vitro* de los aCL de pacientes enfermedades autoinmunes como el LEG y el SaFP¹³⁰⁻¹³². Los aCL de los pacientes con enfermedades infecciosas (que raramente tienen trombosis) reconocen a la CL en ausencia de β_2 GP-I. La diferencia en el requerimiento de la β_2 GP-I entre los aFL de los pacientes con enfermedades autoinmunes y los aFL de pacientes con enfermedades infecciosas permitió a Matsuura y colaboradores¹³⁷ clasificar a los aFL en dos grupos: los aFL autoinmunes que requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*, se encuentran presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes y se asocian a ciertas manifestaciones clínicas como trombosis, trombocitopenia, pérdida fetal recurrente, etc. El segundo grupo, es el de los aFL no autoinmunes, no requieren de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*, se encuentran presentes en pacientes con infecciones como sífilis y no se asocian a manifestaciones clínicas. Según lo anterior, los aFL autoinmunes están reconociendo el complejo β_2 GP-I-fosfolípido y los no autoinmunes reconocen al fosfolípido propiamente dicho^{135, 138}.

En 1989 Cheng y colaboradores demostraron que la inactivación de sueros normales (56 °C durante 30 minutos), descubre aCL de isotipo IgG que previamente eran negativos, tanto en los sueros de pacientes con LEG y sífilis como en los de sujetos sanos¹⁵⁴.

Recientemente demostramos que los aCLE de sujetos clínicamente sanos, no son dependientes de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*¹⁷⁵. En este sentido, los aCLE pueden clasificarse como a aFL no patogénicos de acuerdo a lo reportado por Matsuura¹³⁷. En 1992 H. M. Cheng y colaboradores¹⁷⁶ y en 1993 McIntyre y colaboradores¹⁶⁹ reportaron que la β_2 GP-I inhibe parcialmente la detección de los aCLE presentes en el suero de sujetos clínicamente sanos, pero nosotros no encontramos evidencias claras de ello, por el contrario, nuestros resultados mostraron que la actividad aCL de los aCLE de los sujetos sanos no se altera por la presencia o ausencia de la β_2 GP-I¹⁷⁵. En otra comunicación mostramos que los pacientes con SaFP tienen, además de los aCL nativos dependientes de β_2 GP-I¹⁷⁷, dos poblaciones más de aFL que son: aCL ocultos (aCLE) dependientes e independientes de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*.

Se desconoce si los aCL nativos u ocultos dependientes de β_2 GP-I y su contraparte independientes del cofactor tienen el mismo origen, y si los aCL no escondidos independientes de la β_2 GP-I derivan de autoanticuerpos naturales que sufrieron mutación somática inducida por antígeno, como lo sugiere el hecho de que sean de clase IgG. Los estudios moleculares de las regiones V_H de los aCL no escondidos patogénicos e infecciosos y de los aCLE pueden proporcionar información acerca del origen y maduración de estos autoanticuerpos.

Estamos concientes de que no existen condiciones fisiológicas *in vivo* que semejen la liberación por calor de los aCLE *in vitro*, sin embargo, el fenómeno existe y requiere explicación. Las características de los aCLE pueden ayudarnos a explicar el origen de los aFL patogénicos en humanos, pues como se mostró el fenómeno cruza la barrera filogenética, hecho que sugiere la importancia de los aCLE en el sistema inmune. Los estudios en ratones revelaron que los aCLE murinos tienen las mismas características de reactividad y dependencia de β_2 GP-I que los aCLE presentes en los sujetos clínicamente sanos.

La reactividad de los aCLE no es específica, pues reconocen tanto fosfolípidos aniónicos como neutros, sin embargo, su polirreactividad se restringe a un grupo pequeño de antígenos todos ellos fosfolípidos. El reconocimiento de estructuras tan ubicuas y vinculadas entre sí, puede ser una característica importante de este grupo de aFL. Su papel fisiológico puede estar relacionado con la depuración de restos celulares del organismo que les dió origen o de microorganismos invasores, con ello proponemos que forman parte de las primeras líneas de defensa y de la poza de autoanticuerpos naturales.

Los resultados que muestran que tanto los sueros humanos normales como las IgG's purificadas de los mismos, prolongan los tiempos de coagulación dependientes de fosfolípidos, son hallazgos que sugieren dos cosas: 1) que los aCLE son verdaderos aFL que reconocen a los fosfolípidos que participan en las reacciones de la cascada de la coagulación por especificidad y sin otra razón en particular; y 2) que los aCLE tienen un papel fisiológico regulador de este sistema, en el que participan fosfolípidos solubles, lipoproteínas y lípidos tanto negativos como neutros constitutivos de las membranas de las plaquetas, células endoteliales, etc.

En 1992 la Dra. Galli¹⁷⁸ reportó un estudio realizado en 16 plasmas de pacientes con aCL y AL positivos. Los aCL y el AL de 5 de los 16 plasmas sedimentaron de manera dosis-dependiente de la concentración de una mezcla de inhibición compuesta por cardiolipina, fosfatidilcolina y colesterol. En los 11 plasmas restantes sólo se inhibió la actividad aCL, quedando en el sobrenadante la actividad AL. Los aCL purificados de los 5 primeros plasmas fueron definidos por la Dra. Galli como aCL tipo A, en tanto que, los aCL de los otros 11 plasmas los denominó aCL tipo B. Nimpf y colaboradores¹⁴³ demostraron que la β_2 GP-I al unirse a los FL's de carga negativa inhibe la conversión de protrombina a trombina por el complejo enzimático Xa/Va. Usando un sistema altamente purificado de los factores de la coagulación Xa, Va protrombina y vesículas compuestas por fosfatidilserina y colesterol, la Dra. Galli estudió el efecto de los aCL tipo A y tipo B en presencia y ausencia de β_2 GP-I. En ausencia de β_2 GP-I o de vesículas de FL's no se inhibió la formación de trombina por ninguno de los dos tipos de aCL A o B. La adición de β_2 GP-I al sistema en presencia de las vesículas de FL's y de aCL tipo A aumentó dramáticamente el efecto inhibitorio de la β_2 GP-I. Cuando se adicionó al sistema sólo β_2 GP-I, se observó una inhibición tiempo-dependiente, que no se afectó por la presencia de los aCL tipo B o de IgG inespecífica. Los datos presentados por la Dra. Galli muestran que la actividad anticoagulante de un tipo de aFL's está mediada por la β_2 GP-I y que existe otro tipo de aCL que no tiene actividad anticoagulante, los aCL tipo B. El trabajo de la Dra. Galli sugiere que existen tres tipos de aFL dirigidos contra FL's de carga negativa (los aCL tipo A, aCL tipo B y AL) que sumados a los aFL infecciosos, a las 4 subpoblaciones de aFL reportadas por nuestro grupo¹⁷⁷ en pacientes con SaFP y a las evidencias que tenemos de aFL en sujetos sanos (aFTC-IgM¹⁵⁸ y aCLE) muestra el campo tan extenso que tenemos los estudiosos de los anticuerpos anti-fosfolípidos.

Los estudios de reactividad mostraron que los aCLE son oligorreactivos porque reaccionaron contra fosfolípidos tanto aniónicos como zwitteriónicos, y no reaccionaron contra otros antígenos (DNAcd, DNACs, vimentina, antígenos nucleares y citoplásmicos). La reactividad cruzada contra fosfolípidos mostró dos patrones de reconocimiento: 1) aCLE con actividad aCL, aFTS, aFTI, aFTE, aFTG, aAF y aEM que se inhibieron con mCL; y 2) aCLE con actividad aFTC que se inhibieron exclusivamente con mFTC. Este fenómeno sugiere que existen dos subpoblaciones de aCLE en sujetos sanos, una oligorreactiva y otra monorreactiva cuyas funciones pueden ser: a) depuradores de células envejecidas o de restos celulares (los aCLE "monorreactivos"); y b) primera línea de defensa contra agentes infecciosos (los aCLE "polirreactivos").

En los trabajos publicados por Avrameas y colaboradores¹⁷⁹ se reporta que muchos de los autoanticuerpos naturales reconocen IgG autóloga, es decir, tienen actividad de factor reumatoide. En 1992 Ortiz Maslloréns y colaboradores¹⁸⁰ comunicaron que el 53% de los pacientes con artritis reumatoide seronegativa y 8% de los sujetos sanos tienen factores reumatoides "ocultos". Estos anticuerpos con actividad de factor reumatoide aparentemente circulan en el torrente sanguíneo en forma de complejos IgG-IgM, que al ser disgregados por el enriquecimiento de la fracción IgM se potencia la actividad de factor reumatoide. El efecto inhibitor de la IgG se acentúa cuando se emplea IgG agregada por calentamiento.

Los resultados que muestran que los aCLE son oligorreactivos contra fosfolípidos y que no reaccionan contra gamaglobulina agregada demuestran que los aCLE no son factores reumatoides "ocultos" y con ello se descarta también que el inhibidor termolábil sea IgG.

Como se sabe los procesos de desnaturalización son tratamientos que modifican (en forma reversible) la estructura terciaria de las inmunoglobulinas y/o del antígeno. Algunos de los métodos de desnaturalización más empleados son: 1) temperaturas relativamente altas; 2) concentraciones altas de sales y 3) pH's bajos. Durante el desarrollo del trabajo presentamos los resultados que muestran que los tres métodos afectan la unión aCLE-Inhibidor y que dicha unión es un equilibrio dinámico en el que hay formación y disociación del complejo.

Desde el principio del trabajo tuvimos evidencias que sugerían que el inhibidor de los aCLE podía ser un fosfolípido, como lo mostramos con los estudios de inhibición de la actividad aCL con micelas de fosfolípido. Esta primera evidencia tomó más fuerza al tratar las micelas de fosfolípido a 56 °C durante 30 minutos y observar que perdían completamente su capacidad de inhibir la actividad aCL de los aCLE. McIntyre y colaboradores¹⁶⁹ propusieron en 1993 que el inhibidor podía ser la β_2 GP-I, sin embargo, nuestros experimentos demostraron fehacientemente que el cofactor de los aFL autoinmunes no es el inhibidor de los aCLE presentes en el suero de sujetos clínicamente sanos. Además los resultados que muestran que los aCLE son oligorreactivos pues sólo reconocen fosfolípidos tanto de carga neutra (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina) como aniónicos (Cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol), constituyó una evidencia más de que el inhibidor de los aCLE sólo podían ser fosfolípidos. Con el uso de técnicas que permiten la disociación del complejo anticuerpo-antígeno utilizando amortiguadores hipermolares de pH bajo, separamos al anticuerpo de su inhibidor termolábil sin dañar a este último. Este procedimiento permitió identificar la naturaleza del inhibidor y no sólo eso sino que se demostró mediante cromatografía en capa fina que los fosfolípidos que inhiben a los aCLE son: la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol. Estos resultados demuestran que los aCLE son verdaderos anticuerpos anti-fosfolípidos cuya fracción F(ab)₂ se encuentra bloqueada por fosfolípidos y circulan inhibidos en el torrente sanguíneo, además apoyan la noción de que los anticuerpos anti-fosfolípidos son una familia heterogénea de autoanticuerpos que coexisten en un mismo individuo.

Los aCLE circulan inhibidos por fosfolípidos que impiden su unión con el antígeno, y cuando ocurre algún proceso que altera la homeostasis (por agentes infecciosos, traumatismo, fractura de huesos, infartos, procesos inflamatorios por formación de cristales, el nacimiento, etc.) se monta una respuesta con cambios sistémicos y metabólicos, los cuales son referidos como respuesta de fase aguda. Entre las diferentes proteínas que se incrementan en la respuesta de fase aguda, muchas de ellas son enzimas, siendo en este momento las fosfolipasas¹⁸¹, las enzimas de nuestro interés pues nos permite proponer un mecanismo de liberación de los aCLE *in vivo*. De esta manera la presencia de fosfolipasas

en forma sistémica o localizada puede, como se mostró en los resultados del trabajo, liberar a los aCLE de su inhibidor, con lo que se tendrían grandes cantidades de anticuerpos anti-fosfolípidos para actuar como primera línea de defensa en caso de requerirse una respuesta contra agentes infecciosos, o bien para eliminar restos de membranas celulares propias o de los microorganismos invasores.

11. CONCLUSIONES.

11.1 ESTUDIOS EN HUMANOS.

1. Los aCLE tienen una frecuencia del 94 % en la población normal estudiada y son exclusivamente de isotipo IgG.
2. En pacientes que tienen títulos altos de aCL no escondidos dependientes e independientes de la β_2 GP-I (LEG, SaFP y sífilis) para su detección *in vitro*, coexisten los aCLE.
3. En los pacientes con sífilis cuyos aCL no escondidos son independientes de la β_2 GP-I para su detección *in vitro*, los aCLE detectados tuvieron características de aFL infecciosos. En los pacientes con SaFP que tienen aCL no escondidos autoinmunes se caracterizaron tres poblaciones más de aFL: una no escondida de tipo infecciosa y dos de aCLE, de las cuales una fue dependiente y la otra independiente de la β_2 GP-I.
4. Los aCLE detectados en los sueros de sujetos clínicamente sanos tuvieron reactividad cruzada contra FL aniónicos y zwitteriónicos. Los resultados de las inhibiciones de la actividad aFL sugieren que existen dos subgrupos de aCLE en función de los patrones de inhibición: aCLE que reaccionan contra FL aniónicos y aCLE que reaccionan contra FL neutros. La polireactividad de los aCLE es limitada, porque se reduce al reconocimiento de fosfolípidos y no reconocen otros antígenos.
5. Los aCLE de los SHN prolongan los tiempos de coagulación dependientes de fosfolípidos, es decir tienen actividad de anticoagulante lúpico. Dicha actividad demuestra que son verdaderos anticuerpos anti-fosfolípidos cuya fracción F(ab)² está bloqueada por fosfolípidos.
6. Además de la temperatura, también el pH bajo y las concentraciones altas de sales rompen la unión aCLE-inhibidor, la cual forma un equilibrio dinámico aCLE-inhibidor \leftrightarrow aCLE + inhibidor.
7. La estabilidad del complejo aCLE-Inhibidor depende de que el inhibidor (fosfolípido) esté completo, como lo muestran las digestiones con fosfolipasas (A₂, B, C y D). Al escindir la cabeza polar junto con el grupo fosfato del fosfolípido se liberan los aCLE en proporción similar al tratamiento a 56 °C durante 30 minutos.
8. Los fosfolípidos que ocultan la actividad aCL de los aCLE en los sueros humanos normales son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol. Estos resultados apoyan la noción de que los anticuerpos anti-fosfolípidos son una familia heterogénea de autoanticuerpos que pueden coexistir en un mismo individuo.

11.2 ESTUDIO DEL FENOMENO EN LOS RATONES BALB/C Y NZB.

- I. El tratamiento con calor (56 °C, 30 min) descubrió aCL-IgG en el suero de ratones normales Balb/c, este mismo tratamiento, descubrió aCL-IgG en el suero de ratones NZB que se adsorbieron previamente en forma repetida con mCL.
- II. Los aCL-IgG que se "liberaron" con el tratamiento con calor se inhibieron con mCL.
- III. La adsorción con proteína A negativizó por completo la actividad aCL potenciada por el tratamiento con calor de los sueros de ambos grupos estudiados.
- IV. En el estudio se encontró que los ratones NZB tienen 3 veces mas aFTC-IgM no escondidos que los ratones normales (p<0.001).

- V. Ninguno de los sueros de los ratones estudiados tuvieron aFTC-IgG no escondidos, sin embargo, el tratamiento con calor "liberó" aFTC-IgG y aCL-IgG en ambos grupos.
- VI. No se detectó aCLE-IgM en el suero de los ratones balb/c. Sin embargo, se pudo detectar en el suero de los ratones NZB aCL-IgM que no muestran reactividad cruzada con FTC. Los aFL tanto de isotipo IgG como IgM se inhibieron con micelas de FL.
- VII. Cuando se estudiaron los aFL tanto no escondidos como escondidos en presencia de β_2 GP-I, no se encontro diferencia significativa al compararlos con la detección en ausencia del cofactor.
- VIII. Los ratones BALB/c y NZB tienen aFL-IgG- β_2 GP-I-independientes, lo cual corrobora la noción de que los requerimientos de β_2 GP-I puede ser un marcador *in vitro* de patogenicidad de los aFL-IgG.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Kawaguchi S: Phospholipid epitopes for mouse antibodies against bromelain-treated mouse erythrocytes. *Immunology*. 1987; 62:11-16.
2. Bellon B, Manheimer-Lory A, Monestier M, et al: High frequency of autoantibodies bearing cross-reactive idiotypes among hybridomas using VH7183 genes prepared from normal and autoimmune murine strains. *J Clin Invest*. 1987; 79:1044-1053.
3. Klinman DM, Banks S, Hartman A, et al: Natural murine autoantibodies and conventional antibodies exhibit similar degrees of antigenic cross-reactivity. *J Clin Invest*. 1988; 82:652-657.
4. Klinman DM, Ishigatsubo Y, Steinberg AD: Acquisition and maturation and expressed B cell repertoires in normal and autoimmune mice. *J Immunol*. 1988; 141:801-806.
5. Jyonouchi H, Kincade PW, Landreth KS, et al: Age-dependent deficiency of B lymphocyte lineage precursors in NZB mice. *J Exp Med*. 1982; 155:1665-1678.
6. Prud'homme GJ, Balderas RS, Dixon FJ, et al: B cell dependence on and response to accessory signals in murine lupus strains. *J Exp Med*. 1983; 157:1815-1827.
7. Mihara M, Ohsugi K, Hasegawa K, et al: Immunologic abnormality in NZB/NZW F1 mice. Thymus-independent occurrence of B cell abnormality and requirement for T cells in the development of autoimmunity disease, as a evidence by an analysis of the athymic nude individuals. *J Immunol*. 1988; 141:85-90.
8. Sekigawa I, Noguchi K, Hasegawa K, et al: B cell hyperresponsiveness to interleukin 2 and the age-associated decline in murine lupus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989; 51:172-184.
9. Lal RB, Cooper HL, Coligan J, et al: proteins associated with B lymphocytes hyperactivity in New Zealand Black mice. *J Immunol*. 1987; 138:3793-3798.
10. Huang H-JS, Jones NH, Strominger JL, et al: Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T cell lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/11 (CD5). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:204-208.
11. Manohar V, Brown E, Leiserson WM, et al: Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. *J Immunol*. 1982; 129:532-538.
12. Braun J, Citri Y, Baltimore D, et al: B-Ly1 cells: immortal Ly-1⁺ B lymphocytes cells lines spontaneously arising in murine splenic cultures. *Immunol Rev*. 1986; 93:5-21.
13. Sherr DH, Braun J, Dorf ME: Idiotype-specific Ly-1 B cell-mediated helper activity: hybridomas that produce anti-idiotypic antibody and nonimmunoglobulin lymphokine(s). *J Immunol*. 1987; 138:2057-2062.
14. Ono K, Kato F, Taniguchi M: Possible involvement of Ly-1 B cells in the effector phase of IgG suppression mediated by suppressor T cell factor. *J Mol Cell Immunol*. 1987; 3:167-175.
15. Miyama-Inaba M, Kuma S, Inaba K, et al: Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *J Exp Med*. 1988; 168:811-816.
16. Dighiero G, Lim A, Lembezat M-P, et al: comparative study of VH gene family usage by newborn xid and non-xid mice, newborn NZB and adult NZB mice, and by splenic and peritoneal cavity B cell compartments. *Eur J Immunol*. 1988; 18:1979-1983.
17. Hardy RR, Carnak CE, Shinton SA, et al: A single VH gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the VH11 family. *J Immunol*. 1989; 142: 3643-3651.
18. Pennell CA, Arnold LW, Haughton G, et al: Restricted Ig variable region gene expression among Ly-1⁺ B cell lymphomas. *J Immunol*. 1988; 142:2788-2796.
19. Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, et al: The "Ly-1" B cell subpopulation in normal, immunodeficient and autoimmune mice. *J Exp Med*. 1983; 157:202-218.
20. Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, et al: Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81:2494-2498.
21. Conger JD, Pike BL, Nossal GJV: Clonal analysis of the anti-DNA repertoire of murine B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:2931-2935.
22. Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA, et al: Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur J Immunol*. 1986; 16:450-456.

23. Antin JH, Emerson SG, Martin P, et al: Leu-1⁺ (CD5⁺) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J Immunol.* 1986; **136**:505-510.
24. Jyonouchi H, Voss RM, Good RA: The presence of autoantibodies specific for NZB serum factors in adult NZB mice and the establishment of monoclonal autoantibodies against these humoral factors. *Cell Immunol.* 1988; **113**:158-174.
25. Gershwin ME, Beach RS, Hurley LS: Nutrition and Immunity. 1985; San Diego CA, Academic.
26. Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS: Nutritional factors and autoimmunity. I. Immunopathology of zinc deprivation in New Zealand mice. *J Immunol.* 1981; **126**:1999-2006.
27. Seyfetr VL, Sukhatme VP, Monroe JG: Differential expression of a zinc finger-encoding gene in response to positive versus negative signaling through receptor immunoglobulin in murine B lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 1989; **9**:2083-2088.
28. Csermely P, Szamel M, Resch K, et al: Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1988; **263**:6487-6490.
29. Carr R, Forsyth S, Sadi D: Abnormal responses to ingested substances in murine systemic lupus erythematosus: apparent effect of a casein-free diet on the development of systemic lupus erythematosus in NZB/W mice. *J Rheumatol.* (suppl 13). 1987; **14**:158-165.
30. Cowdery JS, McKiernan FE: Analysis of the T cell and B cell function in Peyer's patch and lamina propria of New Zealand Black and DBA/2 mice. *J Immunol.* 1986; **136**:4070-4074.
31. Herron LR, Coffman RL, Bond MW, et al: Increased antibody production by NZB/NZW B cells in response to IL-5. *J Immunol.* 1987; **141**:842-848.
32. Cowdery JS, Pitts AK: Role of T cells in regulating expression of B cell repertoire. Anti-ssDNA precursor frequency of DBA/2 B cells is increased in the presence of T cells from NZB mice. *J Immunol.* 1988; **140**:1380-1384.
33. Miller RD, Calkins CE: Active role of T cells in promoting an in vitro autoantibody response to self erythrocytes in NZB mice. *Immunology.* 1980; **63**:625-630.
34. Laskin CA, Haddad G, Saloninka CA: The regulatory role of NZB T lymphocytes in the production of anti-DNA antibodies in vitro. *J Immunol.* 1973; **137**:1867-1873.
35. Ando DG, Sercarz EE, Hahn BH: Mechanisms of T and B cell collaboration in the in vitro production of anti-DNA antibodies in the NZB/NZW F1 murine SLE model. *J Immunol.* 1987; **138**:3185-3190.
36. Dore-Duffy P, Guha A, Rothman BL, et al: Synthesis of prostaglandin E by peritoneal macrophages from NZB/W mice. *Life Sci.* 1988; **42**:2669-2676.
37. Philips R, Lomnitzer R, Rabson AR: Defective dendritic cells accessory function in NZB/W F1 hybrid mice. *J Clin Lab Immunol.* 1988; **25**:139-142.
38. Granger SC, Patel MR, Linna TJ: Decreased natural killer-type activity of spleen cells against immature thymocytes in autoimmune strains of mice. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 1985; **4**:178-183.
39. Naiki M, Imai Y, Kamita Y, et al: Effect of autoreactive T cell clone from (NZB/NZW)F1 mice on the production of anti-DNA antibodies in vivo and in vitro. *Immunol Lett.* 1988; **18**:281-288.
40. Yanoma S, Aoki I, Ishii N, et al: The role of autoreactive T-cell hybridomas from autoimmune model mice. *Immunology.* 1988; **64**:113-119.
41. Portanova JP, Claman HN, Kotzin BL: Autoimmunization in murine graft-vs-host disease. I. Selective production of antibodies to histones and DNA. *J Immunol.* 1985; **135**:3850-3856.
42. Bray KR, Gershwin ME, Ahmed A, et al: Tissue localization and biochemical characteristics of a new thymic antigen recognized by a monoclonal thymocytotoxic autoantibody from New Zealand Black mice. *J Immunol.* 1985; **134**:4001-4008.
43. Cunningham AJ. Large number of cells in normal mice produce antibody components of isologous erythrocytes. *Nature.* 1974; **254**:749-751.
44. Abe R, Hodes RJ: The Mls system: non-MHC genes that encode strong T-cell stimulatory determinants. *Immunology Today.* 1988; **9**:230-235.
45. Andrewa BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, et al: Spontaneous murine lupus-like syndrome. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med.* 1978; **148**:1198-1215.

46. Gershwin ME, Ikeda RM, Kruse WL, et al: Age-dependent loss in New Zealand mice of morphological and functional characteristics of thymic epithelial cells. *J Immunol.* 1978; **120**:971-979.
47. Datta SK, Owen FL, Womack JE, et al: Analysis of recombinant inbred lines derived from "autoimmune" (NZB) and "high leukemia" (CD58) strains: Independent multigenic systems control B cell hyperactivity, retrovirus expression, and autoimmunity. *J Immunol.* 1982; **129**:1539-1544.
48. Raveche ES, Novotny EA, Hansen CT, et al: Genetic studies of NZB mice. V. Recombinant inbred lines demonstrate that separate genes control autoimmune phenotype. *J Exp Med.* 1981; **153**:1187-1197.
49. Miller ML, Raveche ES, Laskin CA, et al: Genetic Studies in NZB mice. VI. Association of autoimmune strains in recombinant inbred lines. *J Immunol.* 1984; **133**:1325-1331.
50. Shirai T, Hirose S, Sekigawa I, et al: Genetic and cellular basis of anti-DNA antibody synthesis in systemic lupus erythematosus of New Zealand mice. *J Rheumatol.* (suppl 13). 1987; **14**:11-20.
51. Bowie EJW, Thomson JH, Pascuzzi CA, et al. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med.* 1963; **62**:416-420.
52. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1983; **2**:1211-1214.
53. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, et al. Measurement of anticardiolipin antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol.* 1985; **62**:738-745.
54. Hugues GRV, Harris EN, Gharavi AE. The cardiolipin syndrome. *J Rheumatol.* 1986; **13**:486-489.
55. Alarcón-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1989; **16**:482-488.
56. Macworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorders. *Ann Rheum Dis.* 1989; **48**:362-367.
57. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: Major clinical and serological features. *Medicine (Balt).* 1989; **68**:366-374.
58. Lord EM, Dutton RW. The properties of plaque-forming cells from autoimmune and normal strains of mice with specificity for autologous erythrocyte antigens. *J Immunol.* 1975; **115**:1199-1205.
59. Cox KO, Hardy SJ. Autoantibodies against mouse bromelain-modified RBC are specifically inhibited by a common membrane phospholipid, phosphatidylcholine. *Immunology.* 1985; **55**:263-269.
60. Mercolino TJ, Arnold LW, Hanghton G. Phosphatidylcholine is recognized by a series of Ly-1+ B cell lymphomas specific for erythrocyte membrane. *J Exp Med.* 1986; **163**:155-165.
61. Cook GM, Herd DM and Seaman GVF. A sialomucopolypeptide liberated by trypsin from the human erythrocytes. *Nature.* 1969; **188**:1011-1012.
62. Priofsky B. Autoimmunization and the autoimmune hemolytic anemias. *Williams and Wilkins.* Baltimore, 1969.
63. Adib M, Ragimbeau J, Avrameas S, Ternynck. IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. *J Immunol.* 1990; **144**:3807-3813.
64. Mercolino TJ, Locke AL, Afshari A, Sasser D, Travis WW, Arnold LW and Hanghton G. Restricted immunoglobulin variable gene usage by normal Ly-1(CD5⁺) B cells that recognize phosphatidylcholine. *J Exp Med.* 1989; **169**:1869-1877.
65. Casali P, Burastero SE, Nakamura M, Inghirami G and Notkins AL. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1⁺ B cell subset. *Science.* 1987; **236**:77-81.
66. Hardy RR, Hayakawa K, Shimizu M, Yamasaki K and Kishimoto T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1⁺ B cells. *Science.* 1987; **236**:81-83.
67. Mercolino TJ, Arnold LW, Hawkins LA, et al. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidylcholine. Relationship to cell that

- secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. *J Exp Med.* 1988; 168:687-698.
68. Marcos MAR, Huetz F, Pereira P, Andreu JL, Matínez-A C, Coutinho A. Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1989; 19:2031-2035.
 69. Pennell CA, Shehan KM Brodeur PH, et al. Organization and expression of V_H gene families preferentially expressed by Ly-1+ (CD5+) B cells. *Eur J Immunol.* 1989; 19:2115-2121.
 70. Conger JD, Sage HJ, Corley RB, et al. Diversity of the available repertoire of murine antibodies reactive with bromelain-treated isologous erythrocytes. *J Immunol.* 1989 143:4044-4052.
 71. Andrade L, Huetz F, Poncet P, et al. Biased V_H gene expression in murine CD5 B cells results from age-dependent cellular selection. *Eur J Immunol.* 1991; 21:2017-2023.
 72. Yoshida S, Castle JJ, Gershwin ME. The pathogenesis of autoimmunity in *New Zealand Mice*. *Semin Arthritis Rheum.* 1990; 19:224-242.
 73. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Hemolytic anemia related to an IgM autoantibodies to phosphatidilcholine that binds *in vitro* to stored and to bromelain-treated human erythrocytes. *J Autoimmunity.* 1990; 3:773-787.
 74. Shoenfeld Y, Teplizki HA, Mendlovic S, Blank M, Mozes E, Isemberg DA. The role of the human anti-DNA idiotype 16/6 in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989; 51:313-325.
 75. Villarreal GM, Alarcón-Segovia D, Villa AR, Cabral AR and Shoenfeld Y. Presence of a 16/6-related human anti-DNA common idiotype (SA₁) in the serum of patients with the primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1991; 18:1537-1541.
 76. Chen P, Liu M, Sinha S, Carson D. A 16/6 idiotype-positive anti-DNA antibody is encoded by a conserved V_H gene with no somatic mutation. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:1429-1431.
 77. Velasquillo MC, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D, et al. Some patients with primary antiphospholipid syndrome have increased circulating CD5⁺ B cells that correlate with levels of IgM antiphospholipid antibodies. *J Clin Exp Rheum.* 1991; 9:501-505.
 78. Granados J, Alarcón-Segovia D, Oria CV, Andrade F. Anticardiolipin antibodies (ACLA) in families of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Relationship to complement genotypes. (Abstract). *Arthritis Rheum.* 1987; 30:22.
 79. Cabiedes J. Estudio Inmunogenético de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y pacientes con LEG. *Tesis de Licenciatura.* 1989.
 80. McHugh NJ, Maddison PJ. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989; 32:1623-1624.
 81. Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, et al. Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:124-125.
 82. Granados-Arriola J, Vargas-Alarcón G, Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Polimorfismo genético del HLA-DR y HLA-DQ en pacientes con síndrome de antifosfolípido primario (SAFP). (Abstract). *Rev Mex Reumatol.* 1991; 6:21.
 83. Vargas-Alarcón G, Granados-Arriola J, Bekker C, et al. Association of HLA-DR5 (possibly DRB1*1201) with the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients. *Arth Rheum.* 1995; 18:1340-1343.
 84. Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Evolución clínica, tratamiento y causas de muerte en 23 pacientes con síndrome de antifosfolípido primario. (Abstract). *Rev Mex Reumatol.* 1991; 6:39.
 85. Alarcón-Segovia D. Pathogenic potential of anti-phospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1988; 15:890-893.
 86. Shoenfeld Y, Mozes E. Pathogenic idiotypes of autoantibodies in autoimmunity: lessons from new experimental models of SLE. *FASEB J.* 1990; 4:2646-2651.
 87. Mendlovic S, Levy Y, Mozes E. Specific proliferative responses following the induction of experimental SLE in mice. *Immunol Lett.* 1991; 27:69-74.
 88. Mendlovic S, Segal R, Shoenfeld Y, Mozes E. Anti DNA- idiotype- and anti-idiotype-specific T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus and their first-degree relatives. *Clin Exp Immunol.* 1990; 82:504-508.

89. Puccetti A, Koizumi T, Migliorini P, Andre-Schwartz J, Barrett KJ, Schwartz RS. An immunoglobulin light chain from a lupus-prone mouse induces autoantibodies in normal mice. *J Exp med.* 1990; **171**:1919-1930.
90. Weisbart RH, Noritake DT, Wong AL, et al. A conserved anti-DNA antibody idotype associated with nephritis in murine and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1990; **144**:2653-2658.
91. Talal N Garry RF, Schur PH, et al. A conserved idotype and antibodies to retroviral proteins in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1990; **85**:1866-1871.
92. Stocks MR, Williams DG, Maini RN. Analysis of a positive feedback mechanism in the anti-Sm autoantibody response of MLR-MPS-*lpr/lpr* mice. *Eur J Immunol.* 1991; **21**:267-272.
93. Ruiz-Argüelles A, Vazquez-Prado J, Tenorio-Mendoza C, et al. Anti-idiotypic activity of antiphospholipid antibodies I. Goat antibodies to human coagulation protein C express idiotypes recognized by "natural" and "pathologic" human antiphospholipid antibodies. (Enviado).
94. Canoso RT, Sise HS. Chlorpromazine induced lupus anticoagulant in chlorpromazine-patients. *Am J Hematol.* 1982; **13**:121-129.
95. Dubois EL, Tallman E, Wonka RA. Chlorpromazine induced systemic lupus erythematosus. Case report and review of the literature. *J Amer Med Assoc.* 1972; **221**:595-596.
96. Alarcón-Segovia D, Fishbein E, Cetina JA, Raya RJ, Becerra E. Antigenic specificity of chlorpromazine-induced antinuclear antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1973; **15**:543-548.
97. Colaco CB, Mackie IJ, Irving W, Machin SJ. Anticardiolipin antibodies in viral infections. *Lancet.* 1989; **1**:622.
98. Cohen AJ, Phillips TM, Kessler CM. Circulating coagulation inhibition in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1986; **104**:175-180.
99. Gold JE, Haubenstock A, Zaluski R. Lupus anticoagulant and AIDS. *New Engl J Med.* 1986; **314**:1252-1253.
100. Maclean C, Flegg FJ, Kilpatrick DC. Anticardiolipin antibodies and HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 1990; **81**:263-266.
101. Delezé M, Alarcón-Segovia D, Oria CV et al. Hemocytopenia in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1989; **16**:926-930.
102. Connor J, Bucana C, Fidler IJ, Schroit AJ. Differentiation-dependent expression of phosphatidyl-serine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1989; **86**:3184-3188.
103. Alarcón-Segovia D. Pathogenetic potential of antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1988; **15**:890-893.
104. Staub HL, Harris EN, Khamashta MA et al. Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis. *Ann Rheum Dis.* 1989; **48**: 166-169.
105. Jenkins WJ and Marsh WL. Autoimmune haemolytic anemia. Three cases with antibodies specifically active against stored red cells. *Lancet.* 1961; **1**:16-18.
106. Oken M, Griffiths RW, Williams RC, Reimann BEF. Possible NZB syndrome in man. *Arch Intern Med.* 1973; **132**: 237-240.
107. Cooper MR, Cohen HJ, Huntley CC et al. A monoclonal IgM with antibodylike specificity for phospholipids in patient with lymphoma. *Blood.* 1974; **43**:493-504.
108. Del Papa N, Meroni PL, Barcellini W et al. Antiphospholipid antibodies cross-reacting with erythrocyte membrane. A case report. *Clin Exp Rheumatol.* 1992; **10**:395-399.
109. Pérez-Vazquez ME, Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Fall in serum antiphospholipid antibodies levels upon development of nephrotic syndrome in systemic lupus erythematosus patients. Relationship to urinary loss of IgG and to other factors. *Am J Med.* 1992; **92**:357-362.
110. Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ. Peripheral vascular syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med.* 1965; **62**:907-919.
111. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A retrospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine.* 1989; **68**:353-365.

112. Kamashta MA, Cervera R, Asherson RA, et al. Association of antibodies against phospholipids with heart valve disease in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1990; 335:1541-1544.
113. Walz S, Kong HHP, Siver R. Adrenal failure and the primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1990; 17:836-837.
114. Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Evolución clínica, tratamiento y causas de muerte en 23 pacientes con síndrome de antifosfolípidos primario. (Abstract). *Rev Mex Reumatol*. 1991; 6:39.
115. Ishii Y, Nagasawa K, Mayumi T, Niho Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1990; 49:387-390.
116. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RS, et al. Anticardiolipin antibodies: Isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 1987; 46:1-6.
117. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Hemolytic anemia (HA) in systemic lupus erythematosus (SLE) associates strongly with IgM anti-phosphatidylcholine antibodies (aPTC). (abstract). *Clin Exp Rheumatol*. 8:212.
118. Loizou S, Mackworth-Young CG, Cofier C, Walport MJ. Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipids of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and with syphilis. *Clin Exp Immunol*. 1990; 80:171-176.
119. Qamar T, Gharavi AE, Levy RA, Lockshin MD. Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds. *J Clin Immunol*. 1990; 10:200-203.
120. Rauch J, Tannenbaum M, Tannenbaum H, Ramelson H, Cullis FR, Tilcock CPS, Hope MJ, Janoff AS. Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid system. *J Biol Chem*. 1986; 261:9672-9677.
121. Rauch J, Janoff AS. Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: Evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phase in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:4112-4114.
122. Costello PS, Powell GL, Green FA. The structural requirements for anticardiolipin antibody binding in sera from patients with syphilis and SLE. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990; 53:393-400.
123. Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR, Habina L, Lockshin MD. Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody. *J Clin Immunol*. 1990; 10:141-145.
124. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood*. 1987; 70:69-76.
125. McNeil HP, Chesterman CN, Krillis SA. Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *Br J Haematol*. 1989; 73:506-513.
126. Valesini G, Violi F, Ferro D, Quintarelli C, Falco A, Tincani A, Balestrieri G, Balsano F. Anticardiolipin antibodies possess anticoagulant activity which is blocked by a monoclonal antibody against a cross reacting idiotype of antiphospholipid antibodies. *Clin Exp Immunol*. 1989; 7:615-622.
127. Branch DW, Rote NS, Dostal DA, Scott JR. Association of anticoagulant with antibody against phosphatidylserine. *Clin Immunol Immunopathol*. 1987; 42:63-75.
128. Vismara A, Meroni PL, Tincani A, et al. Relationship between anticardiolipin and antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 1988; 74:247-253.
129. Hasselaar P, Derksen RHW, Blokzijl L, De Groot PG. Thrombosis associated with antiphospholipid antibodies cannot be explained by effects on endothelial and platelet prostanoid synthesis. *Thromb Haemostas*. 1988; 59:80-85.
130. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krillis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 glycoprotein-I (apo H). *Proc Natl Acad Sci*. 1990; 87:4120-4124.
131. Galli M, Confurius P, Maassen C, Hemeker HC, De Beets MH et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma cofactor. *Lancet*. 1990; 335:1544-1547.
132. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa T and Koike T. Anticardiolipin Cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease (letter). *Lancet*. 1990; 336:177-178.

133. Bevers EM and Galli M: Cofactors involved in the Antiphospholipid Syndrome. *Lupus*. 1992; 1:51-52.
134. Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS: Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies. *Thromb Res*. 1991; 61:291-299.
135. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krillis SA: A phospholipid- β_2 glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune diseases but not with infection. *Lupus*. 1992; 1:75-82.
136. Sammaritano LR, Lockshin MD, Gharavi AE: Antiphospholipid antibodies differ in antiphospholipid cofactor requirement. *Lupus*. 1992; 1:83-90.
137. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K et al: Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J Immunol*. 1992; 148:3885-3891.
138. Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Yasuda T and Koike T: Molecular definition of human β_2 glycoprotein-I (β_2 GPI) by cDNA cloning and inter-species differences of β_2 GPI in alteration of anticardiolipin binding. *Int Immunol*. 1991; 3:1217-1221.
139. Viard JP, Amoura Z and Bach JP. Association of β_2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1992; 93:181-186.
140. Arviux J, Roussel B, Ponard D and Colomb MG. IgG2 subclass restriction of anti- β_2 glycoprotein I antibodies in autoimmune patients. *Clin Exp Immunol*. 1994; 95:310-315.
141. Shoenfeld Y and Meroni PL. The beta-2-glycoprotein I and antiphospholipid antibodies. Workshop report. *Clin Exp Rheumatol*. 1992; 10:205-209.
142. Schousboe I. β_2 -glycoprotein I. A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*. 1985; 66:1086-1091.
143. Nimpf J, Bevers EM and Bomans PHH. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β_2 -glycoprotein I. *Biochem Biophys Acta*. 1986; 884:142-149.
144. Rothoy RAS. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulant and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood*. 1994; 84:2854-2867.
145. Cabral AR, Cabiedes J and Alarcón-Segovia D. Antibodies to phospholipid-free β_2 -glycoprotein-I in patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1995; 22:1894-1898.
146. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, et al: Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Sem Arthritis Rheum*. 1992; 21:275-286.
147. Cabiedes J, Cabral AR and Alarcón-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- β_2 -glycoprotein-I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol*. 1995; 22:1899-1906.
148. Alarcón-Segovia D, Cabral AR. Functional and immunochemical heterogeneity of antiphospholipid antibodies: a classification. *J Rheumatol*. 1992; 19:1166-1169.
149. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J. Phospholipid specificity and requirement of β_2 glycoprotein-I for reactivity of antibodies from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity*. (En prensa).
150. Bevers EM, Galli M, Barbu T, Confurius P, Zwaals RFA. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost*. 1991; 66:629-632.
151. Reininger L, Shibata T, Shurmans S, et al. Spontaneous production of anti-mouse red blood cell autoantibodies is independent of the polyclonal activation in NZB mice. *Eur J Immunol*. 1990; 20:2405-2410.
152. Guzmán J, Cabral AR, Cabiedes J, Pita Ramirez J, Alarcón-Segovia D. Antiphospholipid antibodies in patients with idiopathic autoimmune haemolytic anemia. *Autoimmunity*. 1994; 18:51-56.
153. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Anticuerpos anti-fosfatidilcolina (aFTC) en lupus eritematoso generalizado (LEG). Asociación con anemia hemolítica (abstr). *Rev Mex Reumatol*. 1990; 5:55.
154. Cheng HM, Ngenow YF, Sam ChK: Heat inactivation of serum potentiates anti-cardiolipin antibody binding in ELISA. *J Immunol Methods*. 1989; 124:235-238.

155. Harris En Gharavi AE, Wasley GD and Hugues GRV: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and of inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with siphilis or autoimmune disorders. *J Infect Dis.* 1988; **157**:23-31.
156. Cheng HM and Wong KK: Antiphospholipid antibody in normal human sera. *Immunol Lett.* 1989/1990; **23**:183-186.
157. Hasselaar P, Triplett D, La Rue A, et al: Heat treatment of serum and plasma induces false positive results in the antiphospholipid antibody ELISA. *J Rheumatol.* 1990; **17**:186-191.
158. Cabiedes J: Anticuerpos anti-fosfatidilcolina como anticuerpos naturales. *Tesis de Maestria en Ciencias Biomédicas (Inmunología).* 1993.
159. Cabral AR, Cabiedes J and Alarcón-Segovia D: Hemolytic anemia related to an IgM antibodies to phosphatidylcholine that binds *in vitro* to stored and to bromelain-treated human erythrocytes. *J Autoimmunity.* 1990; **3**:773-787.
160. Nava A, Bañales JL and Reyes PA: Effect of heat inactivation and sheet erythrocyte adsorption on titer of anticardiolipin antibodies in primary antiphospholipid syndrome and healthy blood donor's sera. *J Clin Lab Analysis.* 1992; **6**:148-150.
161. Tan EM, Cohen AS, Fies JF et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; **25**:1271-1277.
162. Alarcón-Segovia D and Sanchez Guerrero J: Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1989; **16**:482-485.
163. Koike T, Ichikawa K. Immunological aspects of monoclonal anti-cardiolipin antibodies derived from SLE prone mice. *Proceedings of the second international conference on systemic lupus erythematosus.* Singapore 1989; 146-154.
164. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**:265-275.
165. Laemli UR. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature.* 1970; **227**:680.
166. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from SDS and acid/urea polyacrylamide gels to nitrocellulose Sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; **76**:4350-4354.
167. Polz E, Wurm H, Kostner GM. Investigation on β_2 glycoprotein I in the rat: isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions. *Int J Biochem.* 1980; **11**:265-270.
168. Mangold KH. Thin-layer chromatography. Ed. Egon. 2^{da}. Edición. 1969.
169. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Triplett DA: Detection of antiphospholipid antibodies in heat inactivated normal sera. *Thromb Res. (Letter).* 1993; **69**:489-490.
170. Kawaguchi S. Antiphospholipid antibodies reactive with bromelain-treated erythrocytes in mice, rats and rabbits. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991; **96**: 46-50.
171. Kouts S, Wang MX, Adelstein S, and Krilis S. Immunization of rabbit with β_2 -Glycoprotein I induces charge-dependent crossreactive antibodies that bind anionic phospholipids and have similar reactivity as autoimmune anti-phospholipid antibodies. *J Immunol.* 1995; **155**:958-966.
172. Exner T & Triplett D. Lupus anticoagulants: characteristics methods of laboratory detections and some clinical associations. In: Phospholipid-binding antibodies. Harris EN, Exner T, Hughes GRV and Asherson RA. (eds). CRC Press, Inc. 1991, pp 141-158.
173. Ayres GH. Análisis Químico Cuantitativo. HARLA Harper & Row. De. Latinoamericana. Segunda Edición, 1970. p 185-186.
174. Delezé M, Oria CV, Alarcón-Segovia D. Occurrence of both haemolytic anemia and thrombocytopenic purpura (Evan's syndrome) in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 1988; **15**:611-615.
175. Cabiedes J, Cabral AR and Alarcón-Segovia D: Detection of anticardiolipin antibodies in heat-inactivated normal human sera is not influenced by β_2 -glycoprotein-I. *Thromb Res.* 1993; **72**:471-472.
176. Cheng HM. Inhibitory and enhancing activity of β_2 -glycoprotein-I on antiphospholipid antibody binding (Letter). *Stroke.* 1992; **23**:1683-1684.
177. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Identification of four populations of IgG anticardiolipin antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome on basis of their requirement for β_2 -glycoprotein-I and their unmasking by heat. *Clin Exp Rheumatol.* 1994; **12**:123-127.

178. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RFA, and Bevers E. Anticoagulant activity of β_2 -Glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemostas*. 1992; 68:297-300.
179. Avrameas S, and Teynck T. The natural autoantibodies system: between hypothesis and facts. *Molec Immun*. 1993; 30:1133-1142.
180. Ortiz Maslloréns F. El factor reumatoide como ejemplo de la heterogeneidad funcional de las inmunoglobulinas. *Inflamación*. 1992; 3:487-496.
181. Mackiewicz A, Kushner I, Baummann H. Acute Phase Proteins. *Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications*. CRC Press, Inc. 1993. p 3-19.

SOLO ES PERDEDOR EL QUE DEJA DE LUCHAR.

Richard Nixon.