

00544

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

**ANTICUERPOS ANTIPROTROMBINA EN
NIÑOS CON LUPUS ERITEMATOSO
SISTEMICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALIDAD EN BIOQUIMICA CLINICA

P R E S E N T A:

Q.F.B. MARIA GEORGINA GONZALEZ ZARATE

ASESORES:

**Dr. RENATO BERRON PEREZ
M. en C.: FRANCISCO LOPEZ LIRA
Q.F.B. ANGELICA PLAZA GONZALEZ.**

MEXICO, D.F.

JUNIO, 2000

0516122



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado:

Dra. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta

Dra. Rebeca Franco Bourland

Dra. Patricia Baz Gutiérrez

QFB. Esp. B.C. Romelia Velasco Ortíz

M. en C. Francisco López Lira.

“Cuando la sabiduría entrare en tu corazón, y la ciencia fuere grata a tu alma, la discreción te guardará y te preservará la inteligencia”.

Proverbios 2:10

Deseo agradecer al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y de manera especial a las autoridades del Hospital Gral. Dr. Fernando Quiróz Gutiérrez por haberme otorgado todo el apoyo en el programa de superación académica para realizar los estudios de especialista en Bioquímica Clínica que imparte la Facultad de Química (UNAM). Así mismo mi agradecimiento al Instituto Nacional de Pediatría (INP) por haberme abierto las puertas para realizar satisfactoriamente mi trabajo de investigación, brindándome sus instalaciones y el gran profesionalismo de su personal.

Dedicada a:

A mi padre: Sr. Jorge González Celaya, quien en los momentos más difíciles siempre me ha dado fuerza para seguir adelante y con su ejemplo me ha enseñado el camino del trabajo y la honradez.

A mi madre: Sra. Cointa Zárate de González, quien con su ejemplo de amor, entrega, trabajo y sacrificio logró hacer de mí una profesionalista, apoyándome siempre en todo momento, para quien mi agradecimiento será eterno.

A mi hijo: Jorge Andrade González, por su gran amor y comprensión, por ser el mejor y más grande regalo de mi vida.

A mi hermano: Jorge González Zárate, por su valiosa presencia, siempre cerca de mí, dándome su apoyo y por los momentos felices que pasamos juntos desde niños, llenando mi vida de alegría.

A mi cuñada Martha Arévalo y a mis sobrinos Eleazar y Aarón González Arévalo, por su amor y ternura que siempre me han brindado

Con todo cariño y respeto a la memoria de **mi tía** María Zárate de Molina, quien fue "La Rosa que perfumó mi infancia".

A mis amigos: Angélica Plaza González y Francisco López Lira, “dos personajes” que aportaron grandes enseñanzas a mi vida profesional. Les estoy profundamente agradecida por su valiosa ayuda, estímulo y consejos que siempre me brindaron. Gracias por haberme permitido formar parte de su equipo en este periodo de tiempo, que para mí fue de gran valor y sumamente edificante.

A mi amigo: Jesús Reséndiz, por su constante ayuda y apoyo moral.

A mi amiga: Claudia González, por los momentos felices que pasamos juntas.

Agradecimientos:

A mis maestras con profunda admiración y cariño:

Dra. Dolores Lastra

Dra. Victoria Valles

Dra. Rebeca Franco

por ser fuente de motivación para estudiar la especialidad en Bioquímica Clínica.

Al Maestro Renato D. Berrón por sus grandes enseñanzas y por haberme dado la oportunidad de desarrollar el presente trabajo.

A la Q.F.B. Esp. B.C. Romelia Velasco y QBP Carmen Velasco, por su gran apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Blanca H. Ruíz Ordaz, con profundo agradecimiento por su constante ayuda en mi camino.

ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
I. RESUMEN	5
II. ANTECEDENTES	7
III. INTRODUCCIÓN	10
1. Protrombina	12
2. Reacciones de coagulación dependientes de fosfolípidos.	14
3. Complejo protrombinasa.	17
4. Anticuerpos anti-protrombina	19
IV. JUSTIFICACIÓN	21
V. HIPÓTESIS	22
VI. OBJETIVOS	23
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	24
1. Pacientes y muestras.	24
2. Valor de corte	24
3. Determinación de anticuerpos antiprotrombina	25
4. Análisis estadístico	26
VIII. RESULTADOS	27
IX. DISCUSIÓN	33
X. CONCLUSIONES	35
XI. BIBLIOGRAFÍA	36
XII. ANEXOS	42

ABREVIATURAS

aCL	Anticuerpos anticardiolipina.
aFL	Anticuerpos antifosfolípido.
AL	Anticoagulante Lúpico.
aPT	Anticuerpos anti-protrombina.
ASB	Albúmina Sérica Bovina.
β2GPI	Beta-2-glicoproteína I.
D.E.	Desviación estándar.
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
F V	Factor V de la coagulación sanguínea.
F Va	Factor V activado.
F VII	Factor VII de la coagulación sanguínea.
V VIIa	Factor VII activado.
F VIII	Factor VIII de la coagulación sanguínea.
F VIIIa	Factor VIII activado.
F IX	Factor IX de la coagulación sanguínea.
F IXa	Factor IX activado.
F X	Factor X de la coagulación sanguínea.
F Xa	Factor X activado.
F XI	Factor XI de la coagulación sanguínea.
F XIa	Factor XI activado.
F XII	Factor XII de la coagulación sanguínea.
F XIIa	Factor XII activado.
UGPL	Unidad de medida para la cantidad de proteína o fosfolípido que se une a un microgramo de anticuerpo del isotipo IgG
HMWK	Cinínógeno de alto peso molecular
IgG	Inmunoglobulina G.
IgM	Inmunoglobulina M.
kDa	Kilodalton.
LES	Lupus Eritematoso Sistémico.

UMPL	Unidad de medida para la cantidad de proteína o fosfolípido que se une a un microgramo de anticuerpo del isotipo IgM.
OPD	Ortofenilendiamina.
PBS	Buffer de fosfato salino.
PC	Proteína C de la coagulación.
PS	Proteína S libre.
r.p.m.	revoluciones por minuto.
SAF	Síndrome antifosfolípido.
SCR	Secuencias repetidas de concensos cortos.
VVR	Tiempo de veneno de víbora de Russell.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo hipotético de la generación de anticuerpos aFL en el SAF.
- Figura 2. Estructura de la protrombina.
- Figura 3. Comparación de dos módulos estructurales.
- Figura 4. Cascada de la Coagulación Sanguínea.
- Figura 5. Modelo del complejo "Protrombinasa".
- Figura 6. Anticuerpos antiprotrombina en población pediátrica.
- Figura 7. Prevalencia del isotipo de anticuerpos antiprotrombina.
- Figura 8. Diagrama esquemático de los isotipos IgG e IgM.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Criterio de clasificación para el síndrome antifosfolípido.
- Tabla 2. Determinación de anticuerpos antiprotrombina polivalente en una población de 20 sueros normales de pacientes pediátricos.
- Tabla 3. Pacientes positivos para anticuerpos antiprotrombina.
- Tabla 4. Pacientes negativos para anticuerpos antiprotrombina.

I. RESUMEN

La protrombina fue identificada por primera vez como cofactor de los anticuerpos antifosfolípido por Loeliger en 1959. Los anticuerpos antifosfolípido son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos que han sido definidos como aquellos anticuerpos que pueden ser detectados por medio de las pruebas de laboratorio para anticoagulante lúpico por ensayos de coagulación o por la determinación de anticuerpos anticardiolipina por ELISA. Recientemente se ha demostrado que estos anticuerpos reconocen como blanco antigénico a proteínas plasmáticas que se unen a fosfolípidos como son la proteína C, proteína S, factor V, protrombina y beta-2-glicoproteína I, siendo la protrombina y la beta-2-glicoproteína I mejor caracterizadas. Estudios realizados para verificar la presencia de anticuerpos antiprotrombina en pacientes adultos con lupus eritematoso sistémico (LES) han reportado una prevalencia del 22% al 58% de positividad, de los cuales el isotipo IgG ha sido asociado a trombosis. Los anticuerpos antiprotrombina (aPT) en niños son poco conocidos por lo que en base a lo mencionado anteriormente se procedió a estudiar la prevalencia de estos anticuerpos en una población pediátrica con LES, con el objeto de demostrar que los anticuerpos antifosfolípido reconocen a la protrombina como su blanco antigénico.

La determinación de anticuerpos aPT fue llevada a cabo por la técnica de ELISA, fijando la protrombina a una placa de microtitulación. Todos los pacientes que fueron estudiados en este trabajo (59 niñas y 3 niños) tienen LES, clasificado de acuerdo a los criterios establecidos por la Asociación Americana de Reumatología y que acuden regularmente a la consulta externa del Servicio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría. La mayoría fueron del sexo femenino con edades de 8 a 15 años (promedio 11.5 años) de los cuales 18/62 (29%) fueron positivos para anticuerpos aPT polivalente en base al punto de corte establecido a partir de un análisis de 20 muestras de sueros normales cuya media fue de 0.212 unidades de absorbencia a 492 nm (A_{492}) con una desviación estándar de 0.084 unidades de

absorbencia, tomándose como positivos aquellos pacientes que cumplieran con un valor de la media ± 5 desviaciones estándar. A los 18 pacientes positivos se les determinó el isotipo encontrándose que 5/18 (72.2%) para IgM.

Como conclusión de este trabajo se propone que la protrombina es reconocida como blanco antigénico de los anticuerpos antifosfolípido en una población pediátrica con LES. El anticuerpo que se manifestó con mayor prevalencia fue del isotipo IgM a diferencia de los estudios realizados en la población adulta, donde predomina el isotipo IgG. Por lo que este trabajo nos da la pauta a considerar las manifestaciones clínicas asociadas a los anticuerpos antifosfolípido en una población pediátrica con LES.

II. ANTECEDENTES

En 1952 los investigadores Conley y Hartmann reportaron por primera vez la existencia de un inhibidor de la coagulación en dos pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), los cuales paradójicamente, "in vitro", presentaban tiempo de sangrado y tiempo de protrombina (TP) prolongados (1). En estudios subsecuentes se observó que este inhibidor denominado anticoagulante lúpico (AL) era efectivamente se presentaba en enfermos con padecimientos trombóticos, en lugar de aquellos con problemas de un sangrado anormal (2). En 1974 fue reportado que el 27% de los pacientes con este inhibidor de la coagulación presentaban trombosis arterial o venosa (3). Posteriormente Lechner y Fabinger-Fasching (14) informaron de la existencia de esta complicación en 85 de 259 enfermos. Desde el punto de vista obstétrico fueron analizados un total de 75 muertes fetales tempranas a las cuales se les detectó AL, habiéndose logrado después del tratamiento médico tres embarazos (5). Actualmente se ha documentado una clara asociación entre las pérdidas fetales, los eventos tromboembólicos con presencia de AL, sin embargo la relación causa efecto aún no ha sido demostrada (5-6).

Se ha descrito que el AL es un anticuerpo que potencialmente actúa "in vitro" prolongando las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos, cuya especificidad inmunológica no está claramente definida. Se ha propuesto que reconoce a los fosfolípidos aniónicos con los cuales interfiere en las reacciones dependientes de fosfolípidos del sistema de la coagulación sanguínea, cuyo mecanismo de interacción aún es desconocido. Sin embargo, este concepto ha sido cuestionado recientemente, ya que el AL parece estar dirigido contra el complejo formado por fosfolípidos y proteínas plasmáticas como son la β 2GPI y muy importantemente contra la protrombina (7-8)

El AL pertenece a una clase heterogénea de autoanticuerpos denominados en su conjunto anticuerpos antifosfolípidos (aFL), los cuales asociados a trombosis

arterial o venosa, pérdida recurrente fetal y trombocitopenia, conforman el denominado Síndrome Antifosfolípido (SAF) (9).

Las primeras descripciones sobre la presencia de anticuerpos antifosfolípido en la población pediátrica fueron comunicadas por Olive y col. publicándose a partir de entonces varios casos sobre el papel de los anticuerpos antifosfolípido con el sistema nervioso central y trombosis en niños con lupus eritematoso sistémico.

Para el caso muy particular del AL, el cual es considerado como un anticuerpo contra la protrombina se han dividido en dos grupos:

- 1) Aquellos con actividad de AL, que difiere de los anticuerpos anticardiolipina (aCL).
- 2) Aquellos en que el AL es indistinguible de la actividad de anticuerpos aCL:

En el primer grupo la actividad de AL es dependiente de la protrombina humana y en el segundo la actividad AL es dependiente de la β 2GPI (10). (Fig. 1).

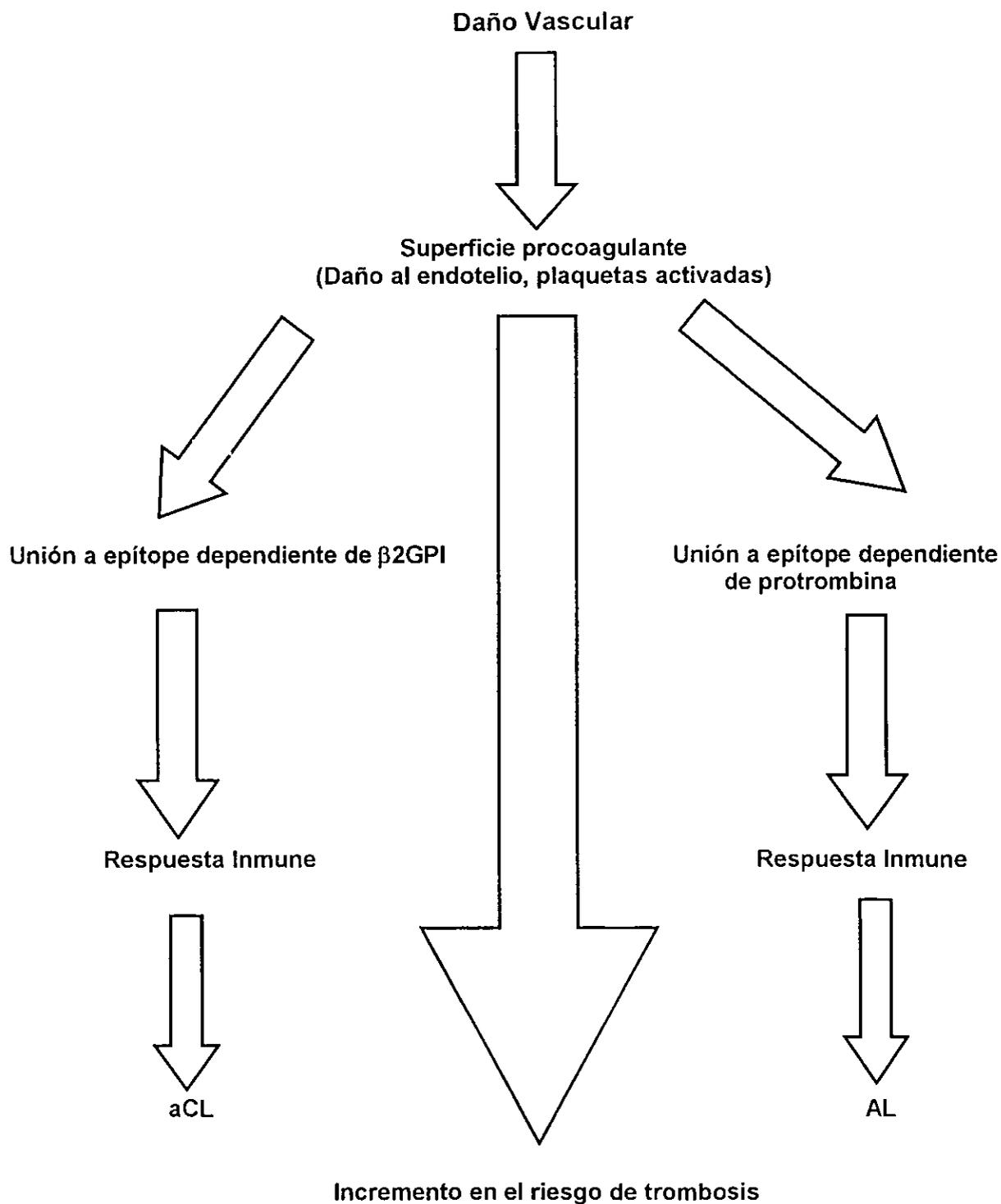


Figura 1. Modelo hipotético de la generación de anticuerpos aFL en el SAF. El modelo explica lo frecuentemente observado después del daño vascular, la exposición persistente de una superficie procoagulante puede inducir a la generación de estos anticuerpos y el incremento de riesgo de trombosis (10).

III. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos aFL son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos, que han sido objeto de múltiples investigaciones, ya que se ha demostrado que los fosfolípidos no son el único blanco antigénico, donde al parecer son poliespecíficos y están asociados a patologías que dificultan el reconocimiento de los blancos antigénicos (16). Estos anticuerpos son detectados en ensayos de AL, de anticuerpos aCL y en la prueba serológica para sífilis (17). El Síndrome Antifosfolípido SAF ha sido ampliamente estudiado en la población adulta, contrario a lo que ha sucedido en la población pediátrica donde se conoce poco sobre la prevalencia y significado clínico que puedan tener los anticuerpos aFL en la patogenia de la enfermedad. Una de las manifestaciones clínicas más importantes del SAF es la trombosis, donde las recurrencias trombóticas son muy frecuentes y suelen afectar al mismo territorio vascular. El significado patogénico de la correlación entre episodios trombóticos y presencia de anticuerpos aFL es por ahora desconocido, aunque numerosos trabajos han implicado a la hemostasia primaria y a los mecanismos reguladores de la coagulación en estos fenómenos trombóticos (12-13).

El SAF se ha clasificado en dos formas clínicas: 1.- primario: cuando no se encuentra asociado a ninguna enfermedad autoinmune y 2.- secundario: cuando se asocia a alguna enfermedad autoinmune principalmente LES (14). En 1989 Alarcón-Segovia y col. propusieron un criterio de clasificación del SAF, donde se considera que el SAF es "definido" cuando se presentan dos de las manifestaciones clínicas de este síndrome y elevados títulos de anticuerpos aFL. Si se presenta una manifestación clínica asociada a altos títulos de anticuerpos aFL, el SAF es "probable". Tabla 1.

Tabla 1. Criterio de clasificación para el Síndrome Antifosfolípido (15)

DEFINIDO

Dos o más manifestaciones clínicas:

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

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

PROBABLE

Una manifestación clínica y títulos elevados de anticuerpos aFL

ó

Dos o más manifestaciones clínicas y títulos bajo de anticuerpos aFL
(IgG ó IgM: 2-5 DE)

Uno de los avances más recientes en el estudio del mecanismo de acción de los anticuerpos aFL, es la demostración de que estos anticuerpos detectados por pruebas de ELISA requieren proteínas plasmáticas como "cofactores" para ejercer su actividad inmunológica, lo cual ha generado controversia sobre la antigenicidad fosfolípídica, por lo que la mayoría de los investigadores sostienen que los anticuerpos aFL no se unen directamente a fosfolípidos con carga negativa, sino a un complejo proteína-fosfolípido (18-19). Dentro de las proteínas plasmáticas que se unen a fosfolípidos mejor caracterizadas como blancos antigénicos se encuentran la β 2GPI y la Protrombina (10).

1.- PROTROMBINA

La protrombina es una glicoproteína plasmática que se sintetiza en el hígado y se secreta al torrente circulatorio como un zimógeno de 579 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 74 kDa. Se encuentra normalmente en el plasma sanguíneo en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y tiene una vida media de aproximadamente 3 días (20).

Estructuralmente la protrombina está formada por tres dominios.

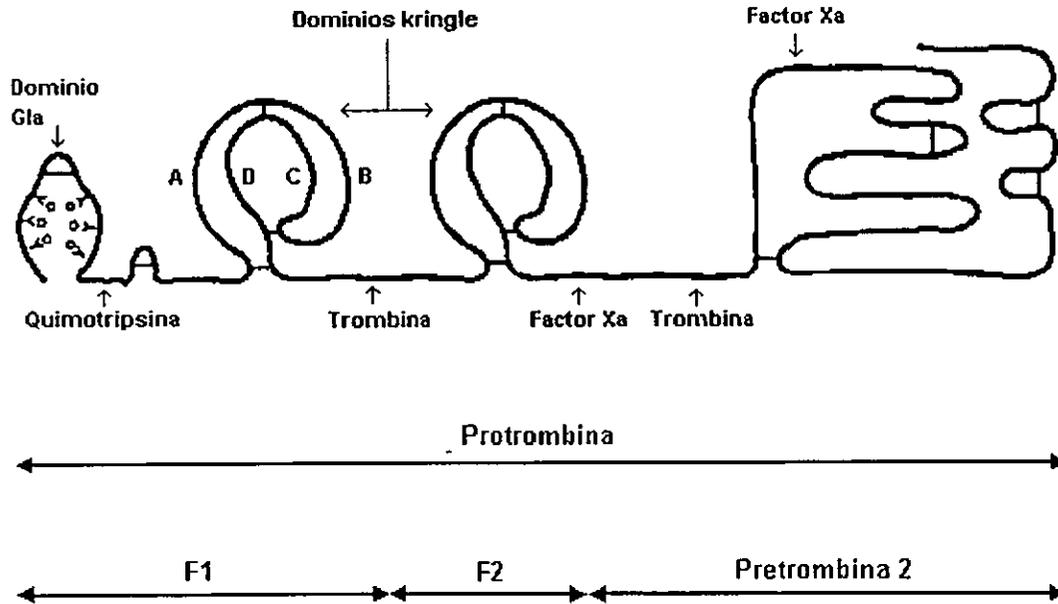


Figura 2. Estructura de la protrombina. Esquema de la organización en dominios de la protrombina Humana con algunos productos de activación (20).

Fragmento 1: Formado por un dominio Gla en la región amino terminal (10 residuos Gla-gamma carboxiglutamato) que resultan de la modificación post-ribosomal de residuos de ácido glutámico por la vitamina K, la función de estos residuos, es que

funcionan como puentes de iones Ca^{++} con fosfolípidos de membrana cargados negativamente. Este fragmento también contiene un primer dominio "Kringle". La estructura "Kringle" es un dominio común de las proteínas de la coagulación caracterizados por tener de 80 a 85 residuos de aminoácidos con tres uniones disulfuro. Las funciones de estos dominios no se conocen totalmente, pero parece ser que están involucrados en la unión a otras proteínas (21).

Fragmento 2: Está formado por un segundo dominio "Kringle" que se une a iones Ca^{++} y a la cadena pesada del factor Va en el complejo protrombinasa.

Pretrombina 2: Forma el precursor inmediato de la trombina α . (Fig. 2).

La protrombina en su forma de zimógeno, no tiene actividad coagulante y tiene que ser convertida en trombina para poder participar en la cascada de la coagulación. En presencia de calcio, la protrombina se une en la superficie fosfolípídica al FXa y al FVa formando el complejo protrombinasa. Este complejo es el responsable para la producción de trombina α , que permite localizar los eventos de la coagulación al sitio del daño.

La especificidad de los eventos moleculares en coagulación, es un prerrequisito para el control de la hemostasia y por lo tanto de la prevención de la trombosis (22). En el SAF los anticuerpos aFL interaccionan de alguna manera con una o varias proteínas que intervienen en la regulación de la coagulación produciendo trombosis.

Es interesante tomar en consideración que la principal característica estructural de la $\beta 2\text{GPI}$ como lo son los dominios SCR (*Short Concensus Repetition*) presentan una similitud estructural interna con los dominios "Kringle" observados en la protrombina, plasminógeno, etc. (Fig. 3) (23), donde se ha propuesto que las cisteínas conservadas en unión disulfuro 1-3 y 2-4 en éstas moléculas desempeñan un papel importante en la estructura secundaria, contribuyendo significativamente a

la especificidad y estabilidad de las formas funcionales de estas proteínas, por lo que es posible considerar que los anticuerpos que reconocen estructuralmente a los dominios SCR de la β 2GPI, también pudieran reconocer estructuralmente una región de dominio "Kringle" que comparte similitud estructural con el dominio SCR, lo que explicaría por qué algunos anticuerpos aFL reconocen tanto a la β 2GPI como a la protrombina (24-25).

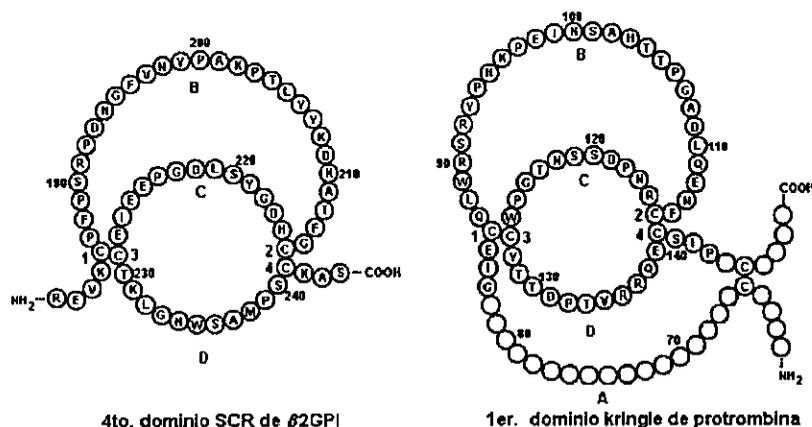


Figura 3. Comparación de dos módulos estructurales. El dominio SCR de la proteína β 2GPI y el dominio Kringle del fragmento I de la protrombina (23).

2.- REACCIONES DE COAGULACIÓN DEPENDIENTES DE FOSFOLIPIDOS

La cascada de la coagulación puede ser esquemáticamente representada como una secuencia de reacciones enzimáticas, las cuales principalmente tienen por objeto la generación de trombina y la formación del coágulo de fibrina (Fig. 4). Como se muestra en dicha figura una superficie de fosfolípidos aniónicos se requiere para el ensamble de complejos enzimáticos dependientes de calcio, los cuales catalizan la generación de FXa y trombina. "In vivo" la superficie de fosfolípidos aniónicos forman los sitios de unión para estos complejos de coagulación que son proporcionados, principalmente, por las membranas de plaquetas activadas (10).

Intrínseca

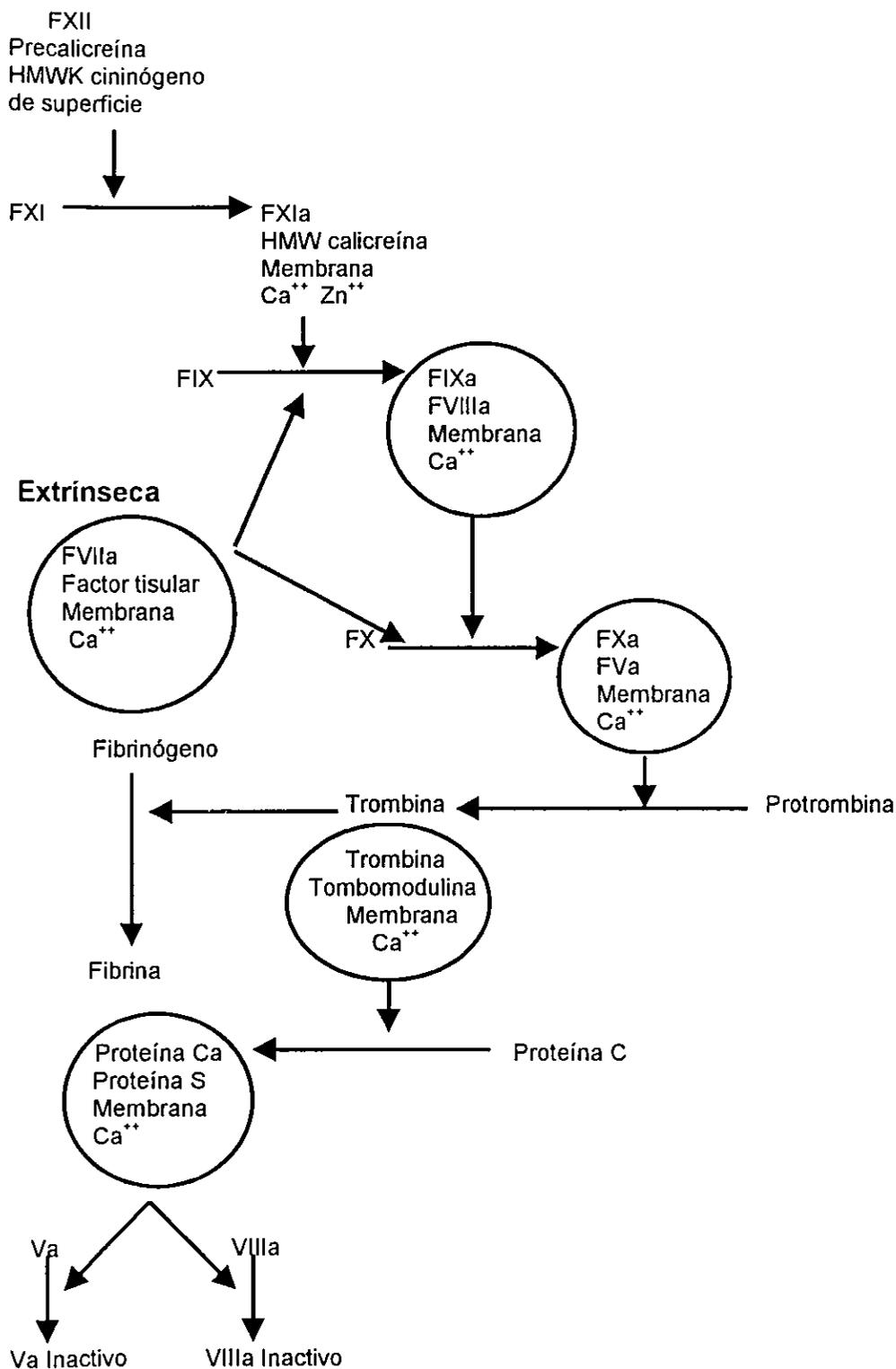


Figura 4. Cascada de la coagulación sanguínea. Representación esquemática de las reacciones de coagulación. Los círculos indican los complejos dependientes de fosfolípidos cuya actividad catalítica está influenciada por anticuerpos antifosfolípido (10).

Los complejos de proteínas de la coagulación dependientes de fosfolípidos son similares, ya que están constituidos por una proteasa serina dependiente de Vit. K, juntamente con una proenzima que se une a una superficie fosfolipídica sobre la cual se lleva a cabo la activación de la enzima requerida, del subsecuente complejo de coagulación (26).

Podemos decir que estas reacciones funcionalmente se pueden agrupar en: fase de contacto, vía procoagulante y vía anticoagulante.

La fase de contacto involucra una serie de reacciones que requieren una superficie de naturaleza no membranosa para producir FXI activado (FXIa). El cininógeno de alto peso molecular es considerado como el mejor cofactor proteico para la fase de contacto y participa en las reacciones de activación del FIX catalizado por el FXIa (27).

Las reacciones representadas en la vía procoagulante de la cascada son catalizadas por la vía extrínseca y vía intrínseca en donde la vía común es el complejo protrombinasa. (En la vía extrínseca, el complejo está formado por una interacción entre el factor tisular, el FVII ó VIIa y la presencia de iones calcio. El factor tisular se expresa sobre superficies celulares como una única cadena proteica de membrana, y no requiere de activación proteolítica para llevar a cabo su función de cofactor del FVII ó VIIa. El FVII es una glicoproteína de cadena sencilla, esta cadena tiene una estructura semejante a las de otros factores en el grupo de la protrombina, los conceptos actuales sobre la conversión del FVII a VIIa sugieren que el FXa es el activador fisiológico principal, aunque la trombina y los factores XIIa y XIa pueden potenciar también de manera significativa la actividad de FVII. No se conoce con certeza si el FVII se debe escindir para volverse activo, pero es probable que tenga alguna actividad proteolítica en la forma de cadena sencilla. El FVIIa y el factor tisular forman un complejo que se une a la superficie fosfolipídica por medio de

iones Ca^{++} . Los datos indican que este complejo enzimático incrementa el efecto catalítico para la activación del FX ó del FIX. La vía intrínseca se forma por la asociación del FIXa con el FVIIIa sobre una superficie de membrana en presencia de iones Ca^{++} . Este complejo enzimático cataliza la activación del FX a Xa y es análogo funcionalmente al de protrombinasa. Esto se debe a que el FVIIIa parece tener similitud funcional con el FVa del complejo protrombina, en cuanto a que están compuestos de subunidades que interaccionan con iones divalentes, además se unen a membranas que contienen fosfolípidos con carga negativa y ambos son inactivados proteolíticamente por la actividad de la proteína C (PC) (26-27).

3.- COMPLEJO PROTROMBINASA

La conversión de protrombina a trombina se regula por la acción enzimática del FXa y el cofactor Va, formando un complejo sobre la superficie de membranas, que en presencia de iones Ca^{++} se conoce como complejo "Protrombinasa" (Fig. 5). El FV circula en la sangre como un cofactor inactivo o como un cofactor con baja actividad intrínseca. Esto es convertido a la forma activada Va por hidrólisis de 3 péptidos de unión por trombina o FXa, formándose el complejo FXa/FVa que se une a vesículas fosfolipídicas en presencia de iones Ca^{++} (28)

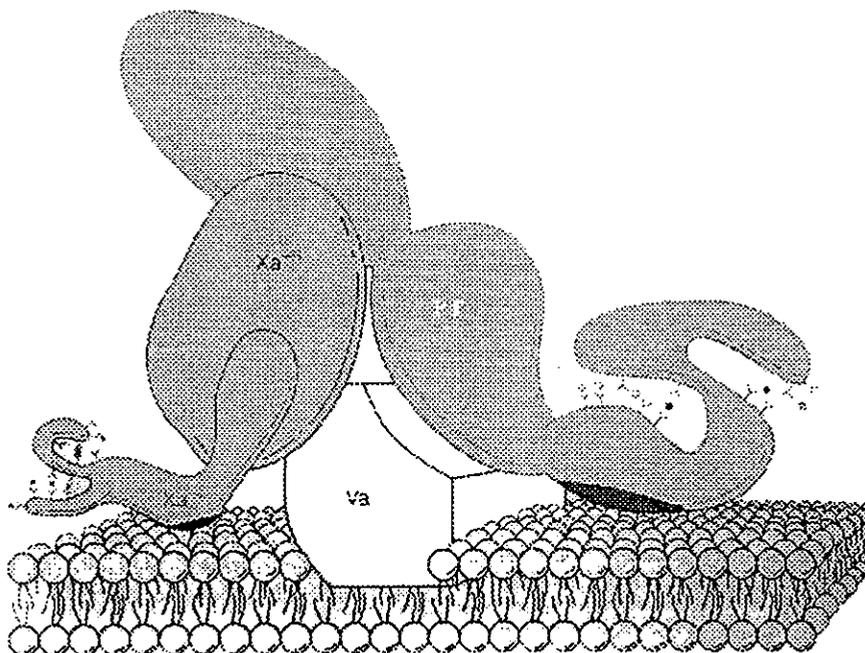


Figura 5. Modelo del Complejo "Protrombinasa". El FXa, FVa y protrombina constituyen el complejo denominado "protrombinasa". La interacción del ión Ca^{++} con el ácido γ -carboxiglutámico de las proteínas Vit. K dependientes facilita la exposición al sitio de unión de las membranas con estas proteínas (28).

Por lo anterior se puede establecer, que la formación del complejo "protrombinasa" involucra 3 etapas:

- 1) La unión del FVa a superficies de membrana.
- 2) La unión del FXa a superficies de membrana.
- 3) La interacción de fosfolípidos.

Tanto el FXa como el FVa se unen a sitios específicos sobre fosfolípidos aniónicos como lo son la superficies plaquetarias. Para facilitar el ensamble del complejo "protrombinasa", y así llevar a cabo la conversión de protrombina a trombina. Aunque múltiples fragmentos pueden ser generados por la acción de la protrombinasa sobre la protrombina, sólo 2 ó 3 posibles péptidos de unión son necesarios para escindir y generar trombina. La generación de la proteasa de serina

trombina α , por la acción del complejo "protrombinasa" cataliza la formación de fibrina insoluble, y es también responsable para la iniciación de la vía anticoagulante de la PC (28-29).

4.- ANTICUERPOS ANTIPROTROMBINA

La protrombina fue identificada por primera vez como cofactor de anticuerpos aFL en 1959 por Loeliger, quien describió un caso donde la actividad de AL era más pronunciada en la mezcla de un plasma del paciente con la de un plasma normal, que en el plasma del propio paciente, encontrándose un nivel bajo de protrombina. Como resultado de estas investigaciones se sugirió que la protrombina era necesaria como "cofactor" para la expresión de la actividad del AL (30).

Se ha sugerido que los anticuerpos aPT impiden la activación de la protrombina por el complejo "protrombinasa" en presencia de fosfolípidos aniónicos, así como también inhiben la conversión del FX, por los factores de coagulación IXa y VIIIa. Este efecto sobre las 2 reacciones de coagulación dependientes de fosfolípidos ofrece una explicación sobre el por qué las pruebas de laboratorio como las del tiempo de kaolin que revela la generación del FXa y la activación de protrombina a trombina sean afectados por la presencia de anticuerpos aPT, contrario a lo que sucede con la prueba del tiempo de veneno de víbora de Rusell (VVR) que evalúa la conversión de protrombina a trombina y que es particularmente anormal en presencia de anti- β 2GPI los cuales inhiben protrombina pero no la activación del factor X (31).

Otros grupos de investigadores han reportado que la presencia en circulación de AL paradójicamente crea una predisposición a trombosis y en raras ocasiones ha sido asociado a hemorragias. Se ha observado que algunos pacientes que presentan anticuerpos aPT adquieren una marcada hipoprotrombinemia (deficiencia del factor II) como una consecuencia de la acelerada formación de complejos

antígeno-anticuerpo (protrombina-antiprotrombina) en circulación, con serias manifestaciones hemorrágicas. A esta asociación se le ha llamado "Síndrome de hipoprotrombinemia-AL". El significado de esta asociación aún no está bien definido (31-32). La identificación de la protrombina como cofactor de AL en reportes de pacientes con hipoprotrombinemia sugiere que la protrombina puede ser el blanco antigénico del AL (33-34).

Las evidencias sobre el papel de β 2GPI y de la protrombina en la reactividad e inducción de anticuerpos AL han sido discutidas ampliamente, así como del requerimiento de fosfolípidos y proteínas que se unen a ellos, por lo que se ha sugerido que los anticuerpos AL reconocen y pueden ser inducidos, por complejos de fosfolípidos y proteínas unidas a fosfolípidos, en particular fosfolípidos y protrombina. Aún no se ha definido claramente cuál es el epítipo que reconocen estos anticuerpos (35-36), algunos investigadores han establecido que estos autoanticuerpos no están dirigidos a fosfolípidos solamente como se pensaba, sino que reconocen un epítipo conformacional expuesto, después de que el ión Ca^{2+} interviene en la unión de la protrombina con los fosfolípidos (37). Sin embargo otras investigaciones realizadas muestran que los complejos protrombina-aPT pueden formarse libremente en solución en ausencia de fosfolípidos, es decir que los anticuerpos aPT pueden estar dirigidos a epítopes de la molécula nativa de protrombina (38).

En base a esto Borowski ha establecido que existen diferentes poblaciones de anticuerpos aPT específicos para unirse a la protrombina, además que son muy heterogéneos inmunológica y funcionalmente. Por lo que es posible sugerir que los ensayos de coagulación revelan la función de estos anticuerpos y los inmunoensayos detectan a los anticuerpos específicos al antígeno. Los trabajos realizados a futuro están encaminados a desarrollar la mejor metodología para la identificación de anticuerpos aPT que intervienen de manera importante en la patogénesis del SAF (39).

IV. JUSTIFICACIÓN

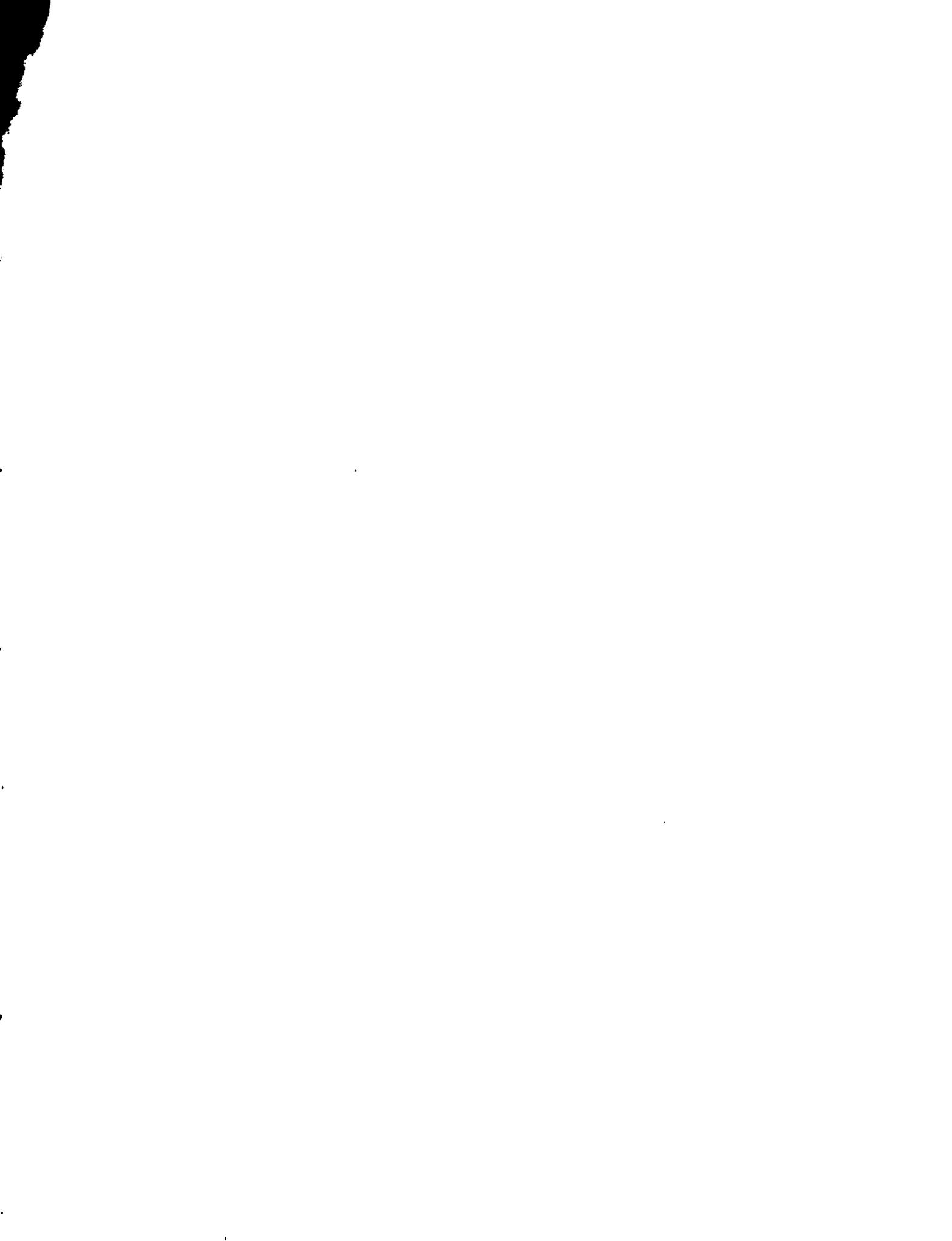
El reconocimiento del SAF en los últimos años ha tenido un impacto clínico importante en casi todas las especialidades médicas, caracterizándose por la presencia de anticuerpos aFL asociados a trombosis, aborto espontáneo recurrente o trombocitopenia. El SAF se presenta frecuentemente en pacientes con LES y recientemente se ha demostrado que los anticuerpos aFL detectados por ELISA, reconocen como blanco antigénico o requieren para hacerse evidentes, de un cofactor plasmático como β -2GPI y la protrombina principalmente (10).

Cabe mencionar que mucho del trabajo experimental realizado sobre el SAF ha sido efectuado en poblaciones adultas, no así en poblaciones pediátricas donde se conoce poco sobre la prevalencia y el significado clínico.

En lo que respecta específicamente a los anticuerpos dirigidos contra la protrombina en la población infantil se conoce mucho menos de lo que se sabe sobre anticuerpos a β -2GPI. Por tal motivo nos propusimos investigar en una población infantil con LES si la protrombina es reconocida como blanco antigénico de estos anticuerpos aFL.

V. HIPÓTESIS

Se propone demostrar que los anticuerpos antifosfolípido reconocen a la protrombina como blanco antigénico en una población pediátrica con lupus eritematoso sistémico.



IMPRESOS GRACE

ENCUADERNACION
LIBROS Y TESIS
PROFESIONALES
CAPTURA E IMPRESION LASER
SRA. GRACIELA CALLEGOS

PORTAL DE SANTO DOMINGO # 10
DESPACHOS 1 Y 2
CENTRO HISTORICO, MEXICO, D.F.

☎ 5521-06-36

VI. OBJETIVOS

1. **General:** Determinar por inmunoensayo en fase sólida (ELISA), anticuerpos anti-protrombina en el suero de pacientes pediátricos con síndrome antifosfolípido secundario a lupus eritematoso sistémico
2. **Particular:** Se identificará el isotipo de anticuerpos anti-protrombina que predomina, por inmunoensayo en fase sólida (ELISA) en dicha población pediátrica.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Pacientes y muestras

Todos los pacientes que fueron estudiados en este trabajo fueron niños con diagnóstico confirmado de LES, de acuerdo a los criterios establecidos por la Asociación Americana de Reumatología (40) según consta en los expedientes resguardados en el archivo clínico del Instituto Nacional de Pediatría (INP). La mayoría fueron del sexo femenino (59 niñas y 3 niños) con edades de 8 a 15 años. Dichos pacientes llevan un control de seguimiento en el tratamiento de su enfermedad acudiendo regularmente a la consulta externa del Servicio de Inmunología y a toma de muestra sanguínea para estudios de laboratorio de LES cada 2 meses (con un promedio de 5 citas por paciente).

Se realizó la toma de una muestra al año, de sangre total por paciente y una vez obtenida se dejó coagular, para luego ser centrifugada a 800 x g durante 5 minutos, con el objeto de obtener el suero, el cual fue fraccionado en alícuotas de 500 μ L y almacenados en un congelador Revco Ultralow a -70°C hasta su uso.

2.- Valor de Corte

La positividad de los sueros a anticuerpos antiprotrombina se estableció obteniendo un valor o punto de corte como indica Loizu y col. (41) aumentando cinco desviaciones estándar al valor promedio de las absorbencias obtenidas de 20 sueros de pacientes normales, es decir, pacientes sin ningún antecedente de enfermedades autoinmunes y procesos infecciosos que acudieron a la toma de muestra de los servicios de Ortopedia y Oftalmología para someterse a una cirugía menor.

3.- *Determinación de anticuerpos antiprotrombina*

El fundamento de la prueba inmunoenzimática que se llevó a cabo fue el de ELISA indirecta, en la cual el componente de fase sólida es un antígeno. El anticuerpo por detectar se une a este componente y entonces se adiciona un segundo anticuerpo unido a una enzima, dirigido contra el anticuerpo por detectar. Se añade el sustrato de la enzima, y se obtiene un producto colorido de la reacción, que puede medirse por espectrofotometría.

La determinación de anticuerpos aPT se realizó en base a la técnica descrita por Arvieux y col. (39), modificada de acuerdo a las condiciones de nuestro laboratorio, la cual consistió en adicionar a cada uno de los pozos de una placa de poliestireno (Maxisorb, Nunc No. de catálogo 156372) 80 μ L de una solución de protrombina humana (ICN Biomedicals Inc. No. de catálogo 101033) a una concentración de 5 μ g/mL diluída en amortiguador de fosfato salino (PBS) a un pH de 7.4, dejándose toda la noche a 4°C. Los pozos de las placas se lavaron 3 veces con amortiguador de PBS con Tween 20 al 0.1% (PBS/Tween) y para evitar la fijación inespecífica de sustancias que pudieran interferir con la reacción, las placas fueron bloqueadas con 200 μ L de albúmina sérica bovina al 1% en PBS/Tween (PBS/Tween/BSA) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó a cada pozo 100 μ L de controles y suero problema diluídos 1:100 en PBS/Tween/BSA para la determinación del isotipo IgG e IgM dejándose incubar durante una hora a temperatura ambiente. Nuevamente los pozos fueron lavados 3 veces con amortiguador PBS/Tween. El anticuerpo que reconoce al antígeno fijado a la placa se reveló por medio de una antigamma globulina humana (Sigma Chemical Co. núm. de cat. A-8400 para anticuerpos polivalente, A-6029 para IgG y A-6907 para IgM) marcada con peroxidasa diluída 1:4000 en PBS/Tween/BSA, dejándose incubar una hora a temperatura ambiente.

Los pozos se lavaron 3 veces con amortiguador PBS/Tween. La lectura del producto de la reacción (color) efectuada entre la enzima y su sustrato

(ortofenilendiamina —OPD— Sigma Chem. Co. Núm. de cat. B-156) para polivalente y (3,3',5,5' tetrametil bencidina Sigma T-8540) para el isotipo IgG e IgM se llevó a cabo en un lector para ELISA Multiskan a 492 nm y a 450 nm para isotipo IgG e IgM polivalente después de haber adicionado 50 μ L de ácido sulfúrico.

Para cada uno de los isotipos se elaboró una curva de calibración (anexo 1,2) utilizando un patrón de referencia como "De Bari Standard" (Inova Diagnostic, Inc. Núm. de cat. BR 0203). Para fines de este trabajo fueron considerados con valor clínico los resultados reportados en unidades GPL ó MPL y positivos mayor de 20 unidades GPL ó MPL.

4.- *Análisis estadístico*

Se realizó el análisis de los dos grupos (positivos para anticuerpos antiprotrombina y negativos para anticuerpos antiprotrombina) utilizando una prueba de t de Student para ver si existía diferencia significativa entre las 2 poblaciones.

VIII. RESULTADOS

Primeramente se obtuvo el valor de corte como se muestra en la (Fig. 6) en base a la determinación de anticuerpos antiprotrombina polivalente de 20 sueros de pacientes pediátricos normales (tabla 2), obteniéndose los siguientes resultados en unidades de absorbencia: una lectura promedio en A_{492} de 0.212 con una desviación estándar de 0.084, considerándose como objeto de estudio aquellos pacientes que presentaban un valor de la media \pm 5 D.E. $A_{492} = 0.632$.

Posteriormente se determinaron anticuerpos antiprotrombina a los 62 pacientes con diagnóstico de LES, de los cuales 59 fueron del sexo femenino y 3 del sexo masculino, con un intervalo de edades de 8 a 15 años (promedio 11.5 años). Dicha población fue dividida en 2 grupos en base al valor de corte obtenido: aquellos que fueron positivos para anticuerpos antiprotrombina 18/62 (tabla 3) y negativos para anticuerpos antiprotombina 44/62 (tabla 4). Encontrando una prevalencia del 29% para anticuerpos antiprotrombina en nuestra población de niños con LES.

Tabla 2. Determinación de anticuerpos antiprotrombina polivalente en una población de 20 sueros normales de pacientes pediátricos.

Paciente Número	Absorbencia 492 nm.
1	0.411
2	0.407
3	0.333
4	0.303
5	0.221
6	0.220
7	0.204
8	0.197
9	0.196
10	0.195
11	0.193
12	0.181
13	0.180
14	0.175
15	0.175
16	0.154
17	0.153
18	0.130
19	0.110
20	0.109

Lectura promedio $A_{492} = 0.212$
 I.D.E. = 0.084
 5D.D. = 0.420

Valor de corte = Lecturas promedio ± 5 D.E.
 $0.212 + 0.420$

Valor de corte = $A_{492} = 0.632$

Gráfica de anticuerpos antiprotrombina en población pediátrica

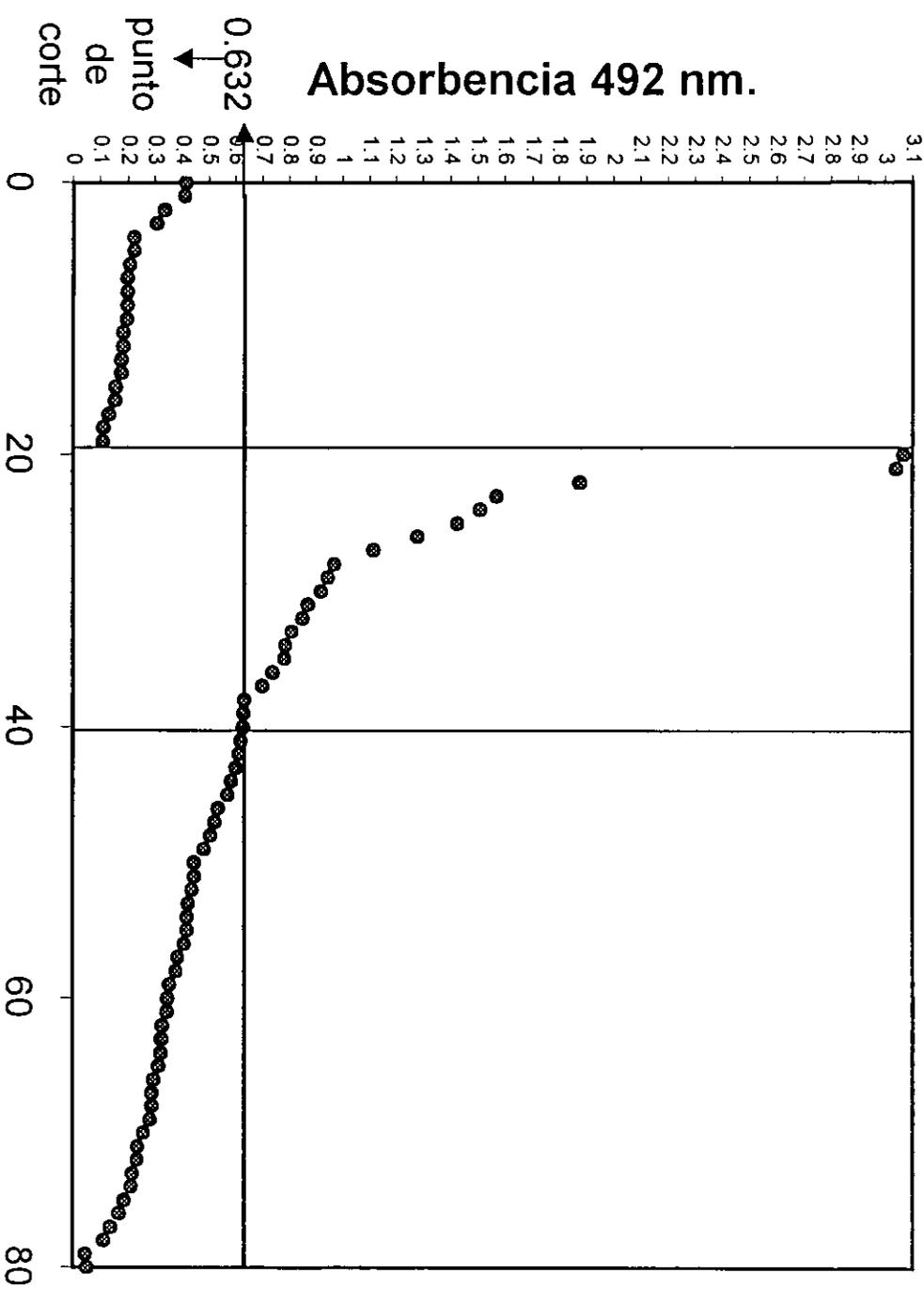


Figura 6

Tabla 3. Pacientes positivos para anticuerpos antiprotrombina

Paciente Número	Absorbencia 492 nm.
1	3.065
2	3.038
3	1.874
4	1.568
5	1.506
6	1.423
7	1.280
8	1.113
9	0.968
10	0.942
11	0.917
12	0.869
13	0.849
14	0.809
15	0.785
16	0.781
17	0.735
18	0.698

Tabla 4. Pacientes negativos para anticuerpos antiprotrombina.

Paciente	Absorbencia 492 nm.
1	0.630
2	0.628
3	0.625
4	0.617
5	0.610
6	0.599
7	0.582
8	0.568
9	0.533
10	0.521
11	0.504
12	0.481
13	0.446
14	0.446
15	0.437
16	0.434
17	0.418
18	0.418
19	0.407
20	0.383
21	0.377
22	0.352

Paciente	Absorbencia 492 nm
23	0.345
34	0.344
25	0.326
26	0.324
27	0.322
28	0.312
29	0.296
30	0.289
31	0.289
32	0.282
33	0.258
34	0.236
35	0.233
36	0.217
37	0.212
38	0.185
39	0.167
40	0.137
41	0.137
42	0.113
43	0.043
44	0.051

Como análisis estadístico se llevó a cabo la prueba t de student para ver si existía diferencia significativa entre la población positiva y negativa para anticuerpos antiprotrombina, obteniéndose una t (calculada) de 8.4, con una t (tablas) de 2.055 y una $p < 0.001$, por lo que no hubo diferencia entre las dos poblaciones.

La determinación del isotipo de anticuerpos antiprotrombina se realizó con la población positiva de 18 pacientes, y se encontró que para el isotipo IgG el número total de pacientes fueron 5/18 que corresponde al 27.8%, sin embargo para el isotipo IgM el número fue de 13/18 que corresponde al 72.2% (Fig.- 7). (Anexo 3)

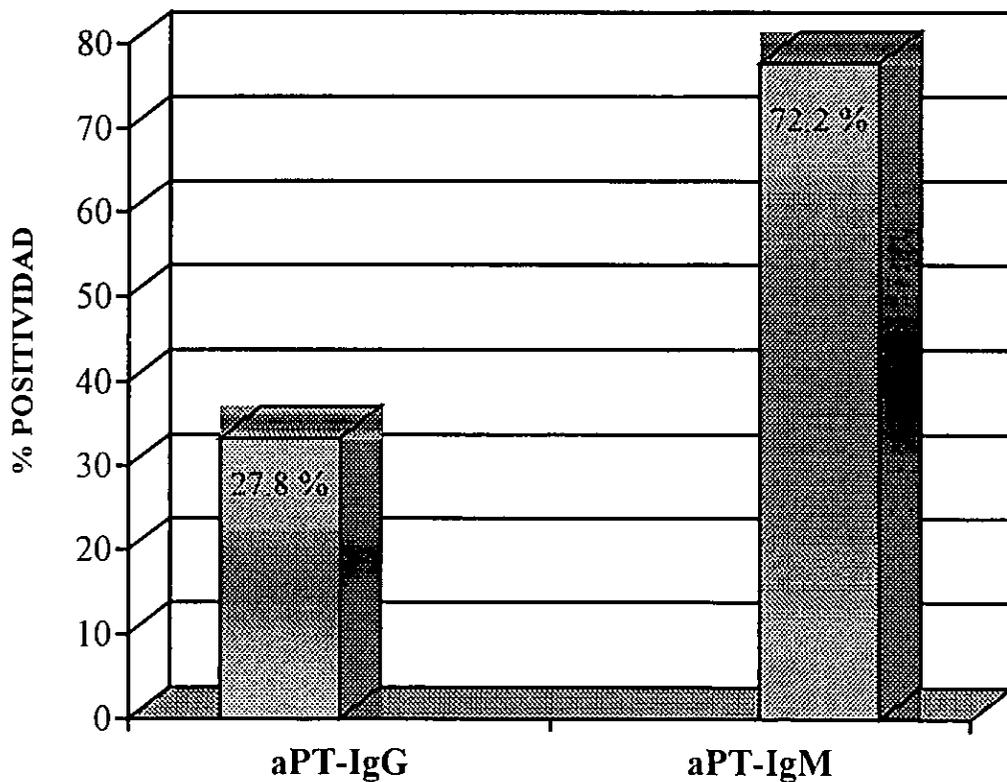


Fig. 7. Prevalencia del isotipo de anticuerpos antiprotrombina.

IX. DISCUSIÓN

Siendo la protrombina una proteína importante en la cascada de la coagulación sanguínea por formar parte en presencia de fosfolípidos aniónicos de un complejo enzimático que lleva a cabo la conversión de protrombina a trombina (enzima que cataliza la conversión de fibrinógeno a fibrina) es considerada dentro de las proteínas mejor caracterizadas como blanco antigénico de los anticuerpos aFL, es decir, estos anticuerpos impiden la activación de la protrombina por el complejo "protrombinasa" causando en pacientes con LES desórdenes en la coagulación sanguínea.

La determinación de anticuerpos aPT por ELISA tiene una relevancia clínica importante, su presencia se ha correlacionado con historias de trombosis venosa, embolismo pulmonar (43) y en raras ocasiones se han asociado a casos de hemorragias en donde se presenta un decremento en los niveles de protrombina (hipoprotrombinemia) por la acelerada formación de complejos antígeno-anticuerpo (31).

Otro aspecto clínico importante es que se ha reportado que altos niveles de anticuerpos aPT pueden ser riesgo de infarto al miocardio por su probable interferencia con el sistema fibrinolítico (30), sin embargo esto está sometido aún a investigación.

Es importante mencionar que existen escasos estudios reportados dentro de la población infantil sobre anticuerpos antiprotrombina, por tal motivo el objetivo principal de nuestro estudio fue determinar anticuerpos aPT en suero de pacientes pediátricos con LES, así como determinar el isotipo de anticuerpo.

Los reportes que se tienen sobre la prevalencia de anticuerpos aPT es muy variable, como es el caso de Vianna y col. (46) quien encontró una prevalencia de anticuerpos aPT del 14% en una serie de 95 pacientes pediátricos con Les, sin

embargo la prevalencia que nosotros encontramos fue 18/62 (29%) similar a lo encontrado por Love y Santoro en 1990 (44) que fue del 33.3%, otros estudios realizados por Arvieux y Galli han reportado hasta un 58% (45). Esta variación de resultados obtenidos por diferentes grupos ha sido atribuida a ciertos factores como es la selección de los pacientes a estudiar, variables dentro del método de ELISA como son los amortiguadores que se utilizan para diluir la muestra, soluciones bloqueadoras en los pozos de las placas para evitar la fijación inespecífica de sustancias que pudieran interferir con la reacción, etc. Otro factor importante es el punto o valor de corte obtenido en cada caso, por lo que es necesario seguir realizando investigaciones a este respecto para unificar criterios y poder ofrecer un mejor estudio sobre estos anticuerpos.

Un hallazgo interesante en lo que respecta a la presencia de los diferentes isotipos de anticuerpos en la población estudiada (pacientes positivos para anticuerpos aPT) es la existencia de una mayor prevalencia del isotipo IgM (72.2%) comparado con el isotipo IgG (27.8%). El hecho de que hayamos obtenido una respuesta de tipo IgM la podemos atribuir a una respuesta inmune primaria, contrario a lo que se ha publicado en relación a la población adulta donde los anticuerpos aPT del isotipo IgG es el predominante.

En conclusión, aún y cuando no se conocen los mecanismos de acción involucrados en las manifestaciones clínicas de estos anticuerpos, nosotros sugerimos que la determinación de anticuerpos aPT sea incluida como parámetro de laboratorio dentro del perfil de pruebas diagnósticas de LES y así contribuir a un mejor seguimiento y control de la enfermedad.

X. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se demostró que la protrombina es reconocida como blanco antigénico de los anticuerpos aFL en una población pediátrica con lupus eritematoso sistémico.
2. El anticuerpo que se manifestó con mayor prevalencia fue del isotipo IgM a diferencia de los estudios realizados en la población adulta, donde predomina el isotipo IgG.
3. Se estandarizó un método para la determinación de anticuerpos aPT.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Conley CL, Hartmann RC.** A hemorrhagic disorder caused by circulating caused by circulating anticoagulant in patients with disseminates lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1952; 31: 621.
2. **Feinstein DI, Rapaport SI.** Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Haemost Tromb.* 1972; 1: 75.
3. **Lechner K.** Acquired inhibitors in non-hemophiliac patients. *Haemostasis.* 1974; 3: 65.
4. **Lechner P, Abenger-Fasching FI.** Lupus anticoagulant and Thrombosis. A study of 25 cases and review of the literature. *Haemostasis.* 1985; 15: 24.
5. **Lubbe WF, Leggins GC.** Lupus anticoagulant and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1985; 153: 322.
6. **Lubbe WF, Butler WS, Palmer SJ, Leggins GC.** Lupus anticoagulant in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol.* 1984; 91: 357.
7. **Bevers EM, Galli M, Confurius P, Zwaal RFA.** Lupus anticoagulant IgG (LA) are not directed to phospholipid only. *Thromb Haemost.* 1991; 147: 149.
8. **Clostring JD, Derksen RHWM, Entjes HTI, Bouma BW, de Groot PG.** Lupus anticoagulant activity dependent on the presence of beta-2 glycoprotein I. *Thromb Haemost.* 1992; 67: 499-502.
9. **Lechner, R, Echner S, Jager U, Pabinger I, Kysle PA.** Lupus anticoagulant and clinical correlates. *Florenca Scientific.* 1992; 47: 60.

10. **Galli M y Bever ME.** Inhibition of phospholipid dependent coagulation reactions by antiphospholipid antibodies: Possibles modes of action. *Lupus*. 1994; 3: 225-228.
11. **Pelkonen P, Simell O, Rasi V, Varala O.** Venous thrombosis associated with lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies. *Acta Pediatr Scand* 1998; 77: 767-772.
12. **Bick RL, Baker WF.** The antiphospholipid and thrombosis syndromes. *Med Clin of N Am*. 1994; 78: 667-681.
13. **Asherson RA.** The catatrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1992; 19: 508.
14. **Lockhin MD.** Antiphospholipid antibody syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 1993; 20: 45.
15. **Alarcón-Seegovia D, Delzé M, Orea CV y col.** Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine*. 1998; 68: 353-365.
16. **Hunt JE, Adelstein S, Krilis SA.** New basic aspects of the antiphospholipid syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1994; 12: 661-668.
17. **Roger EJ, Vogt JM y Hasegava DK.** Abnormal prothrombin crossed immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood*. 1984; 64(4): 807-816.
18. **Mc Neil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA.** Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding

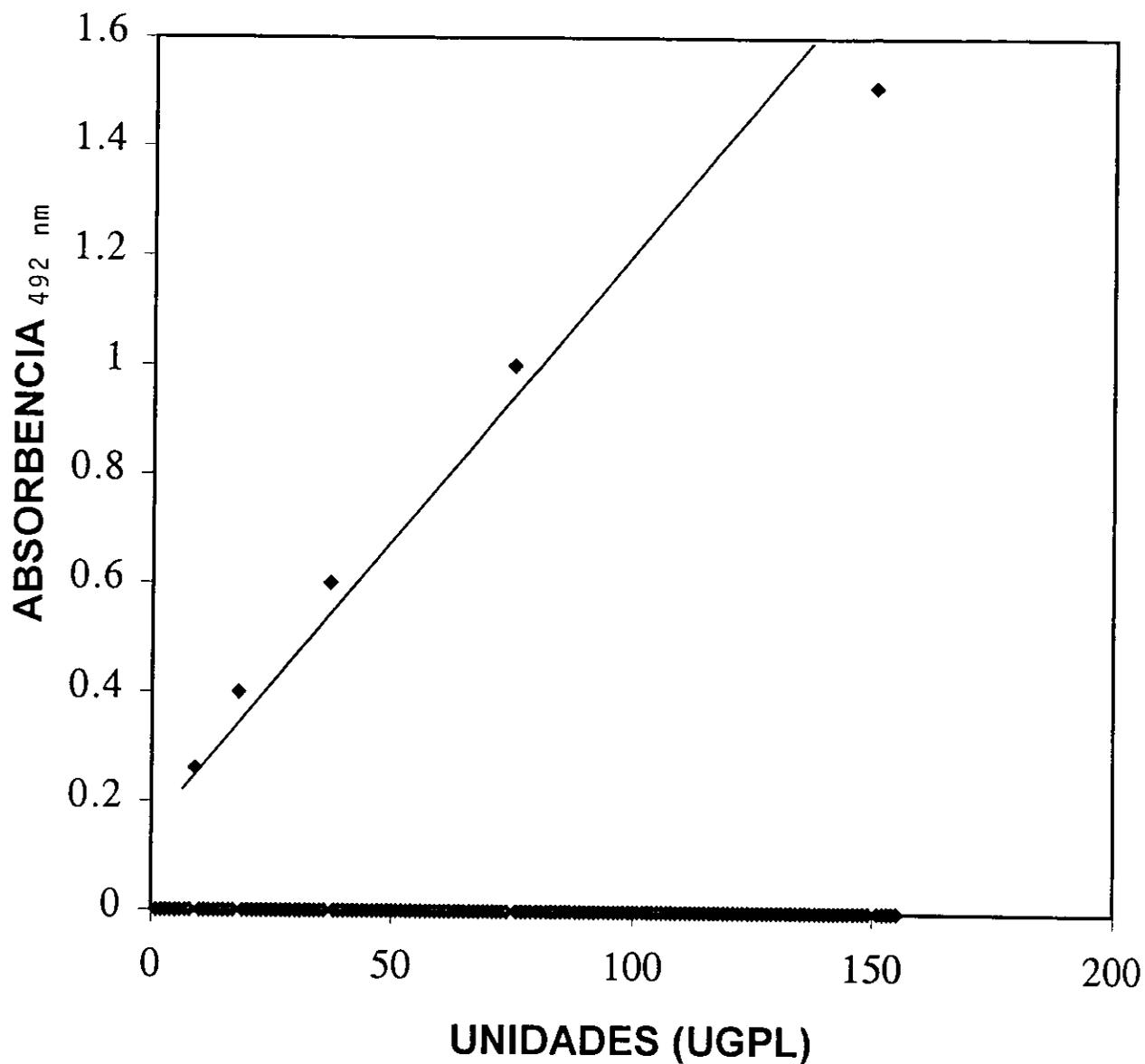
- inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 4120-4124.
19. **Bevers EM, Galli M.** β 2-glycoprotein I for binding of anticardiolipin antibodies to cardiolipin. *Lancet*. 1990; II: 952-953.
 20. **Stubbs MT y Bode W.** A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb Res*. 1993; 69: 1-58.
 21. **Chang HP y Tulinsky A.** Three-dimensional structure of the kringle sequence: Structure of prothrombin fragment I. *Biochemistry*. 1986; 25 (14): 75-80.
 22. **Stubbs MT y Bode W.** Structure and specificity in coagulation and its inhibition. *Trends Cardiovasc Med*. 1995; 5: 157-166.
 23. **Janatova J, Reid KBM y Willies AC.** Disulfide bonds are localized within the short concensus repeat units of complement regulatory proteins. *Biochemistry*. 1989; 28: 4754-4757.
 24. **Roubey RAS.** Autoantibodies to phospholipid binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulant and other antiphospholipid autoantibodies. *Blood*. 1994; 84: 2854-2857.
 25. **Shapiro SS.** The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Ann Rev Med*. 1995; 47: 533-553.
 26. **Earl WD.** Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb and Haemost*. 1995; 74(I): 1-6.
 27. **Mc Kenzie SB.** *Hematología Clínica*. 1991, Edit. Manual Moderno. Pág. 384-399.

28. **Hoffman, Benz, Shattil, Furie y col.** Hematology basic principles and practice. Second Edition 1995; Edit. Churchill Livingstone. Pág. 1566-1580.
29. **Furie B y Furie BC.** Molecular and cellular biology of blood coagulation. New England J Med. 1992; 332: 800-806.
30. **Loeliger A.** Prothrombin as cofactor in the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Thromb Diath Haemorrh. 1959; 3: 237.
31. **De Groot PG, Horbach DA, Simmelink MJA, Oost E y Derksen RHWM.** Antiprothrombin antibodies and their relation with thrombosis and lupus anticoagulant. Lupus. 1998; 7(52): 532-536.
32. **Rauch J.** Lupus anticoagulant antibodies: Recognition of phospholipid binding protein complexes. Lupus. 1998; 7(52): 529-531.
33. **Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I.** Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: An update. Thromb Haemost. 1995; 74: 1185-1190.
34. **Woodruff E.** Antiphospholipid antibodies: New complexities and new assays. Arthritis and Rheumatism 1996; 39(9): 1441-1443.
35. **Kanadiya DA y Krilis SA.** Anti β 2-glycoprotein I y anti-prothrombin antibodies in patients with the syndrome: Immunological specificity and clotting profiles. Lupus 1998; 7: 323-332.
36. **Permpikul P, Rao LVM Rapaport SI.** Functional and binding studies of the prothrombin and β 2-glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. Blood. 1994; 83: 2878-2892.

37. **Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RFA y Bevers EM.** Anticoagulant activity of β 2-BPI is potentiated by distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost.* 1992; 68: 297.
38. **Harris N.** Anotation. Antiphospholipid antibodies. *British Journal of Haematology.* 1990; 74: 1-9.
39. **Arvieux J, Daringe L, Caron C y col.** Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemostasis.* 1995; 74: 1120-1125.
40. **Tan Em, Cohen AS, Fries JF y col.** The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus ERYTHEMATOSUS. *Arthr Rheum.* 1982; 25: 1271-1277.
41. **S Loizou, JD Mc Crea, AC Rudger, R Reynolds y col.** Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standarization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol.* 1985; 62: 738-745.
42. **Olive D, André E, Brocard O, Labrude P, Alexandre P.** Lupus erythemateux disséminé révélé par des trombophlébites des membres inferieurs. *Arch Fr Pediatr.* 1979; 36: 807-811.
43. **Horbach D, Oort E, Donders R, de Groot P.** Lupus anticoagulant in the strongest risk factor both venus and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost.* 1996; 76: 916-924.
44. **Love BPE, Santoro.** Antiphospholipid antibodies. Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non SLE disorders. *Annals of Medicine* 1990; 112: 682-698.

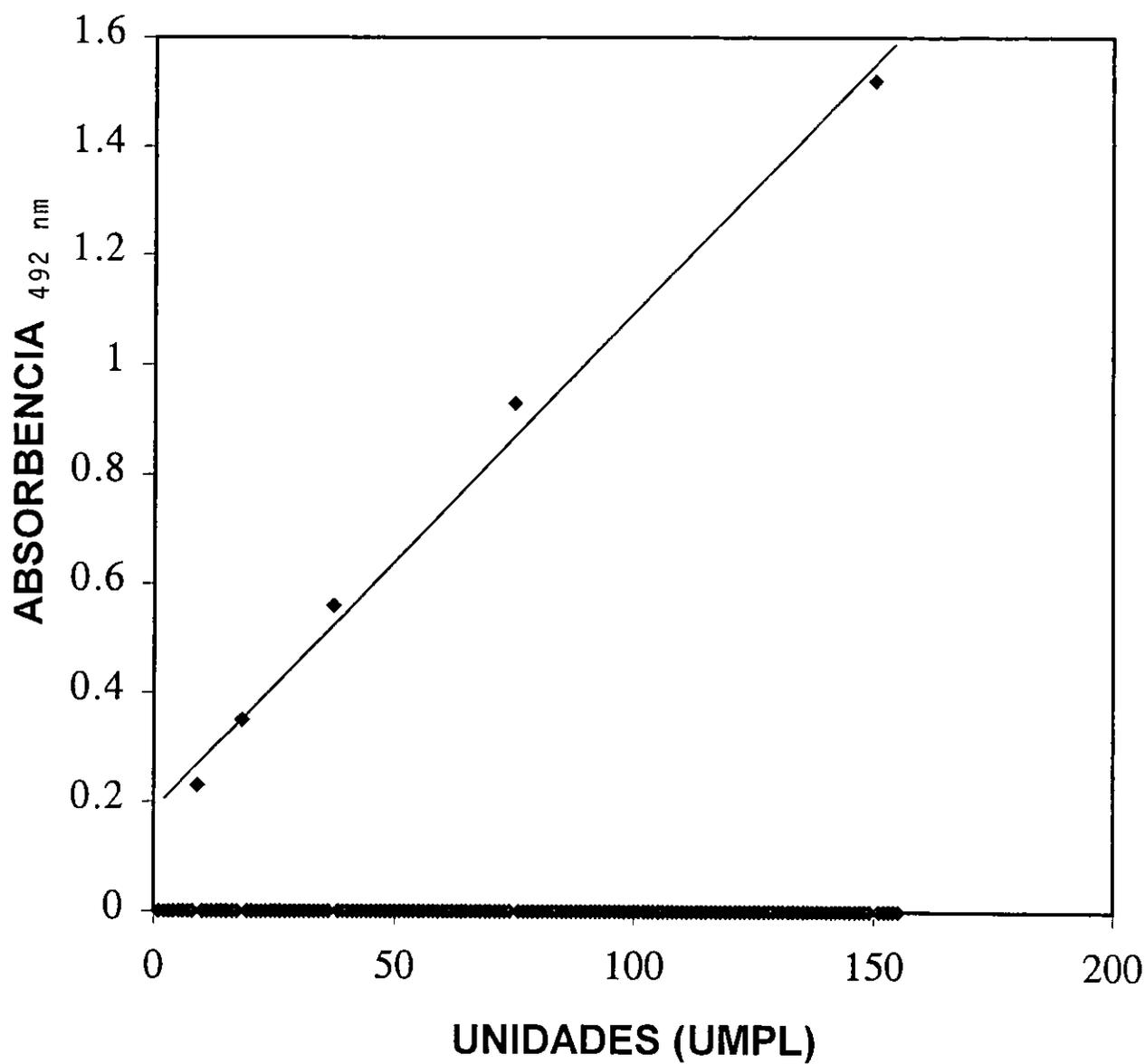
45. **Galli M.** Non β 2-glycoprotein I cofactors for antiphospholipid antibodies. *Lupus* 1996; 5: 388-392.
46. **Charles Molta, Olivier Meyer, Christine Dosquet y col.** Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus: Antiphospholipid Antibodies in 37 patients and their first-degree relatives. *Pediatrics* 1993; 92(6): 849-853.
47. **Abul K. Abbas, Andrew H. Litchman.** *Celular and Molecular Immunology*. 1994, W.B. Saunders Compoany, 2nd edition pág. 45-46.

CURVA DE CALIBRACION DE FOSFOLIPIDOS (UGPL)



Absorbancia	UGPL
0.269	9.4
0.403	18.8
0.608	37.5
1.003	75
1.517	150

CURVA DE CALIBRACION DE FOSFOLIPIDOS (UMPL)



Absorbancia	UMPL
0.231	9.4
0.353	18.8
0.569	37.5
0.932	75
1.516	150

IgG.- Representa aproximadamente el 75% de las inmunoglobulinas séricas totales del adulto normal y es el anticuerpo más abundante que se produce durante la respuesta inmunitaria humoral secundaria. En la sangre es la única clase de inmunoglobulina que puede cruzar la placenta en el ser humano, y se encarga de la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida. La IgG fija y activa complemento del suero. Los macrófagos y algunos otros tipos celulares expresan receptores de superficie que fijan las regiones Fc de las moléculas de IgG.

IgM.- Constituye aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas normales del suero y en condiciones normales es secretada como un pentámero con cadena J. El anticuerpo IgM predomina en las respuestas inmunitarias primarias tempranas a la mayoría de los antígenos, aunque tiende hacerse menos abundante subsecuentemente. Es la inmunoglobulina más común que se expresa en la superficie de las células B, en particular los linfocitos B vírgenes y es también la inmunoglobulina fijadora de complemento más eficaz. Existen receptores Fc específicos para IgM, pero no se han caracterizado de manera apropiada.(47)

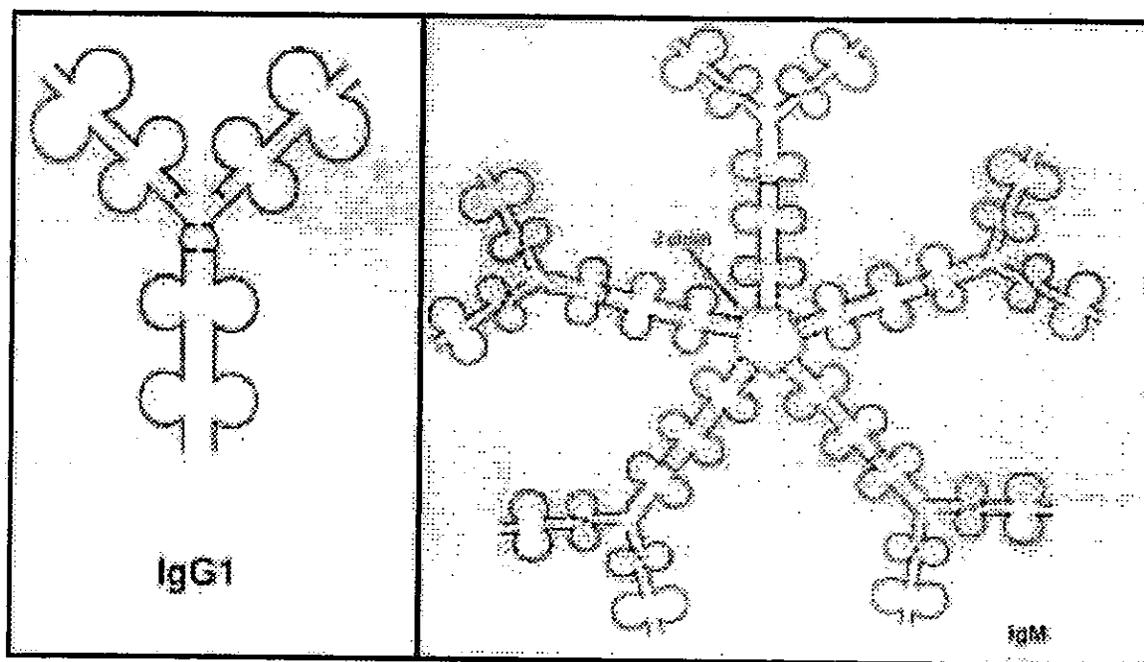


Fig. 8 diagrama esquemático del isotipo IgG e IgM que circulan como monómero y pentámero respectivamente