



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Caracterización inmunoquímica de anticuerpos anti- $\beta_2$ GP-I en formato scFv de una paciente con síndrome de SaFP y estudio de su capacidad patogénica en un modelo murino**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

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

**Q.F.B. DIEGO FRANCISCO HERNÁNDEZ RAMIREZ**

**DIRECTOR DE LA TESIS: DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS**

MÉXICO, D.F. 2007



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.

Autotrozo a la Direccion General de Bibliotecas de la  
UNAM a fin de ser enmendado el formato de trabajo  
contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Alfonso Ramirez Ortega  
FECHA: 05-XII-2007  
FIRMA: [Signature]

**Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de septiembre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **HERNANDEZ RAMIREZ DIEGO FRANCISCO** con número de cuenta **94028643** con la tesis titulada: **"Caracterización inmunológica de anticuerpos anti-Beta2GP-I en formato scFV de una paciente con síndrome de SaFP y estudio de su capacidad patogénica en un modelo murino"**, realizada bajo la dirección del **DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS**:

Presidente: DR. BALTAZAR BECERRIL LUJAN  
Vocal: DR. KAREN MANUCHARIAN AIRAPETIAN  
Secretario: DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS  
Suplente: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA  
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 22 de Noviembre de 2007.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Gracias al posgrado de Ciencias Biológicas, por permitirme desarrollar como profesional y darme la oportunidad de estudiar en una gran institución como es la UNAM

Gracias al CONACYT, por el apoyo económico que me permitió continuar con mis estudios

Gracias a mi comité tutorial

Al Dr. Javier Cabiedes, por todas sus enseñanzas y el apoyo incondicional mostrado a lo largo de mis estudios, además de ser un gran amigo.

Al Dr. Karen Manoutcharian, por todo el apoyo brindado, y a sus comentarios adecuados, que me permitieron llevar a buen termino la tesis

A la Dra. Clara Inés Espitia, por sus consejos y el apoyo brindado a lo largo de mis estudios

*"Que podamos dejarte a la nueva generación  
Un mundo mejor que el que nos legaron"*

*Carl Sagan"*

*Gracias*

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

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

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

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

A Carlos, Araceli y Teresa, por ser los mejores compañeros que uno puede tener, y también por ser grandes amigos.

<b>Indice</b>	<b>Pagina</b>
1. Generalidades	15
1.1. Historia	15
1.2. Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SaF)	16
1.3. Anticuerpos antifosfolípidos	17
1.4. Anticoagulante lúpico (AL)	18
1.5. $\beta_2$ GP-I y anticuerpos anti- $\beta_2$ GP-I	19
1.6. Anticuerpos anticardiolipina	23
1.7. Otros anticuerpos antifosfolípidos	24
1.8. Mecanismos patológicos de los anticuerpos antifosfolípidos (aFL)	25
1.9. Mecanismos patológicos de la $\beta_2$ GP-I	27
1.10. Mecanismos patológicos del AL	29
1.11. Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos "catastrófico"	30
1.12. Estudio y análisis de los anticuerpos antifosfolípidos	31
2. Hipótesis	34
3. Justificación	34
4. Objetivos	35
5. Metodología	36
5.1. Obtención y caracterización molecular e inmunoquímica de las clonas	36
5.1.1. Expresión del Pili F+ en <i>E. coli</i>	36
5.1.2. Obtención de las clonas	36

5.1.3. Amplificación de las clonas	37
5.1.4. Caracterización molecular de las clonas	38
5.1.5. Titulación de los fago anticuerpos	40
5.1.6. Ensayos de reactividad de los fago anticuerpos contra diferentes antígenos	41
5.1.7. Curva dosis-respuesta, inhibición de $\beta_2$ GP-I y absorción de fosfolípidos (FL)	42
5.2. Modelo murino	44
5.2.1. Estandarización de la concentración de fago anticuerpos	44
5.2.2. Caracterización de la reactividad de los anticuerpos de los sueros de las ratonas inoculadas	44
5.2.3. Modelo murino del síndrome	45
5.2.4. Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y estimación plaquetaria	46
5.2.5. Determinación de la reactividad de los sueros contra los diferentes antígenos	46
5.2.6. Determinación de citocinas	47
6. Resultados	49
6.1. Caracterización inmunoquímica	49
6.1.1. Reactividad de las clonas	49
6.1.2. Ensayos de reactividad contra diferentes FL	50
6.1.3. Curvas dosis-respuesta	51
6.1.4. Ensayos de absorción en placa sensibilizada con el complejo cardiolipina (CL)- $\beta_2$ GP-I	53
6.1.5. Ensayos de absorción en placa sensibilizada con CL	54
6.1.6. Ensayos de absorción en placa sensibilizada con $\beta_2$ GP-I	56



6.1.7. Ensayos de inhibición con $\beta_2$ GP-I	57
6.2. Modelo murino	58
6.2.1. Ajuste del inóculo de fago anticuerpo	58
6.2.2. Inducción del SaF en el modelo murino	60
6.2.2.1. Reactividad de los sueros contra la $\beta_2$ GP-I	60
6.2.2.2. Reactividad de los sueros contra CL- $\beta_2$ GP-I	61
6.2.2.3. Reactividad de los sueros contra CL	62
6.2.2.4. Tiempo de tromboplastina parcial activada	63
6.2.2.5. Estimación plaquetaria	64
6.2.2.6. Resorción fetal	65
6.2.2.7. Citocinas	66
6.3. Estudio molecular	68
7. Discusión	74
8. Conclusiones	80
9. Anexo	81
10. Bibliografía	83

**Indice de tablas****Pagina**

1. Posibles mecanismos de trombosis mediada por autoanticuerpos en SaF	26
2. Toma y tamaño de la muestra de los diferentes grupo	46
3. Ensayo del método para <i>lincoptex</i> de citocinas de ratón	48
4. Reactividad de las clonas C3 y C8 contra $\beta_2$ GP-I, el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la CL	49
5. Reactividad de las clonas contra diferentes FL	50
6. Curva dosis-respuesta para las clonas C3 y C8 contra los diferentes antígenos	51
7. Adsorción de las clonas C3 y C8 con liposomas de CL y liposomas de CL- $\beta_2$ GP-I	53
8. Porcentaje de absorción de la clona C3 y C8 contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la CL en placa sensibilizada con CL	55
9. Absorción de las clonas C3 y C8 contra CL y el complejo CL- $\beta_2$ GP-I en placas sensibilizadas con $\beta_2$ GP-I	56
10. Porcentaje de inhibición para ambas clonas con la $\beta_2$ GP-I contra CL, el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la $\beta_2$ GP-I	58
11. Promedio de la reactividad de los sueros de ratonas inmunizados con diferentes concentraciones de fago-anticuerpo	59
12. Promedio de la reactividad de los sueros contra la $\beta_2$ GP-I en dos diferentes días de toma de muestra	60
13. Promedio de la reactividad de ls sueros contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, en los diferentes días de la toma de muestra	61
14. Promedio de la reactividad de los sueros de los ratonas inoculadas con las diferentes clonas	62
15. Tiempo de tromboplastina parcial activada	64
16. Estimación plaquetaria	65
17. Cuantificación de citocinas	67

18. Características mutacionales del primer fragmento de ambas clonas	70
19. Comparación mutacional de la clona C3 y C8 con el gen de línea germinal 1b.366F5/DPL5...+ y JL3b	73
20. Análisis estadísticomultinomial de las clonas con el gen de línea germinal 1b.366F5/DPL5...+	73

<b>Indice de figuras</b>	<b>Pagina</b>
1. Estructura tridimensional de la $\beta_2$ Glicoproteína-I	20
2. Cambio conformacional por interacción a la membrana y reconocimiento por los aFL por la exposición del epítoto críptico	22
3. Hipótesis de la interacción de los aFL con $\beta_2$ GP-I en el endotelio vascular	24
4. Cascada de la coagulación y mecanismo fibrinolítico. Participación de la $\beta_2$ GP-I	28
5. Mecanismo de acción del AL	31
6. Cuantificación de las UFC/mL mediante la técnica establecida por Koch	40
7. Reactividad de las clonas C3 y C8 contra los tres antígenos	50
8. Reactividad de las clonas C3 y C8 contra diferentes fosfolípidos	51
9. Curvas dosis respuesta	52
10. Curvas de adsorción de la clona C3 y C8 con liposomas de CL y liposomas del complejo CL- $\beta_2$ GP-I en placassensibilizadascon el complejo CL- $\beta_2$ GP-I	54
11. Curvas de absorción de la clona C3 y C8 contra CL y el comepejo CL- $\beta_2$ GP-I en placas sensibilizadas con CL	55
12. Curva de absorción de las clonas C3 y C8 contra CL y el complejo CL- $\beta_2$ GP-I en placas sensibilizadas con $\beta_2$ GP-I	57
13. Curva de inhibición de las clonas C3 y C8 con $\beta_2$ GP-I en placas sensibilizads con CL, el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la $\beta_2$ GP-I	58
14. Reactividad de los sueros de las ratonas inmunizados a diferentes concentraciones de las clonas C3 y C8	59
15. Reactividad de los sueros contra $\beta_2$ GP-I en los diferentes días de la toma de muestra	61
16. Reactividad de los sueros de los diferentes grupos de ratonas en placas sensibilizadas con el complejo $\beta_2$ GP-I	62

17. Reactividad de los sueros contra CL a diferentes días de la toma de muestras	63
18. Tiempo de tromboplastina parcial activada a los diferentes días de la toma de muestra	64
19. Estimación plaquetaria	65
20. Úteros de ratonas inmunizadas con las diferentes clonas al día 21	66
21. Patrón electroforetico de las clonas C3 y C8	68
22. Comparación de secuencias de las clonas C3 y C8	69
23. Comparación del primer fragmento con el gen de línea germinal	70
24. Comparación de las secuencias del segundo fragmento con el gen de línea germinal	72

## Abreviaturas

$\beta_2$ GP-I =  $\beta_2$ glicoproteína-I

a $\beta_2$ GP-I = anticuerpos anti- $\beta_2$ GP-I

Ac's = Anticuerpos

aCL = anticuerpos anti-cardiolipina

aFL = anticuerpos anti-fosfolípidos

AL = Anticoagulante lúpico

APt = Activador del plasminógeno tisular

ASB-PBS = Albúmina sérica bovina en PBS

CL = Cardiolipina

CL- $\beta_2$ GP-I = Cardiolipina- $\beta_2$ glicoproteína-I

CMV = Citomegalovirus

DO = Densidad Óptica

EM = Esfingomielina

FL = Fosfolípidos

FTC = Fosfatidilcolina

FTE = Fosfatidiletanolamina

FTG = Fosfatidilglicerol

FTI = Fosfatidilinositol

FTS = Fosfatidilserina

GM-CSF = Factor estimulante de colonias de granulocitos y monócitos

HMWK = Cininógenos de alto peso molecular

IgA = Inmunoglobulina A

IgG = Inmunoglobulina G

IgM = Inmunoglobulina M

IL-1 $\beta$  = Interleucina 1 beta

IL-2 = Interleucina 2

IL-6 = Interleucina 6

LEG = Lupus eritematosos generalizado

MCP-1 = Proteína quimiotáctica de monocitos 1

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos  
PCaPS = Proteína C activada por proteína S  
PEG = Polietilenglicol  
SaFP = Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos primario  
SaFS = Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos secundarios  
ScFv = Fragmento variable de cadena sencilla  
TKC = Tiempo de coagulación activada por Kaolín  
TMB = 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina  
TNF- $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral alfa  
TP = Tiempo de protrombina  
TTPa = Tiempo de promboplastina parcial activada  
TVVR = Tiempo del veneno de vibora Russell

## Resumen

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SaF) se caracterizan por la presencia de manifestaciones trombóticas y hemocitopénicas asociadas a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL), particularmente aquellos que reconocen a la  $\beta_2$ glicoproteína-I ( $a\beta_2$ GP-I), lo cual muestra la importante participación de ésta proteína en los efectos patogénicos del SaF. En el presente trabajo mostramos la caracterización inmunoquímica y molecular de dos clonas de anticuerpos en fragmento variable de cadena sencilla (ScFv) y su capacidad patogénica en un modelo murino del SaF. De una genoteca de rearrreglos  $V_H(D)J_H$  y  $V_LJ_L$  obtuvimos dos clonas en formato ScFv denominadas C3 y C8. La clona C3 reconoce  $\beta_2$ GP-I, complejo cardiolipina (CL)- $\beta_2$ GP-I, fosfatidilserina (FTS), fosfatidilglicerol (FTG), y DNA de cadena doble y tiene baja reactividad contra CL. La clona C8 reconoce  $\beta_2$ GP-I, complejo CL- $\beta_2$ GP-I y tiene baja reactividad contra FTS, FTG y CL. En el modelo murino el 20% de las ratonas del grupo inoculado con la clona C3 presentó resorción fetal, títulos altos de anticuerpos anti-CL y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) prolongado. El grupo inoculado con la clona C8 mostró TTPa prolongado. Los sueros de las ratonas inoculados con la clona C3 presentaron incremento de las citocinas IL-2 e IL-6, en tanto que aquellas inoculadas con la clona C8 presentaron incremento de GM-CSF, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . El análisis molecular de los re-arreglos mostró que ambas clonas son producto del segmento  $V_L$  1b.366F5/DPL5...+ y del segmento JL3b. En ninguna de las clonas identificamos re-arreglos de cadenas  $V_H$ . El análisis estadístico de las secuencias de los re-arreglos mostró que las mutaciones en los CDR2 y CDR3 son dirigidas por antígeno. En conclusión, los nuestros resultados muestran que las clonas C3 y C8 tienen características inmunoquímicas de anticuerpos patogénicos. En el modelo murino, dichas clonas indujeron el desarrollo de manifestaciones clínicas del SaF y los genes  $V_L$  1b.366F5/DPL5...+ y JL3b juegan un papel importante en el reconocimiento de la  $\beta_2$ GP-I.



## Abstract

Anti-phospholipid antibody syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by thrombotic and haemocitopenic manifestations associated with high titers of circulating anti-phospholipid antibodies, specifically those that recognize  $\beta_2$ glycoprotein-1 ( $\alpha\beta_2$ GP-I). This suggests the important role of this protein in the development of the clinical manifestation of the syndrome. In the present work we studied the immunochemical and molecular characterization of two single-chains of variable region (ScFv) clones and its pathogenic capacity in a mouse model of APS. We obtained two clones of gene rearrangements  $V_H(D)J_H$  and  $V_LJ_L$  in ScFv format (C3 y C8) from a patient with primary APS. Clone C3 reacted against  $\beta_2$ GP-I, cardiolipin- $\beta_2$ GP-I complex, phosphatidylserine (PTS), phosphatidylglycerol (PTG), dsDNA, and it has low affinity against CL. Clone C8 reacted against  $\beta_2$ GP-I, CL- $\beta_2$ GP-I complex and it has low reactivity against PTS, PTG and CL. Twenty percent of mice inoculated with clone C3 developed fetal resorption, high titers of anti-CL antibodies and prolonged activated partial thromboplastin time (aPTT). Mice inoculated with the clone C8 also developed prolonged aPTT. Mice inoculated with clone C3 showed high serum levels of IL-2 and IL-6, and those from mice inoculated with clone C8 showed increased levels of GM-CSF, MCP-1 and TNF- $\alpha$ . Molecular analysis of gene rearrangements showed that both clones are assembled from the germline components  $V_L$  1b.366F5/DPL5...+ and JL3b.  $V_H$  rearrangements were not identified. Statistical analysis of the sequences showed that the mutations localized at CDR2 and CDR3 were antigen driven. In conclusion, our results show that clones C3 and C8 have immunochemical characteristics of pathogenic autoantibodies. In the murine model, such clones induced clinical manifestations of the APS. The  $V_L$  1b.366F5/DPL5...+ and JL3b genes play an important role in the interaction with the  $\beta_2$ GP-I.

## 1. Generalidades

### 1.1. Historia

En 1906, Wasserman identificó sueros de pacientes con sífilis que reaccionaban con extractos de tejido de pacientes con sífilis. Desde su descripción, a la prueba se le denominó con el nombre de "prueba de reagina de Wassermann", la reacción fue originalmente atribuida a la presencia de anticuerpos que reaccionan contra epítopes derivados del *Treponema pallidum*. Posteriormente se obtuvieron resultados similares utilizando tejido de sujetos sanos y de animales. En 1941 Pangborn aisló por primera vez, a partir del corazón de ternera, uno de los componentes de la prueba de reagina, la cardiolípidina (difosfatidilglicerol; CL) (Levine y cols., 2002). La combinación de CL, lecitina y colesterol forman la base de la prueba para la detección de la reagina en pacientes con sífilis, prueba a la que se le conoce como VDRL (del Inglés *veneral disease research laboratory*). En 1952, Moore y Mohr identificaron que en ciertas circunstancias la prueba de sífilis puede dar falsos positivos, como en el caso de infecciones virales agudas, vacunación con partículas virales y en respuestas autoinmunes. En ese mismo año Conley y Hartman reportaron dos casos de pacientes que presentaban desordenes hemorrágicos con tiempos de protrombina prolongados, y además daban VDRL falso positivo. A este fenómeno posteriormente se le denominó "anticoagulante lúpico" (AL) (Feinstein y col., 1972). El AL es detectado, debido a que cuando está presente, induce prolongación de los tiempos de coagulación de las pruebas dependientes de fosfolípidos *in vitro* y también es el causante de los resultados falsos positivos en pacientes que no padecen sífilis. Desde su identificación el AL se asoció con trombosis.

Ocho años más tarde Harris y cols. describieron la técnica del radioinmunoensayo, que permitió la detección de anticuerpos anti-CL (aCL) (Harris y cols., 1983) y posteriormente ellos mismos estandarizaron el ensayo

inmunoenzimático "ELISA" (Harris y cols., 1988). En 1999 Alarcón y cols. publicaron una propuesta para los criterios de clasificación de pacientes que presentan manifestaciones clínicas y datos de laboratorio del síndrome de antifosfolípidos, además no presentan manifestaciones clínicas de otras enfermedades autoinmunes, principalmente lupus eritematoso generalizado (LEG), ésta entidad clínica fue definida como "síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario" (SaFP) y así poderla diferenciar del "síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario o asociado" (SaFS) donde se presentan manifestaciones del SaF y manifestaciones del LEG (Alarcón-Segovia y col., 1989)

## 1.2. Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SaF)

El SaF es una enfermedad autoinmune, que combina múltiples anomalías inmunológicas, una de las más importantes y que es a su vez la más estudiada es la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL), los cuales se han asociado con trombosis venosas y/o arteriales y a la pérdida fetal recurrente (Wilson y cols., 1999). La asociación de manifestaciones clínicas con la presencia de títulos altos de aFL circulantes ha ido aumentando conforme se describen más casos de SaF. Aunado a esto, se han descrito variantes primarias y secundarias del síndrome (Hanly, 2003). Las oclusiones de arterias y/o venas afectan todos los órganos con un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Tektonidou, 2004), las cuales incluyen:

- Sistema nervioso central: Isquemia cerebral (35% de casos asociada con trombosis arterial), trombosis venosa en el sinus, migraña, mielopatía transversa, trombosis venosa en retina, síntomas similares a esclerosis múltiple y psicosis.
- Cardíacas: enfermedad valvular (más comúnmente regurgitación mitral), enfermedad de arteria coronaria, cardiomiopatía y trombosis intracardiaca.

- Enfermedad vascular: trombosis recurrente venosa y/o arterial.
- Pulmonares: embolia pulmonar, hipertensión pulmonar, hemorragia pulmonar intra-alveolar, síndrome de diestres, alveolitis fibrosa.
- Renales: trombosis arterial y/o venosa, trombosis de arterias pequeñas y glomerulares y atrofia cortical.
- Endocrinos: Enfermedad de Addison e hipopituitarismo.
- Hematológicas: Trombocitopenía, anemia hemolítica autoinmune y sangrado (muy poco frecuente).
- Gastrointestinales: Necrosis esofágica, isquemia intestinal y necrosis hepática.
- Dermatológicas: *livedo reticularis*, ulceraciones, infarto, necrosis cutánea, gangrena digital y petequias.
- Obstétricas: pérdida fetal recurrente, preeclampsia, parto prematuro o producto no vivo.

### 1.3. Anticuerpos antifosfolípidos (aFL)

Los aFL son inmunoglobulinas de isotipo IgG, IgM e IgA que reaccionan contra fosfolípidos (FL) y/o proteínas plasmáticas que se unen a FL. La detección de los aFL en el laboratorio se realiza por inmunoensayos y pruebas de coagulación (vg. TP, TTPa, TKC y TVVR). Los aFL principalmente asociados al SaF son: a) los anticuerpos aCL o anticuerpos contra otros fosfolípidos de carga negativa (vg. fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ác. fosfatídico y fosfatidilglicerol); b) el AL que son anticuerpos antifosfolípidos que inhiben la activación del factor V

debido a que interactúan con los fosfolípidos impidiendo la generación de trombina. Paradójicamente, el AL induce *in vivo* un estado pro-coagulante; y c) los anticuerpos que reconocen a la  $\beta_2$ GP-I. Títulos altos de anticuerpos anti- $\beta_2$ GP-I se asocian con mayor fuerza a los procesos trombóticos que los aCL en pacientes con SaF.

#### 1.4. Anticoagulante lúpico

El AL son inmunoglobulinas de isotipo IgG, IgM e IgA que interfieren con las pruebas de coagulación *in vitro* dependientes de fosfolípidos (tiempo de protrombina [TP], tiempo de tromboplastina parcial activada [TTPa], tiempo de coagulación activada por Kaolín [TCK] y tiempo de veneno de víbora Russell [TVVR]; Triplett, 1994). La primera evidencia de la relevancia del AL fue reportada en 1963 cuando Bowie y cols. describieron la presencia de AL en cuatro pacientes con LEG, estos pacientes además presentaron trombosis y prueba de VDRL falso-positivo, condiciones que se asocian a la presencia del SaF (Bowie y cols., 1963). Tres años después Nilsson y cols. describieron la asociación entre AL y abortos espontáneos recurrentes (Nilsson y cols., 1975).

Anteriormente, se reportaron algunos subtipos de AL de acuerdo al comportamiento de inhibición del coágulo en TCK (Exner y cols., 1978). Después de la identificación de la  $\beta_2$ GP-I como "cofactor" y de los anticuerpos aCL detectados en fase sólida, Oosting y Roubey demostraron en el mismo año que algunos ALs dependen también de la  $\beta_2$ GP-I para ejercer su actividad anticoagulante, estableciendo así que la  $\beta_2$ GP-I es uno de los principales "cofactores" del AL (Oosting y cols., 1992; Roubey y cols., 1992). En 1991, Bevers describió la importancia protrombina (PT) en la reactividad de algunos ALs (Bevers y cols., 1991). Posteriormente, Oosting demostró que el AL inhibe la actividad de protrombinasa que poseen células endotelial por la unión de la fracción IgG del AL. Dicha fracción IgG se une al complejo protrombina-fosfolípido identificándose

a la protrombina como otro "cofactor" de los aFL específicamente aquellos con actividad de AL (Oosting y cols., 1993).

Actualmente, es posible diferenciar la actividad del AL dependiente de la  $\beta_2$ GP-I y la dependiente de protrombina, esto debido a que al adicionar un neutralizante de CL se inhibe la actividad de AL dependiente de  $\beta_2$ GP-I, lo cual no ocurre con la actividad de AL dependiente de protrombina en ensayos de TTPa. Estas observaciones son razonables, debido a que la  $\beta_2$ GP-I se une a la CL. Pero, el sitio de unión de la protrombina es específico para la FTS (Amengual y cols., 2004). Otro "cofactor" importante del AL es la anexina V. La anexina V fue descubierta inicialmente como un anticoagulante *in vitro* (Reuterlingsperger y cols., 1985), el cual se une a fosfolípidos aniónicos y plaquetas activadas (Thiagarajan y col., 1990 y 1991; Tait y col., 1992). Rauch en 1998 reportó que el suero de algunos pacientes con AL son capaces de reconocer a la anexina V cuando esta unida a FLs (Rauch y cols. 1998).

#### 1.5. $\beta_2$ GP-I y anticuerpos anti- $\beta_2$ GP-I

Los aFL presentes en pacientes con SaF requieren de ciertas proteínas, las cuales se unen a FL como son: la  $\beta_2$ GP-I, la proteína C, proteína S y la protrombina (Oosting, 1993). La  $\beta_2$ GP-I es el "cofactor" de los aFL mas estudiado. En 1990, tres grupos reportaron que los aFL presentes en los sueros de los paciente con SaF primario o asociado a LEG requieren de la  $\beta_2$ GP-I para ser detectados *in vitro* (Galli y cols, 1990; Mcneil y cols, 1990; Koike y col., 1990) desde entonces, varios grupos han reportado la importancia de la  $\beta_2$ GP-I en el reconocimiento de los aFL patogénicos en los pacientes con enfermedades autoinmunes.

A la  $\beta_2$ GP-I también se le conoce como apolipoproteína H. Se sintetiza principalmente en hígado (Alvarado y cols., 1998) y placenta (Chamley y cols., 1997). Es una glicoproteína que tiene la capacidad de unirse a membranas. Se

encuentra presente a concentraciones de ~150 a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Willems y cols., 1996). La proteína consiste de 326 residuos de aminoácidos (figura 1), el 20% aproximadamente de su peso son carbohidratos (Lozier y cols., 1984). Por su conformación tridimensional, a la  $\beta_2\text{GP-I}$  se le ha ubicado dentro de la superfamilia de proteínas de regulación del complemento (CCP), las cuales se caracterizan por presentar aproximadamente 60 residuos de aminoácidos con secuencia repetida de los cuales 16 son residuos conservados unidos por puentes disulfuros (dominios denominados "Sushi"). La  $\beta_2\text{GP-I}$  contiene cinco cadenas de carbohidratos, cuatro N-glicosilaciones en los dominios III y IV (N143, N164, N174 y N234) y una O-glicosilación en el dominio III (T130) (Gambino y cols., 1997).

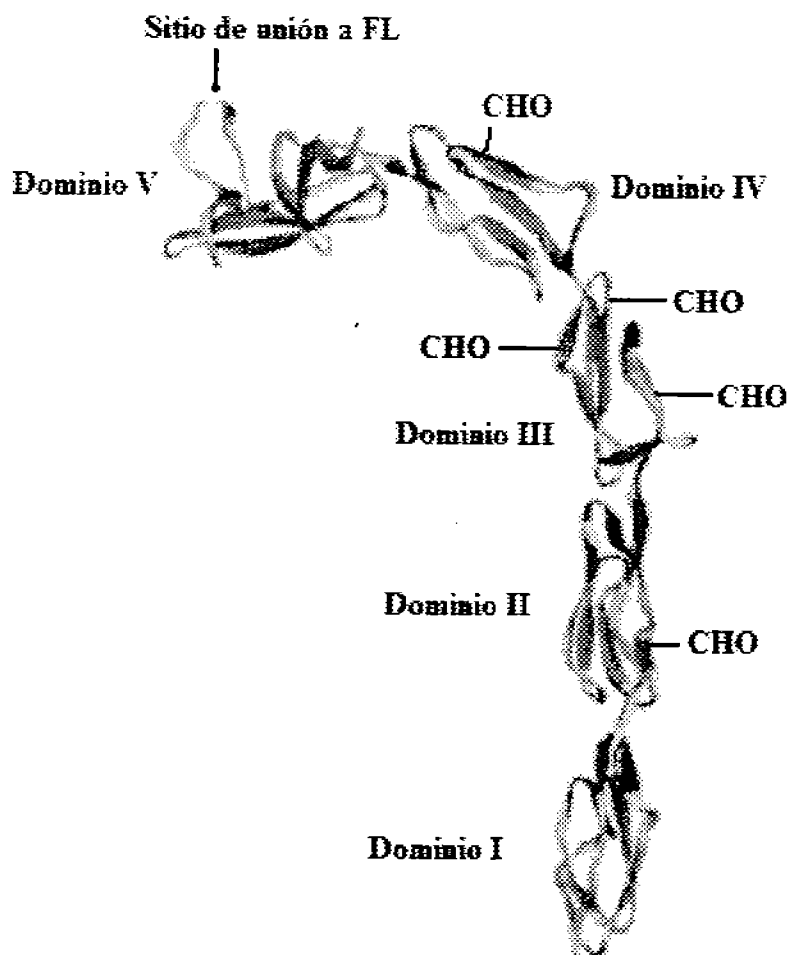


Fig. 1 Estructura tridimensional de la  $\beta_2$ -glicoproteína-I, CHO= carbohidratos

El sitio de unión a fosfolípidos se localiza en el dominio V, entre los residuos del 280 a la 288 la cual es una región rica en residuos de lisina (Kertesz y cols., 1995; Bouma y cols., 1999). La unión de la  $\beta_2$ GP-I a los fosfolípidos produce un cambio conformacional de la estructura secundaria de la proteína (Wang y cols., 2000; Gamsjaeger y cols., 2005) dicho cambio permite la exposición de epítopes crípticos los cuales son reconocidos por los aFL (figura 2). Matsuura y cols. demostraron que aFL poli- y monoclonales murinos se unen directamente a la  $\beta_2$ GP-I pegada a la superficie de placas de ELISA de poliestireno irradiadas en ausencia de CL. La unión de los anticuerpos fue inhibida mediante la adición de perlas cubiertas con el complejo CL- $\beta_2$ GP-I. La adición de  $\beta_2$ GP-I sola no inhibió la actividad de los anticuerpos. Chamley también observó éste mismo efecto, lo que demuestra que el reconocimiento se debe a un cambio conformacional de la  $\beta_2$ GP-I y probable exposición de epítopes crípticos (Matsuura y cols., 1994; Chamley y cols., 1999). Roubey propone que el reconocimiento de los aFL a la  $\beta_2$ GP-I en placas irradiadas se debe al incremento en la densidad del antígeno y no a la exposición de epítopes crípticos (Roubey y cols., 1995). Para explicar estas discrepancias, existen diferentes propuestas, las dos con mayor sustento son: primero los dos grupos utilizaron diferentes técnicas de cuantificación y segundo es posible que algunos aFL requieran la presencia de epítopes crípticos para reconocer a la  $\beta_2$ GP-I y otros no. Igarashi produjo una variante de  $\beta_2$ GP-I que dimeriza espontáneamente en un sistema de expresión en insecto. La variante es reconocida por aFL mejor que la  $\beta_2$ GP-I humana nativa, tanto en placas irradiadas como no irradiadas. Este experimento sugiere la importancia de la unión bivalente de los aFL de baja afinidad (Igarashi y col., 1996; Giles, 2003). Es posible que el proceso de dimerización exponga epítopes crípticos.



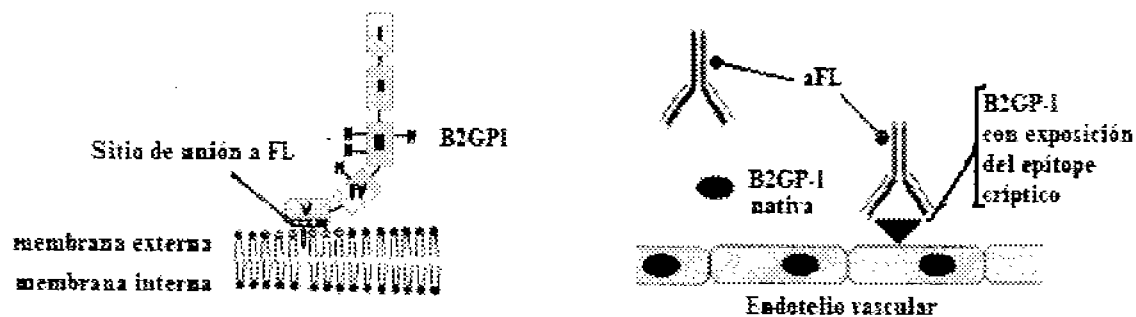


Fig 2. Cambio conformacional de la  $\beta_2$ GP-I por interacción del sitio de unión a FL. Unión con la membrana lipídica del endotelio vascular y reconocimiento de los  $\alpha$ FL por la exposición del epitope críptico de la  $\beta_2$ GP-I

El polimorfismo de la  $\beta_2$ GP-I también juega un papel importante en la producción de autoanticuerpos y en el desarrollo de la enfermedad autoinmune. Se ha hipotetizado que la sustitución de un residuo de aminoácido puede dirigir el reconocimiento y la exposición de epítopes, en particular por cambios conformacionales inducidos por la interacción con fosfolípidos (Schwarzenbacher y cols. 1999). Se han descrito cuatro polimorfismos debidos a cambios de un solo nucleótido. Los cuatro son sustitutivos y se localizan en las posiciones: 88, 247, 306 y 326 (Sanghera y cols. 1997).

Aunque se han reportado anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GP-I dirigidos contra los diferentes dominios de la proteína (Giles y cols., 2003), el polimorfismo Val/Leu<sup>247</sup> localizado en el V dominio muy cerca del sitio de unión a fosfolípidos y de un epítape potencial de los  $\alpha\beta_2$ GP-I en el dominio IV (Hirose y cols., 1999), tiene un papel importante en el cambio de conformación de la molécula, afectando la función de la misma y la unión de los  $\alpha\beta_2$ GP-I. En 1999 Atsumi reportó los resultados de un estudio realizado en pacientes con SaF en los que se observó una mayor frecuencia de homocigotos Val<sup>247</sup> en pacientes con SaF, comparado con sujetos sanos del mismo grupo étnico (Atsumi y cols., 1999). Esta misma correlación se observó en población mexicana y japonesa (Prieto y cols., 2003; Yasuda y cols., 2005).

Uno de los problemas más comunes en el estudio *in vitro* de la interacción de los aFL con la  $\beta_2$ GP-I es la integridad de la misma, debido a que el método de purificación con ácido perclórico (Polz y cols. 1980) es muy drástico y daña a la  $\beta_2$ GP-I, alterando la interacción por fosfolípidos de carga negativa (vg. FTS) entre 0.1 a 2.0  $\mu$ M, ésta interacción en parte se debe a la integridad de las glicosilaciones lo que Brighton denomina "microheterogeneidad" (Brighton y cols. 1999). Las alteraciones de la  $\beta_2$ GP-I por los métodos de purificación han llevado a la modificación de las técnicas. Dos de las técnicas alternativa de purificación que modifica poco los carbohidratos y por ende la microheterogeneidad son: 1) precipitación con polietilenglicol (Cai y cols. 1996); 2) columnas de afinidad y posteriormente electroelución (Gambino y cols., 1996). En ambos casos es posible mantener la integridad de las glicosilaciones.

#### 1.6. Anticuerpos anticardiolipina

Los ensayos convencionales para detectar aFL patogénicos, además de detectar la reactividad contra  $\beta_2$ GP-I unida a fosfolípidos, permiten detectar los aCL "verdaderos" o de tipo infeccioso. Los verdaderos aCL son los que se unen a la CL, y a otros compuestos con carga negativa (vg. FTS, FTI, heparan sulfato, etc.) en ausencia de las proteínas "cofactores", de hecho la  $\beta_2$ GP-I compite con los aCL por su unión a CL. La  $\beta_2$ GP-I humana inhibe la unión de estos anticuerpos a la CL. El efecto se observa también con  $\beta_2$ GP-I de otras especies (vg. rata, ratón, bovina, las cuales tienen una alta homología con la  $\beta_2$ GP-I [ $>$  al 85 %]) lo cual explica por que estos anticuerpos son detectados en ensayos convencionales en presencia de  $\beta_2$ GP-I bovina, debido al uso de suero bovino fetal como agente bloqueante (Matsuura y cols., 1991).

Los aCL verdaderos se encuentra presentes a títulos altos en procesos infecciosos, como sífilis y otras infecciosas virales, bacterianas, por hongos y levaduras (Matsuura y cols., 1992), también pueden estar presentes en individuos sanos (como Ac's naturales aFL ocultos, entre otros). El paradigma actual es que

los aFL patogénicos no están dirigidos contra epítopes presentes en FL, sino que, éstos se encuentran en proteínas que actúan como “cofactores” como la  $\beta_2$ GP-I, algunos epítopes crípticos son expuestos por la interacción con FL o superficies con carga negativa (Pierrangeli y cols., 1992). Se han propuesto diferentes hipótesis que explican la interacción de los aFL con la  $\beta_2$ GP-I. Las que cuentan con más evidencias que los apoyan son: 1) los aFL patogénicos se unen al complejo FL- $\beta_2$ GP-I (figura 3a); 2) los aFL se unen a epítopes crípticos de la  $\beta_2$ GP-I después de la unión a FL (figura 3b); y 3) se requiere de una gran densidad de antígeno para la unión bivalente de los aFL (figura 3c).

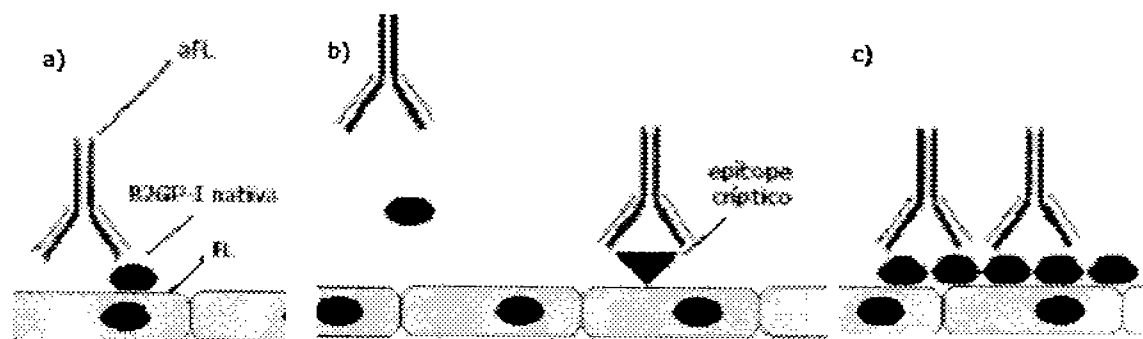


Fig 3. Hipótesis de la interacción de los aFL con  $\beta_2$ GP-I en el endotelio vascular. a) Los aFL se unen al complejo FL- $\beta_2$ GP-I; b) Los aFL se unen a epítopes crípticos de la  $\beta_2$ GP-I después de la unión a FL; y c) incremento en la densidad de la  $\beta_2$ GP-I sobre la superficie del endotelio permite la unión de los aFL

### 1.7. Otros anticuerpos antifosfolípidos

El ensayo inmunoenzimático también permite detectar anticuerpos contra fosfolípidos neutros como la fosfatidilcolina (FTC), muchos tienen reacción cruzada con CL. Los anticuerpos antifosfatidilcolina (aFTC) son principalmente de isotipo IgM y no requieren de la  $\beta_2$ GP-I para ser detectados *in vitro*. La uniformidad de su isotipo sugiere que son anticuerpos naturales y, títulos altos de éstos anticuerpos se asocian principalmente con anemia hemolítica autoinmune (Cabral y cols., 1990). Otro anticuerpo contra FLs neutros son los que reconocen fosfatidiletanolamina (aFTE). La caracterización inmunológica de los aFTE

muestra que también requieren de un “cofactor”, el cual se ha descrito que es cininogeno o el complejo de proteína de unión a cininogeno-cininogeno (Balada y cols., 2001; Sanmarcos y cols., 2001).

En 1993, Vaarala reportó que los pacientes con LEG pueden presentar títulos altos de anticuerpos anti-lipoproteínas de baja densidad oxidadas (anti-oxLDL) y aCL, los estudios mostraron que no existe correlación entre aCL y anti-oxLDL. Sin embargo, los estudios de inhibición con oxLDL inhibieron la actividad anti-CL en un porcentaje importante y no se observó inhibición de la actividad anti-oxLDL con liposomas de CL. Lo anterior sugiere que puede existir una reactividad cruzada parcial entre CL y LDL, lo cual puede deberse a la parte lipídica de ambos complejos (Alarcó-Segovia y col., 2000). En el 2002 Alves reportó la participación de anticuerpos anti-lipoproteínas de alta densidad y  $\alpha\beta_2$ GP-I en la reducción de paraoxonasa en pacientes con LEG y SaFP (Alves y cols., 2002). Ésta enzima es importante para prevenir la oxidación de las LDL con efecto aterogénico, dicha interacción es relevante para el desarrollo de aterosclerosis en los pacientes con SaF primario y asociado a LEG.

#### 1.8. Mecanismos patológicos de los anticuerpos antifosfolípidos (aFL)

Estudios recientes muestran que muchos anticuerpos asociados con el SaF están dirigidos contra proteínas plasmáticas y proteínas de superficie. Se proponen dos mecanismos patofisiológicos diferentes (Espinosa y cols., 2003). El primero, es en el que los aFL pueden actuar *in vivo* alterando las reacciones hemostáticas que ocurren en las membranas de ciertas células (plaquetas y células endoteliales); segundo, pueden alterar la cinética de coagulación-anticoagulación por reacción cruzada con proteínas de unión a membrana, por inhibición en la interacción proteína-proteína y/o inhibición a la interacción de proteína-fosfolípido (tabla 1).

---

*Reacción de inhibición de anticoagulantes*

Inhibición de la proteína C reactiva	a) Inhibición de la activación de la proteína C b) Inhibición de la proteína C activa
Inhibición de la actividad antitrombina	
Desplazamiento de anexina A5	
Inhibición de la actividad anticoagulante de la $\beta_2$ GP-I	

---

*Eventos mediados por células*

Monólitos	a) Expresión factor tisular
Células endoteliales	a) Incremento en la actividad procoagulante de la células endoteliales 1) Expresión del factor tisular 2) Expresión de moléculas de adhesión b) Alteración de la fibrinólisis c) Desregulación en la producción de eicosanoides 1) Decremento en la producción de PGI <sub>2</sub> por parte de las células endoteliales 2) Incremento en la producción de tromboxano A.
Plaquetas	a) Incremento en la activación y agregación plaquetaria

---

Tabla 1. Posibles mecanismos de trombosis mediada por autoanticuerpos en SaF

### 1.9. Mecanismos patológicos de la $\beta_2$ GP-I

La  $\beta_2$ GP-I interacciona con diversos componentes de la cascada de la coagulación y de la cascada fibrinolítica (figura 4) ocasionando el retraso en el tiempo de generación de trombina. La unión de  $\beta_2$ GP-I a fosfolípidos aniónicos sobre plaquetas y células endoteliales compite con los factores de coagulación por la superficie lípidica. Por otro lado, la plasmina y con menos eficiencia el factor Xa pueden romper a la  $\beta_2$ GP-I en el V dominio ( $K^{317}$ - $T^{318}$ ) *in vitro* impidiendo así la unión a fosfolípidos (Hunt y cols., 1993). Este fenómeno se potencia en presencia de heparina que inhibe la generación de plasmina por el activador del plasminógeno tisular (APt; Yasuda y cols., 2004), esta conversión de plasminógeno a plasmina por APt es un evento importante en el sistema fibrinolítico. La  $\beta_2$ GP-I escindida se encuentra presente en pacientes con AL, además genera *in vivo* un importante mecanismo de autorregulación entre la  $\beta_2$ GP-I y los factores de la coagulación (figura 4).

La acción procoagulante de la  $\beta_2$ GP-I incluye la inhibición de la degradación del factor Va por la proteína C activada por proteína S (PCaPS). La inhibición se potencia en presencia de aCL (Ieko y cols., 1999). El rompimiento de la  $\beta_2$ GP-I por plasmina neutraliza la inhibición en la activación del factor XI por la  $\beta_2$ GP-I, dando como resultado una activación excesiva de la coagulación y la formación de trombina. La trombina por su parte inhibe la producción de plasmina vía IFAT (figura 4), por otro lado, la  $\beta_2$ GP-I escindida inhibe la activación del plasminógeno por la plasmina, atenuando el sistema fibrinolítico (Miyakis y cols., 2004).

En el caso de la actividad anticoagulante de la  $\beta_2$ GP-I, se ha observado que participa la agregación de plaquetas mediada por ADP e interrupción en la generación de trombina por el complejo protrombinasa, ésta interrupción se amplifica en presencia de aFL. Además, la  $\beta_2$ GP-I inhibe la activación del factor XII en presencia de fosfolípidos e inhibe la activación del factor X en presencia de



Pierangeli ha descrito que la capacidad de la  $\beta_2$ GP-I de unirse a membranas de células endoteliales *in vitro*, promueve un aumento en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina (Pierangeli y cols., 2001). Dímeros de  $\beta_2$ GP-I tiene la capacidad de unirse a fosfolípidos expuestos sobre plaquetas activadas e interactúan con el receptor 2 de la apolipoproteína E, que es un miembro de los receptores de lipoproteínas de baja densidad, el cual se expresa en plaquetas y trofoblastos (Lutters y cols., 2003). Shi y cols. describieron recientemente que los anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GP-I unidos a la  $\beta_2$ GP-I se unen a las plaquetas por medio de la GPIb-V-IX, induciendo activación plaquetaria (Shi y cols. 2006; Canobbio y cols., 2004). Este fenómeno explica la presencia de trombos ricos en plaquetas en los pacientes con SaF. Además otros estudios recientes han mostrado que la  $\beta_2$ GP-I tiene la capacidad de unirse a trofoblastos *in vitro* permitiendo la unión de anticuerpos  $\alpha\beta_2$ GP-I y desregulando así la expresión de la hormona gonadotropina coriónica humana, lo cual podría ocasionar posiblemente la pérdida fetal (Stone y cols., 2006; Di Simona y cols., 2005). Vlachoyiannopolous propone la participación de la molécula CD40 en la activación de células endoteliales, basado en la similitud de la región del 239 al 245 del CD40 con el segmento del aminoácido 7 al 13 de la  $\beta_2$ GP-I, el cual se localiza en el primer dominio, debido a que encontró en pacientes con SaF anticuerpos que reconocen al péptido antes mencionado del CD40 (Vlachoyiannopolous, 2004).

#### 1.10. Mecanismo patológico del AL

Las evidencias sugieren dos probables mecanismos de acción del AL, uno anticoagulante y el otro procoagulante. En condiciones normales los FL aniónicos de las membranas celulares son translocados de la cara interna a la cara externa de las membranas, quedando expuestos y permitiendo el ensamblaje de tres complejos de la cascada de la coagulación. Uno es el del complejo factor tisular (TF)-VIIa; el otro es aquel en el que participa el complejo IXa-VIIa; y el tercero involucra al complejo Xa-Va. El resultado del anclaje de los complejos acelera el proceso de coagulación. En el caso del complejo TF-VIIa activa al factor



IX o X, el factor IXa activa al factor X, y al factor Xa, el producto final es la formación del complejo protrombinasa, que activa al factor II (trombina) y este a su vez escinde al fibrinógeno formando la malla de fibrina (figura 5a).

Un anticoagulante importante es la anexina-V. Esta proteína cubre la superficie de la bicapa lipídica, inhibiendo la formación de los complejos procoagulantes antes mencionados (figura 5b). En ausencia de anexina-V el complejo aFL- $\beta_2$ GP-I puede prolongar los tiempos de coagulación, debido a que el complejo se une por los dominios I o II de la  $\beta_2$ GP-I, lo cual resulta en formación de dímeros o trímeros del complejo aFL- $\beta_2$ GP-I incrementando la afinidad por los FLs, por medio del dominio V, esto reduce la disponibilidad de los fosfolípidos a los factores de coagulación (figura 5c). En presencia de anexina-V y aFL, directamente o vía interacción con “cofactores” ocasionan la desregulación de la actividad de la anexina-V, lo que resulta en un incremento de la cantidad de FLs expuestos e inducción de la coagulación (figura 5d). El fenómeno *in vivo* es procoagulante, e *in vitro* se manifiesta con un retraso en los tiempos de formación de los coágulos de fibrina (Rand, 2002).

#### 1. 11. Síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos “catastrófico”

La mayoría de los pacientes con SaF desarrollan trombosis arteriales y/o venosas como único sitio anatómico, sin embargo, un número pequeño presenta trombosis generalizada y tienen una tasa alta de mortalidad. A éste fenómeno se le denominó “Síndrome de anti-fosfolípidos catastrófico”, el cual se atribuye a una respuesta aguda o “tormenta trombótica”. La frecuencia del padecimiento se estima en 0.8% en población caucásica, involucrando al menos de tres órganos con síntomas que se desarrollan en días o en semanas. Aunque vasos de grueso calibre pueden verse afectados, típicamente se presenta una microangiopatía trombótica aguda que afecta vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre en múltiples órganos, el 50% de los casos incluyen riñones, pulmones, sistema nervioso central, corazón y piel (Asherson y cols., 1998).

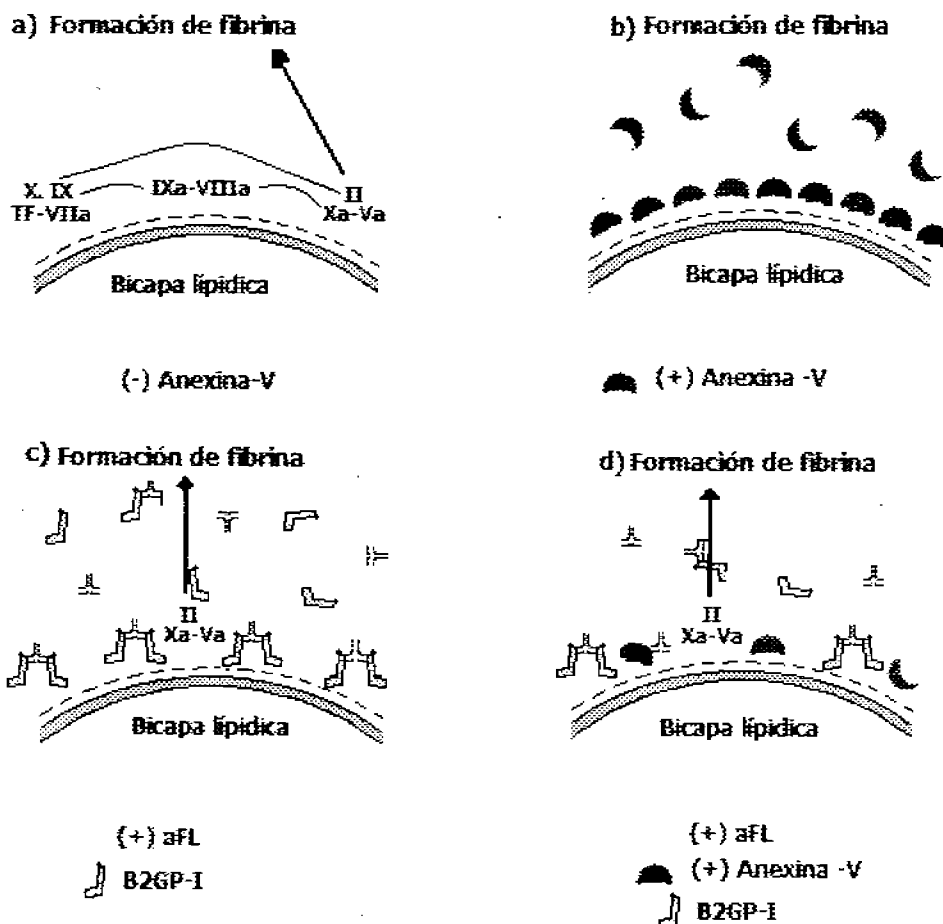


Figura 5. Mecanismos de acción del AL con la participación de diferentes cofactores: a) Proceso normal de coagulación; b) bloque de la coagulación por anexina V; c) bloqueo de la coagulación por la formación del complejo  $\beta_2$ GP-I-aFL; y d) desplazamiento de la anexina V por el complejo  $\beta_2$ GP-I-aFL permitiendo la formación de la fibrina.

### 1.12. Estudio y análisis de los anticuerpos anti-fosfolípidos

Para el estudio de los anticuerpos anti-fosfolípidos se han aplicado diversas metodologías, que incluyen desde la generación de anticuerpos monoclonales hasta la generación de anticuerpos por la técnica de expresión en fagos filamentosos (EFF), esta última ha tenido gran importancia ya que es posible producir genotecas de  $\sim 10^{10}$  combinaciones (Smith, 1997). Las combinaciones son uniones aleatorias de distintas cadenas  $V_H$  con diferentes cadenas  $V_L$  y son insertadas en fagos para ser expresadas como fragmentos variables de cadena

sencilla (ScFv). Una vez generadas las bibliotecas genómicas son seleccionadas con el antígeno específico para posteriormente realizar el estudio inmunoquímico y molecular. Hasta la fecha esta metodología ha permitido generar una gran cantidad de anticuerpos contra diferentes antígenos, incluyendo marcadores de superficie celular y moléculas solubles.

En el SaF, la técnica de EFF ha tenido gran relevancia, ya que ha permitido estudiar a los aFL desde el punto de vista molecular (Cabiédes y col, 2005), sin embargo, los resultados deben tomarse con cautela, debido a que las combinaciones son aleatorias y no representan en su totalidad a los  $\alpha\beta_2\text{GP-I}$  detectados en el suero de los pacientes con SaF. En 1999 Chukwuoka reportó el estudio de tres anticuerpos monoclonales  $\alpha\beta_2\text{GP-I}$ , dos de los cuales tenían reactividad cruzada contra protrombina y uno contra oxLDL (Chukwuoka y cols. 1999). Blank reportó tres secuencias de péptidos de la  $\beta_2\text{GP-I}$  expresados en fagos filamentosos que fueron reconocidos por anticuerpos de pacientes con SaF. Además, en su modelo murino fueron capaces de prevenir el SaF (Blank y cols., 1999; Blank y cols., 2002). Uno de éstos péptidos tiene homología con antígenos bacterianos, lo cual podría explicar la probable etiología del síndrome (Pierangeli y col., 2004). En el 2002 Blank y cols. muestran la inducción del SaF experimental mediante ScFv y diferentes combinaciones de cadenas obtenidas a partir de anticuerpos monoclonales  $\alpha\beta_2\text{GP-I}$  (Blank y cols., 1999). En éste último trabajo muestran la importancia de ambas cadenas, tanto  $V_H$  como  $V_L$ , para la unión a los antígenos. Kumar en el 2005 también observó una alta reactividad de las cadena  $V_L$  de un anticuerpo en formato Fab, el cual se une al IV dominio de la  $\beta_2\text{GP-I}$  (Kumar y cols., 2005).

Recientemente en nuestro laboratorio obtuvimos una genoteca de re-arreglos  $V_H(D)J_H$  y  $V_LJ_L$  en ScFv de una paciente con SaF primario, en el estudio presentamos las características inmunoquímicas y moleculares de dos clonas con reactividad contra  $\beta_2\text{GP-I}$  y una contra protrombina. Además, mostramos el análisis de las mutaciones puntuales. Los datos sugieren que dos clonas  $\alpha\beta_2\text{GP-I}$

parecen no ser dependientes de antígeno y pueden ser anticuerpos naturales, mientras que una clona con reactividad cruzada contra protrombina si es dependiente de antígeno (Languren y cols., 2006). De esa misma genoteca, obtuvimos dos fago-anticuerpos, que parecen presentar el mismo re-arreglo, de los ya reportados. En el presente trabajo mostramos la caracterización inmunoquímica y molecular de las dos clonas y su posible capacidad patogénica en un modelo murino del SaF.

## 2. Hipotesis

Los anticuerpos anti- $\beta_2$ GP-I patogénicos de pacientes con SaF, son codificados por un número limitado de genes  $V_H$  y  $V_L$ , los cuales sufren hipermutación somática, en la que se acumulan residuos de los aminoácidos: K, R y N. Además, no presentan reactividad contra antígenos conservados filogenéticamente e inducen el SaF en modelos murinos.

## 3. Justificación

Estudios recientes muestran la importancia de las mutaciones puntuales en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de los anticuerpos codificados por genes de línea germinal que no reconocen autoantígenos, dichos cambios inducen la acumulación de dos residuos de aminoácidos de carga positiva (K y R) y un residuo de aminoácido neutro (N). La identificación de los genes  $V_H(D)J_H$  y  $V_LJ_L$  y el estudio de las mutaciones puntuales que alteran el patrón de reconocimiento de los anticuerpos, permitirá entender y en un futuro modificar la respuesta autoinmune en los pacientes con SaF.

#### 4. Objetivos

1. Caracterizar molecular e inmunoquímicamente la genoteca de re-arreglos  $V_H(D)J_H$  y  $V_LJ_L$  obtenidos de células B de una paciente con SaFP.
2. Determinar la reactividad de los re-arreglos  $V_H(D)J_H$  y  $V_LJ_L$  de una paciente con SaF que fueron seleccionados por su reactividad contra  $\beta_2GP-I$  y contra el complejo cardiolipina- $\beta_2$ glicoproteína-I.
3. Determinar la capacidad patogénica de los re-arreglos en formato ScFv que reconocen a la  $\beta_2GP-I$  y al complejo cardiolipina- $\beta_2GP-I$ , infundiéndolos en ratonas Balb/c preñadas para inducir el síndrome.

## 5. Metodología

### 5.1 Obtención y caracterización molecular e inmunológica de las clonas.

#### 5.1.1: Expresión del Pili F+ en *E. coli*.

5.1.1.1. De una caja de cultivo de *E. coli* TG1 se tomó una colonia y se sembró en medio mínimo esencial (MME; ver anexo) y se incubó toda la noche, para inducir la expresión del Pili F+

5.1.1.2. Al día siguiente se tomó una colonia y se inoculó en 10 mL de medio 2x YT (ver anexo) y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm en una incubadora Max Q (Barsnstead/Lab-line) hasta alcanzar la fase log ( $A_{600} \sim 0.3-0.6$ )

#### 5.1.2. Obtención de clonas

5.1.2.1. De la genoteca original seleccionada, mediante cuatro rondas de bioselección, se tomaron 100  $\mu$ L de fago-anticuerpos y se adicionaron a 10 mL de un cultivo bacteriano de *E. coli* TG1 en fase log y se incubaron por 1 h a 37 °C con agitación. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 3500 rpm por 10 min (RT7 plus; Sorvall) y se decantó el sobrenadante, posteriormente, se resuspendió la pastilla en medio 2x YTA (ampicilina 100  $\mu$ g/mL) y se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente se sembraron las células en cajas con medio 2x YTA y se incubaron a 37 °C toda la noche.

### 5.1.3. Amplificación de la clona

5.1.3.1 Para la amplificación de las clonas se aislaron colonias independientes de cada una de las cajas y se crecieron en placas de cultivo de 96 pozos (Nunc Inc, Danemark 97F) con medio de cultivo 2x YTAG (2x YTA-Glucosa 2 %), se incubaron las placa hasta que los cultivos alcanzaron la fase log y se infectaron con 10  $\mu$ L de fago ayudador M13K07, se incubó por 1 h y se cambió el medio por medio 2x YTAK, suplementado con Kanamicina 50  $\mu$ g/mL. Se incubó toda la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente se centrifugaron las bacterias y el sobrenadante obtenido fue utilizado para determinar su reactividad por ELISA

5.1.3.2. Para el ensayo inmunoenzimático, se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Inc; Danemark 97F) con 10  $\mu$ g/mL de  $\beta_2$ GP-I disuelto en PBS (ver anexo) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron las placas y se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1.5% durante 2 h a 37 °C en PBS (ASB-PBS). Después, se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 (ver anexo). Posteriormente, se adiciono 50  $\mu$ L de fago-anticuerpos previamente obtenido del cultivo de clonas independientes a una concentración  $1 \times 10^9$  y se incubaron durante una hora a 37 °C. Se Realizaron tres lavados con PBS-Tween y se adicionó anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa (anti-M13-HRP) a una dilución 1:10,000 y se incubó las placas durante 1 h a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-tween y se adicionó 100  $\mu$ L de TMB como sustrato (the binding site; UK), pasados 20 min se adicionó ácido *o*-fosfórico (the binding site; UK) y se leyeron las placas en un lector ELISA (Sunrise; TECAN) a 450 nm.

5.1.3.3. De las clonas positivas se amplificaron los fago-anticuerpos. Brevemente, a un cultivo de 10 mL en fase log de *E. coli* TG1 se



adicionaron 10  $\mu$ L de fago-anticuerpo que dieron positivos contra  $\beta_2$ GP-I y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después de la incubación se cambió el medio de cultivo por 2x YTAK y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm.

5.1.3.4. A la mañana siguiente se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min, y se recuperó el sobrenadante, después se filtró el medio (con un filtro de 45  $\mu$ m; Minisart, Satorius) para eliminar completamente las células y los detritos celulares. Al filtrado se adicionó 2.5 mL de polietilenglicol 8,000 al 20% en NaCl 2.5 M (PEG/NaCl), y se incubó 1 h a 4 °C. Se Centrifugó a 18,000 rpm durante 20 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 mL de PBS 1X y filtró nuevamente con un filtro de 45  $\mu$ m.

#### 5.1.4. Caracterización de las clonas

5.1.4.1. Para la caracterización molecular de las clonas, se cultivaron las bacterias (que dieron positivas en el ELISA) en 250 mL de medio 2x YTA durante toda la noche a 37 °C con agitación a 300 rpm (Max Q; Barsnstead/Lab-line).

5.1.4.2. Al día siguiente se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 4 °C (RT7 plus; Sorvall) y se purificaron los vectores de acuerdo a las especificaciones del equipo *endo free plasmid kit* (Qiagen). Brevemente, se resuspendieron las pastillas en 10 mL de amortiguador P1 (Qiagen) y se adicionaron 10 mL de amortiguador P2 (Qiagen), se mezclaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de amortiguador P3 (Qiagen) frío y se mezclaron por inversión. Se Colocaron las soluciones a los filtros QIAfilter (Qiagen) y se incubaron 10 min a TA. Posteriormente, se filtraron las soluciones y se adicionaron 2.5 mL de amortiguador R

(Qiagen), se mezclaron por inversión y se incubaron 30 min en hielo. Se Colocaron las soluciones en columnas QIAGEN-tip 500 (previamente equilibradas con 10 mL del amortiguador QBT; Qiagen), se lavaron 2 veces las columnas con amortiguador QC (Qiagen) y se eluyeron con 15 mL de amortiguador QN (Qiagen). Se precipitaron los plasmidos con 10.5 mL de isopropanol, y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 30 min y 4 °C (RC-5 superspeed refrigerated centrifuge; Sorvell). Se lavaron las pastillas con 5 mL de endotoxin-free/etanol (Qiagen), y se secaron las pastillas durante 10 min y se resuspendieron en amortiguador TE (Qiagen)

5.1.4.3. Se amplificaron el re-arreglos ScFv a partir de los vectores, mediante PCR con los oligonucleótidos: pC5-R1 CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC y pC5-R2 CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C por 1 min, 55°C por 2 min y 72°C por 2 min, 30 ciclos. Se confirmaron los productos amplificados en gel de agarosa al 1.25 % en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE; ver anexo). Se purificaron las secuencia con el equipo *High Pure PCR product Kit* (Roche) de acuerdo a las especificaciones de fabricante. En resumen, se adicionaron al producto de la PCR 5 volúmenes de amortiguador de unión (Roche), y se mezclaron en vortex y se incubaron 5 min a TA. Se colocaron en las columnas (*High pure spin filter tubes*; Roche) y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min 30 seg (centrifuga 5410; eppendorf). Se desecharon los líquidos y se lavaron las columnas con amortiguador de lavado (Roche), se eliminaron los líquidos y se adicionaron 50 µL de amortiguador de elución (Roche). Se Incubaron 5 min a TA y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min.

5.1.4.4. Las secuencias se caracterizaron mediante tratamiento con endonucleasas de corte frecuente. Las secuencias obtenidas de las

clonas fueron digeridas con la enzima *Mva I* (Amersham Bioscience) de acuerdo al siguiente protocolo: Se colocamos 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de reacción 10X (Amersham Bioscience) más 1  $\mu\text{L}$  de muestra a una concentración de 150  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y 17  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada-desionizada, se incubaron durante 2.5 h a  $37^\circ\text{C}$ . se analizaron los productos de la digestión en geles de agarosa al 1.5 % en amortiguador TAE. Además, se secuenciaron los fragmentos (MWG biotech, USA) y se analizaron con la base de datos de VBase (<http://vbase.mrc.cpe.cam.ac.uk>)

#### 5.1.5. Titulación de los fago anticuerpos

5.1.5.1. Se incubaron las células TG1 en 200  $\mu\text{L}$  de medio 2x YT hasta que alcanzaron su fase log y posteriormente se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de las diluciones de fago-anticuerpos 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con agitación durante 30 min y posteriormente, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de los cultivos en cuadrantes de papel de nitrocelulosa (GIBCO; Life Technologies) previamente colocado en cajas con medio 2x YTA (ver figura 6). Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  TA y al día siguiente se contaron las colonias. El numero de colonias se expresó en unidades formadoras de colonias (UFC)/mL (Koch y cols., 2000).

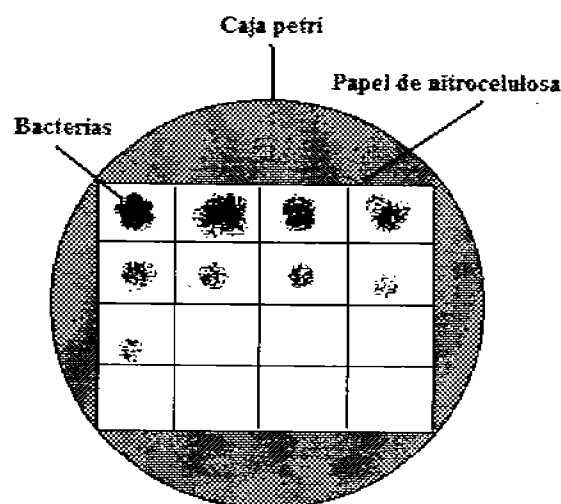


Figura 6. Cuantificación de las UFC/mL mediante la técnica establecida por Koch.

## 5.1.6. Ensayos de reactividad de los fago anticuerpos contra diferentes antígenos

5.1.6.1. Para determinar la reactividad contra antígenos específicos, se sensibilizaron placas de 96 pozos (NUNC Inc; Denmark) con CL,  $\beta_2$ GP-I y CL- $\beta_2$ GP-I como sigue: Brevemente, se incubaron las placas toda la noche a 4 °C con 50  $\mu$ l/pozo de  $\beta_2$ GP-I a una concentración de 10  $\mu$ g/mL en PBS, y al día siguiente se eliminó la solución y se bloquearon los sitios inespecíficos con ASB-PBS durante dos horas a TA. Para la actividad anti-CL (SIGMA) se sensibilizaron las placas con CL a una concentración de 50  $\mu$ g/mL disueltos en etanol y se evaporó el etanol con nitrógeno gas en una cámara de acrílico durante 30 min, posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con 300  $\mu$ L de ASB-PBS por 2 h. Se decantó la solución de bloqueo y se almacenaron las placas 4 °C hasta su uso. Para las placas sensibilizadas con el complejo CL- $\beta_2$ GP-I primero se sensibilizaron los pozos con CL a la misma concentración que como se mencionó arriba y después se bloquearon los sitios inespecíficos con 200  $\mu$ L de ASB-PBS durante 2 h a TA y se adicionó 50  $\mu$ L de  $\beta_2$ GP-I purificada humana a uno de los pozos a una concentración de 25  $\mu$ g/mL en PBS, se incubaron las placas durante 1 h y se lavaron tres lavados con PBS.

5.1.6.2. Para determinar la reactividad contra diferentes fosfolípidos. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (NUNC Inc; Denmark) con fosfatidiletanolamina (FTE), fosfatidilglicina (FTG), esfingomiélin (EM) o fosfatidilserina (FTS) a la misma concentración y con las mismas características que como se describe en el punto 5.1.6.1 para CL.

5.1.6.3. Para determinar la actividad contra los diferentes antígenos. Se adicionó 50  $\mu$ L/pozo de fago-anticuerpo a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  en ASB-PBS en las placas previamente sensibilizadas con los diferentes antígenos. Se incubaron las placas con los fago-anticuerpos durante 1 h

a 37°C, posteriormente, se lavaron tres lavados con PBS incubandose 5 min en cada lavado, posteriormente, se adicionó 50 µL/pozo de anticuerpos anti-M13-HRP a una dilución 1:10,000 en ASB-PBS y se incubaron durante una hora a 37 °C. Terminada la incubación se lavaron las placas tres veces con PBS y se adicionaron 100 µL/pozo de TMB (the binding site; UK) y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Se detuvo la reacción con 100 µL/pozo de ácido o-fosfórico (the binding site; UK) y leyó la absorbancia en un lector de ELISA (Sunrise, Tecan) a 450 nm.

#### 5.1.7. Curvas dosis-respuesta, de inhibición con β<sub>2</sub>GP-I y adsorción con FLs

5.1.7.1 Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc Inc, Denmark) con los diferentes antígenos, como se mencionó en el apartado 5.1.6. y se adicionó 50 µL/pozo de fago-anticuerpo a concentraciones de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{10}$ . Posteriormente, se desarrolló el ensayo como se mencionó en el apartado 5.1.6.

5.1.7.2. Para los ensayos de inhibición. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc Inc. Denmark) como se mencionó en el apartado 5.1.6. Para la inhibición con β<sub>2</sub>GP-I, se colocaron diferentes concentraciones de β<sub>2</sub>GP-I en dilución doble seriada (25 µg/mL a 3.125 µg/mL). Se mantuvo constante la concentración de fago-anticuerpo ( $1 \times 10^{10}$  UFC/mL) y se incubó durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se tomaron 50 µL de la mezcla y se colocaron en los pozos de las placas previamente sensibilizadas para medir la absorbancia de los fago-anticuerpos libres. Se expresaron los resultados en porcentaje de inhibición y se calcularon de la siguiente manera:

$$\frac{\text{DO de Fago-Ac sin inhibidor} - \text{DO de Fago-Ac inhibido}}{\text{DO de Fago-Ac sin inhibir}} \times 100$$

5.1.7.3. En el caso de los ensayos de adsorción con fosfolípidos, se prepararon micelas de fosfolípidos de acuerdo a la técnica descrita por Cabral y cols. (1990). Brevemente, se disolvió en un vaso de precipitado de 50 mL, 2 g de CL y se evaporó el etanol con nitrógeno gas. Se resuspendió la CL en 1.0 mL de PBS (para el ensayo de CL libre de  $\beta_2$ GP-I; a una concentración final de 1 mg/mL) y en 1 mL de PBS con 10 % de suero bovino fetal para el complejo CL- $\beta_2$ GP-I. A la mezcla anterior se le adicionó 1  $\mu$ L de Tween 20. Posteriormente, la mezcla se colocó en tubos de polipropileno de 1.5 mL, se homogenizó durante 15 min en un homogenizador automático (Vortex). Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 15 min a 4°C y se homogenizaron nuevamente 15 min en el vortex. La suspensión se utilizó inmediatamente después de su preparación. Los resultados se reportaron como el porcentaje de adsorción y se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{DO de Fago-Ac sin liposomas} - \text{DO de Fago-Ac con liposomas}}{\text{DO de Fago-Ac sin liposomas}} \times 100$$

5.1.7.4. Se agregaron fago-anticuerpos a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL a la suspensión de micelas. Se Homogenizó suavemente la suspensión y se incubó a 37 °C por 1 h, posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. el sobrenadante se recuperó y una parte se utilizó para medir la actividad mediante ELISA y la otra se colocó en un tubo nuevo que contenía 1 mg/mL de micelas. Se incubó 1 h a 37 °C y el sobrenadante se recuperó para ensayos de actividad remanente por ELISA y para una nueva ronda de inhibición. Se repitió el procedimiento 5 veces. Finalmente, a los sobrenadantes recuperados (fago-anticuerpos libres) se les midió la actividad contra los diferentes antígenos mediante ELISA.

## 5.2. Modelo Murino.

### 5.2.1. Estandarización de la concentración de fago-anticuerpos

5.2.1.1. Se dividieron las ratonas de 8 a 12 semanas de edad en 5 grupos (3 ratonas por grupo) y se inmunizaron de la siguiente manera: grupo 1 (control) sin tratamiento; grupo 2 (control inmunizado con 50  $\mu$ L de PBS; grupo 3 (control de fago) a las que se les administraron 50  $\mu$ L de fago-irrelevante a diferentes concentraciones ( $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^9$  UFC/mL); grupo 4 y 5, se les administraron 50  $\mu$ L de las clonas C3 y C8 respectivamente a diferentes concentraciones ( $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^9$  UFC/mL). La administración de los diferentes grupos se realizó por vía intravenosa (VI) de acuerdo a la técnica descrita por Pasqualini (Pasqualini y col. 1996). A las tres semanas, se les administró un refuerzo de la misma concentración VI. Posteriormente, al día 21 después de la primera inoculación se sacrificaron a las ratonas y se les determinó las concentraciones de anticuerpos anti-fago y su reactividad contra antígenos específicos mediante ELISA.

### 5.2.2. Caracterización de la reactividad de los anticuerpos de los sueros de las ratonas inoculadas

5.2.2.1. Para determinar la reactividad de los sueros contra CL,  $\beta_2$ GP-I y contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, se sensibilizaron en placas de 96 pozos (Nunc Inc; Denmark) con los antígenos específicos como se mencionó en el apartado 5.1.6.1. Después de sensibilizar las placas, se adicionaron 50  $\mu$ L de la dilución de los sueros 1:50, se incubó las placas 1 h a 37 °C y posteriormente, se lavaron con PBS. Se adicionaron 50  $\mu$ L anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:5000 y se incubaron a 37 °C por 1 h. Transcurrida la incubación se lavaron la placa tres veces con PBS y se adicionó 200  $\mu$ L

de *p*-nitrofenil fosfato disódico en amortiguador de dietanolamina (ver anexo). Se incubaron las placas durante 1 h al resguardo de la luz y se leyeron las absorbancias en un lector de ELISA a 405 nm.

5.2.2.2. Para detectar la reactividad contra el fago, se sensibilizaron placas de 96 pozos con fago M13K07 a una concentración de  $(1 \times 10^9 \text{ UFP/mL})$  en PBS y se incubaron toda la noche a 4°C, al día siguiente se bloquearon las placas con ASB-PBS y se determinó la reactividad de los sueros de las ratonas como se mencionó en el apartado anterior.

### 5.2.3. Modelo murino del síndrome

5.2.3.1. Para la inducción del SaF en las ratonas de 8 a 12 semanas de edad, se separaron a las ratonas en 5 grupos, las cuales fueron tratadas como se describe a continuación, consideramos día cero de embarazo cuando se juntaron hembras y machos: grupo 1 o control, compuesto de 13 ratonas a las que no se les realizó ningún tratamiento; grupo 2 o control tratadas con PBS, formado por 9 ratonas a las que se les administró 50  $\mu\text{L}$  de PBS; grupo 3 o control de fago, formado por 9 ratonas a las que se les administró 50  $\mu\text{L}$  de fago-irrelevante a una concentración de  $1 \times 10^{10} \text{ UFC/mL}$ ; grupos 4 y 5 o grupos caso, formado por 15 ratonas a las que se les inoculó VI 50  $\mu\text{L}$  de fago-anticuerpos de acuerdo a los resultados obtenidos mediante la metodología descrita en el apartado 5.2.1. A los grupos caso se les aplicaron refuerzos a las semanas 7, 14 y 21 días después de la primera inoculación. La tabla 2 muestra el número de ratonas y el tiempo en el que fueron sacrificadas. Los estudios realizados fueron: 1) reactividad contra fosfolípidos en sueros, 2) cuantificación de citocinas en suero, 3) Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) en plasma, 4) estimación plaquetaria, y 5) análisis de los productos en busca de resorción fetal (manifestación



equivalente en el humano a la pérdida fetal y abortos espontáneos; descrita por Yodfat y cols. 1996).

Toma de muestras			
Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
2 ratonas	2 PBS	3 PBS	3 PBS
2 ratonas	3 control	3 control	3 Control
	3 fago	3 Fago	3 fago
	5 C3	5 C3	5 C3
	5 C8	5 C8	5 C8

Tabla 2. Toma y tamaño de la muestra de los diferentes grupos, día 0, 7, 14 y 21.

5.2.4. Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y estimación plaquetaria.

5.2.4.1. Para el TTPa se usaron 100  $\mu$ L de plasma y para la estimación plaquetaria se realizaron frotis de sangre. Las muestras fueron procesadas en la Unidad de Patología Clínica de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2.5. Determinación de la reactividad de los sueros contra los diferentes antígenos

5.2.5.1. La determinación de la reactividad contra CL, complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la  $\beta_2$ GP-I libre de FL se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.

## 5.2.6. Cuantificación de citocinas.

5.2.6.1. Se cuantificaron las siguientes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, MCP-1, GM-CSF y TNF- $\alpha$  mediante luminometría con un ensayo múltiple (multi-assay; Lincoplex) con las especificaciones establecidas por el fabricante. Brevemente, se bloquearon placas de 96 pozos con fondo de filtro de 0.22  $\mu$ m, con 200  $\mu$ L/pozo de amortiguador de ensayo (multi-assay; Lincoplex) y se incubaron con agitación a 500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se eliminó la solución de bloqueo por filtración con vacío (remoción de 200  $\mu$ L de amortiguador en  $\geq$  5 seg; equivalente a una presión menor a 100 mmHg).

5.2.6.2. Se adicionaron 25  $\mu$ L de amortiguador de ensayo, 25  $\mu$ L de los estándares, 25  $\mu$ L de las muestras y 25  $\mu$ L de suero matriz a los estándares y controles en sus los pozos como se muestra en el tabla 3. Posteriormente, se adicionó 25  $\mu$ L de las perlas recubiertas con los anticuerpos (multi-assay; Lincoplex) y se incubó la placa por 1 h con agitación a 500 rpm a temperatura ambiente (TA).

5.2.6.3. Transcurrido el tiempo se removió el líquido por filtración con vacío y se lavó la placa tres veces con 200  $\mu$ L de amortiguador de lavado (multi-assay; Lincoplex). En cada lavado se eliminó la solución por filtración y al final se adicionó 25  $\mu$ L del anticuerpo de detección (multi-assay; lincoplex) y se incubó la placa 30 min con agitación a 500 rpm a TA. Al cumplirse el tiempo de incubación, se adicionó 25  $\mu$ L de estreptavidina-ficoeritrina y se incubó durante 30 min con agitación a 500 rpm a TA.

5.2.6.4. Finalmente, se realizaron tres lavados como se mencionó anteriormente y se adicionó 100  $\mu$ L de amortiguador de detección (multi-assay; Lincoplex). Se incubó la placa 10 min y se leyó en el equipo de luminometría (Luminex200; Luminex corp. USA).

Placa #	Identificación de la placa	Amort. ensayo	Cubrir, agitar e incubar 10 min a TA remover el amortiguador de ensayo por vacío					Amort. ensayo	Cubrir, agitar e incubar 1 hora a TA. Lavar 2 veces con 200 uL de amortiguador de lavado					Ac de detección	Cubrir, agitar e incubar 30 min. a TA					SA-PE	Cubrir, agitar e incubar 30 min. a TA. Lavar 2 veces con 200 uL de buffer de lavado					Amort. de detección					
1A	0 pg/ml Estándar (Fondo)	200 uL	25 uL	-	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	100 uL	
1B	3.2 pg/ml Estándar	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
1C	10 pg/ml Estándar	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
1D	80 pg/ml Estándar	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
1E	400 pg/ml Estándar	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
1F	2000 pg/ml Estándar	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
1G	10,000 pg/ml Estándar	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
1H	Control I	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
2A	Control II	-	-	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
2B	Muestra	25 uL	25 uL	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	
2C	Muestra	25 uL	25 uL	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL
2D	Muestra	25 uL	25 uL	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL
2E	Muestra	25 uL	25 uL	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL
Muestra Final	Muestra	25 uL	25 uL	25 uL	-	-	-	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL	25 uL

Tabla 3. Ensayo del método para IncoPLEX de citocinas de ratón. Ac= anticuerpo; y SA-PE= estreptavidina-ficoeritrina.

## 6. Resultados

### 6.1. Caracterización inmunoquímica

#### 6.1.1. Reactividad de las clonas

De la genoteca se purificaron dos clonas que previamente fueron seleccionadas por bioselección con  $\beta_2$ GP-I, las clonas se denominaron C3 y C8. Ambas clonas se purificaron mediante precipitación con polietilenglicol/NaCl y se determinó su reactividad por ELISA contra: cardiolípidina (CL) libre de  $\beta_2$ GP-I, complejo CL-  $\beta_2$ GP-I y  $\beta_2$ GP-I libre de FLs. Se utilizó como control positivo (CP) suero de paciente con alta reactividad a los diferentes antígenos, y el control negativo (CN) se utilizó fago-anticuerpo que no reacciona contra los antígenos predeterminados, así como medio de cultivo 2x YT (ver figura 7). Como se puede observar en la tabla 4 la clona C3 presentó el doble de reactividad contra los tres antígenos comparada con la clona C8:  $2.2495 \pm 0.09$  vs  $1.3542 \pm 0.13$  para  $\beta_2$ GP-I,  $1.181 \pm 0.07$  vs  $0.4526 \pm 0.04$  para CL- $\beta_2$ GP-I y  $0.5389 \pm 0.06$  vs  $0.281 \pm 0.04$  para CL.

	$\beta_2$ GP-I*	CL- $\beta_2$ GP-I*	CL*
CP	$3.0435 \pm 0.06$	$2.6020 \pm 0.05$	$1.138 \pm 0.06$
CN	$0.0436 \pm 0.01$	$0.0456 \pm 0.02$	$0.0172 \pm 0.01$
Medio	$0.0056 \pm 0.01$	$0.0534 \pm 0.12$	$0.00685 \pm 0.01$
C3	$2.2495 \pm 0.09$	$1.181 \pm 0.07$	$0.5389 \pm 0.06$
C8	$1.3542 \pm 0.13$	$0.4526 \pm 0.04$	$0.281 \pm 0.04$

Tabla 4. Reactividad de las clonas C3 y C8 contra  $\beta_2$ GP-I, el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la CL.  
\*Los resultados están expresados en densidades ópticas (DO) a 450 nm

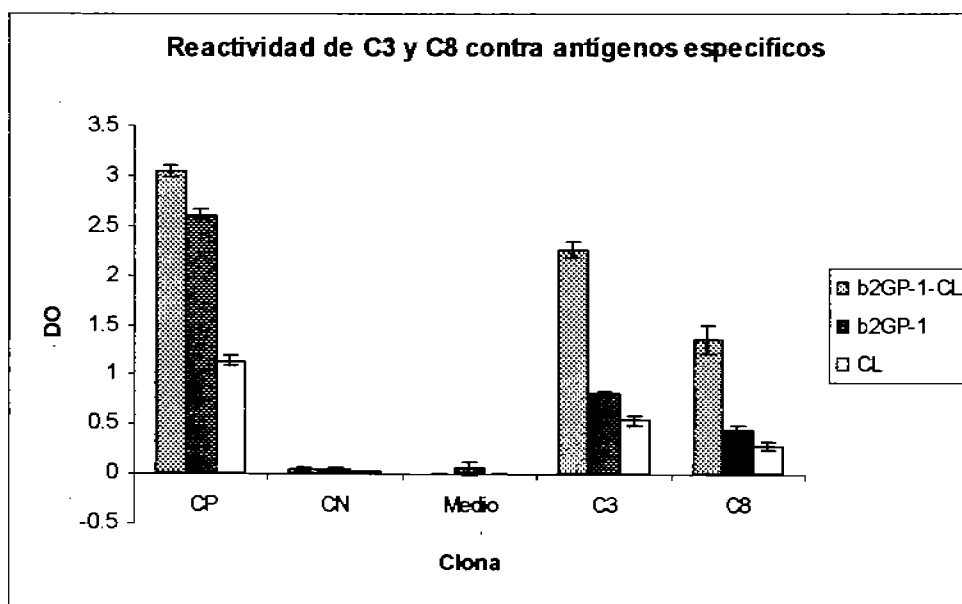


Figura 7. Reactividad de las clonas C3 y C8 contra la  $\beta_2$ GP-I (barras guinda), el complejo CL-  $\beta_2$ GP-I (barras azules) y CL (barras blancas), datos de la tabla 4

#### 6.1.2. Ensayos de reactividad contra diferentes FL

En los ensayos de reactividad contra diferentes fosfolípidos ambas clonas mostraron alta reactividad contra FTG y FTS (ver figura 8), en ambos casos la reactividad fue mayor con la clona C3 comparada con la clona C8 de  $1.914 \pm 0.18$  vs  $1.1875 \pm 0.20$  para FTG y de  $2.2995 \pm 0.12$  vs  $1.5325 \pm 0.04$  para FTS. Además, la clona C3 mostró mediana reactividad contra FTE comparada con la clona C8 y los controles (ver tabla 5). Para la EM no se encontró reactividad para ambas clonas.

	FTE	FTG	EM	FTS
Medio	$0.1425 \pm 0.04$	$0.1625 \pm 0.05$	$0.0695 \pm 0.01$	$0.204 \pm 0.04$
C8	$0.255 \pm 0.03$	$1.1875 \pm 0.20$	$0.1305 \pm 0.08$	$1.5325 \pm 0.04$
C3	$0.756 \pm 0.21$	$1.9135 \pm 0.18$	$0.067 \pm 0.01$	$2.2995 \pm 0.12$
CN	$0.121 \pm 0.03$	$0.163 \pm 0.02$	$0.1015 \pm 0.04$	$0.123 \pm 0.01$

Tabla 5. Reactividad de las dos clonas contra diferentes fosfolípidos. Resultados reportados en OD a 450 nm. FTE= fosfatidiletanolamina; FTG=fosfatidilglicerol; EM=esfingomielina; y FTS=fosfatidilserina.

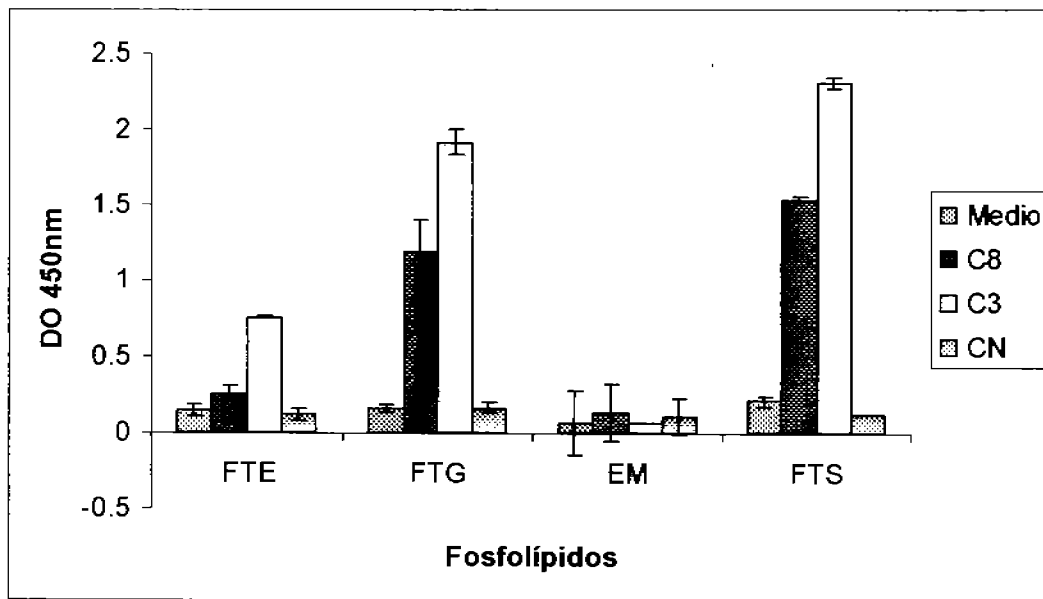


Figura 8 Reactividad de las clonas C3 y C8 contra los fosfolípidos, datos de la tabla 5: FTE= fosfatidiletanolamina; FTG= fosfatidilglicerol; EM= esfingomiolina; y FTS =fosfatidilserina.

### 6.1.3. Curvas dosis-respuesta

Para los ensayos de dosis-respuesta contra los diferentes antígenos, se probaron distintas concentraciones de fago-anticuerpos ( $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{10}$ ) de las dos clonas y los resultados se muestran en la tabla 6. Se observó en ambas clonas una curva dosis-respuesta contra los tres antígenos (ver figura 9)

Clona C3

# fago	CL- $\beta_2$ GP-I*	$\beta_2$ GP-I*	CL*
$1 \times 10^{10}$	$2.2560 \pm 0.16$	$1.4095 \pm 0.06$	$0.627 \pm 0.08$
$1 \times 10^9$	$1.7185 \pm 0.09$	$0.806 \pm 0.07$	$0.377 \pm 0.03$
$1 \times 10^8$	$1.127 \pm 0.17$	$0.2425 \pm 0.06$	$0.1785 \pm 0.03$
$1 \times 10^7$	$0.4259 \pm 0.01$	$0.0955 \pm 0.04$	$0.1600 \pm 0.07$

Clona C8

# fago	CL- $\beta_2$ GP-I*	$\beta_2$ GP-I*	CL*
$1 \times 10^{10}$	$1.0091 \pm 0.01$	$0.5145 \pm 0.04$	$0.303 \pm 0.02$
$1 \times 10^9$	$0.5125 \pm 0.09$	$0.3135 \pm 0.04$	$0.234 \pm 0.04$
$1 \times 10^8$	$0.2155 \pm 0.05$	$0.1935 \pm 0.01$	$0.1370 \pm 0.01$
$1 \times 10^7$	$0.1590 \pm 0.06$	$0.1120 \pm 0.02$	$0.0570 \pm 0.06$

Tabla 6 Curva dosis-respuesta para las clonas C3 y C8 contra los diferentes antígenos.

\*Resultados reportados en DO a 450 nm

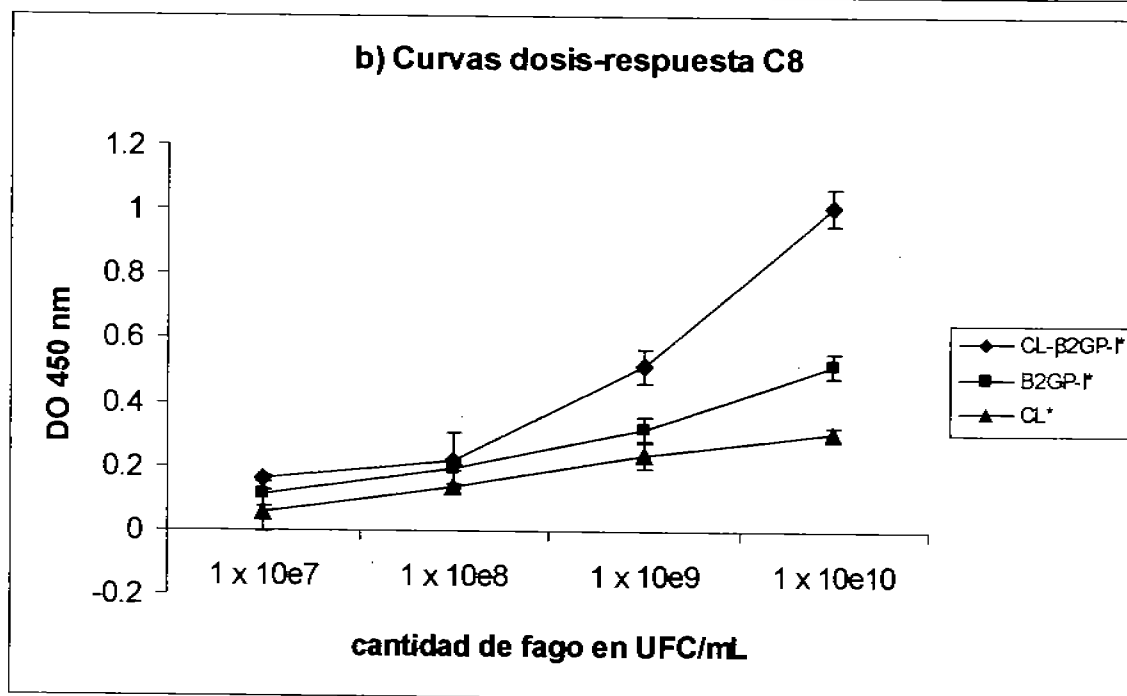
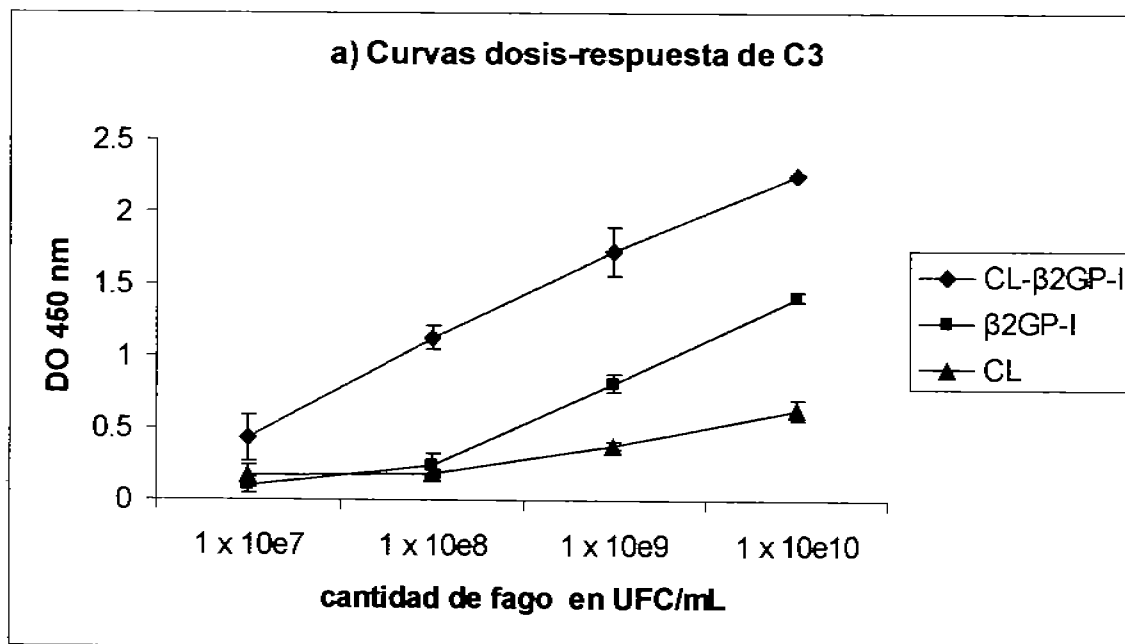


Fig 9 Curvas dosis-repuesta para ambas clonas contra  $\beta_2$ GP-I (10ug/mL), CL- $\beta_2$ GP-I (10ug/mL de  $\beta_2$ GP-1 y 50 ug/mL de CL) y CL (50 ug/mL), datos de la tabla 6: a) curva para la clona C3 y b) curva para la clona C8.

#### 6.1.4. Ensayos de adsorción en placa sensibilizada con el complejo cardiolipina (CL)- $\beta_2$ GP-I

En los ensayos de adsorción la concentración de la CL (0.5 mg/mL), del complejo CL- $\beta_2$ GP-I (0.5 mg/mL de CL y 25  $\mu$ g/mL de  $\beta_2$ GP-I) se mantuvo constantes y únicamente se varió la concentración de los fago-anticuerpos de ambas clonas, partiendo de una concentración inicial de  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL. Mientras que el ensayo de inhibición con  $\beta_2$ GP-I se mantuvo constante la concentración de ambas clonas ( $1 \times 10^{10}$  UFC/mL) y se varió la concentración de antígeno ( $\beta_2$ GP-I: 25  $\mu$ g/mL; 12.5  $\mu$ g/mL; 6.25  $\mu$ g/mL; 3.125  $\mu$ g/mL). Los resultados se reportaron en % de inhibición. En la tabla 7 se muestra el porcentaje de absorción en distintas rondas medidas en placa sensibilizada con el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, como se puede observar solo la clona C3 mostró una adsorción mayor hacia los liposomas de CL que la clona C8 en la segunda ronda (91% vs 67% respectivamente), mientras que en las demás rondas y contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I (en todas las rondas) no se observan grandes diferencias (ver figura 10). Mientras que para ambas clonas se observó una mayor adsorción para el complejo CL- $\beta_2$ GP-I comparada con la adsorción con CL en la primera ronda (59.4% vs 38.1% para C3 y 60.4% vs 25.3%) mientras en las demás rondas no se observaron grandes diferencias.

	C3*		C8*	
	B2GP-1-CL	CL	B2GPI-CL	CL
1	0	0	0	0
2	59.4	38.1	60.4	25.3
3	86.8	91.7	79.6	67.8
4	94.8	97.9	95.1	98.8

Tabla 7. Adsorción de las clonas C3 y C8 con liposomas de CL y liposomas del complejo CL- $\beta_2$ GPI

\*Resultados reportados en % de absorción



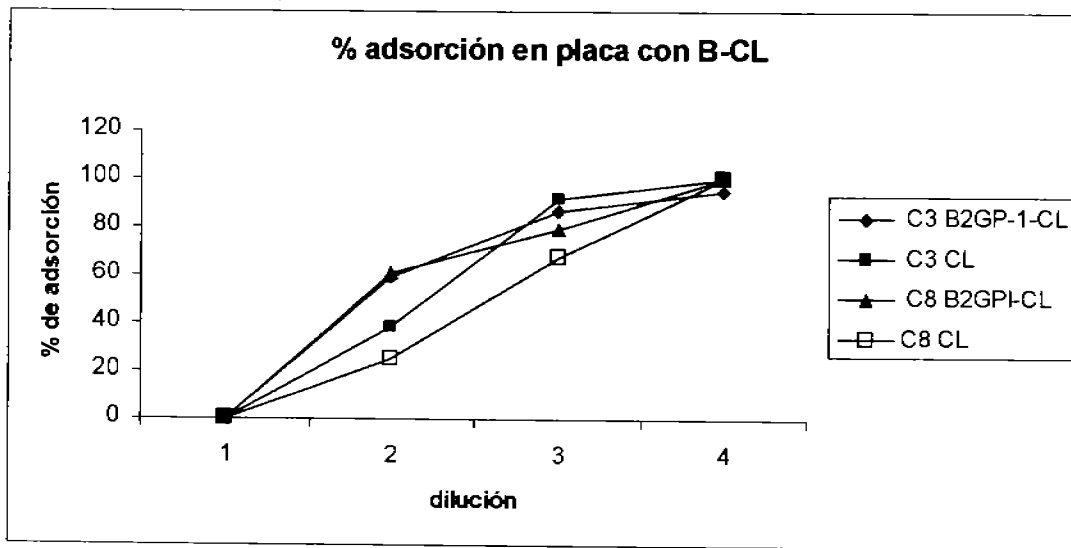


Figura 10 Curvas de adsorción de la clona C3 y C8 con liposomas de CL y liposomas del complejo CL- $\beta_2$ GP-I en placa sensibilizada con el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, datos de la tabla 7

#### 6.1.5. Ensayos de adsorción en placa sensibilizada con CL

También se realizaron ensayos de adsorción de la clona C3 y C8 contra la CL y el complejo CL- $\beta_2$ GP-I (utilizándose a la misma concentración para ambos como en el ensayo anterior) y el remanente de la solución se midió en placa sensibilizada con CL. Los resultados se reportaron en % de adsorción (ver figura 11). Los resultados muestran un mayor % de adsorción en la primera ronda de la clona C3 contra la CL con respecto a la clona C8 (59.1% vs 20% respectivamente), aunque ya en la segunda ronda los resultados no varían demasiado (ver tabla 8). Para el caso del % de adsorción con el complejo CL- $\beta_2$ GP-I se observó una mayor adsorción en la clona C8 de 51% comparada a la clona C3 de 35.8% en la primera ronda y la adsorción se mantiene más elevada para la clona C8 (68%) que la clona C3 (47.86%). Mientras que se observa en la clona C3 en la primera ronda hay una mayor adsorción hacia los liposomas de CL (59.1%) que contra el liposoma del complejo CL- $\beta_2$ GP-I (35.8%) y la adsorción incrementa en la misma proporción en la segunda ronda (87.3% vs 47.8%, respectivamente). Para el caso de la clona C8 se observa que la adsorción a el

complejo CL- $\beta_2$ GP-I es mucho mayor a la CL en la primera ronda (51% vs 20%, respectivamente), mientras que en la segunda no se observaron grandes diferencias.

Rondas	C3		C8	
	B2GPI-CL*	CL*	B2GPI-CL*	CL*
1	0	0	0	0
2	35.8	59.1	51	20
3	47.9	87.3	68	74.7
4	95.9	93.9	98.3	100

Tabla 8. Porcentaje de adsorción de la clona C3 y C8 contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la CL en placa sensibilizada con CL.

\*Datos reportados en porcentaje

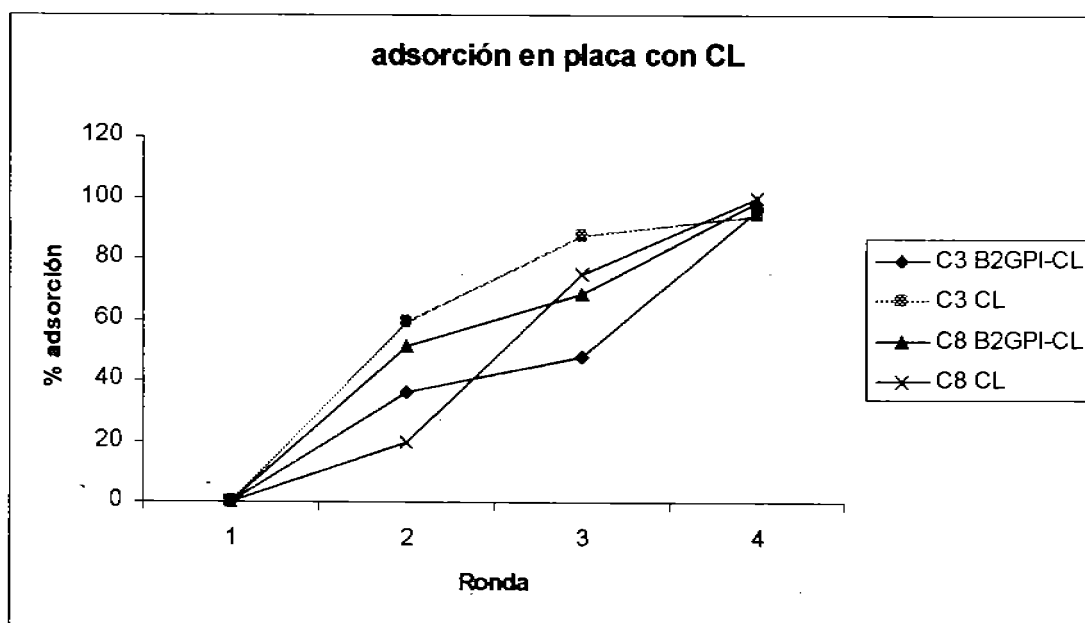


Fig. 11. Curva de adsorción de la clona C3 y C8 contra CL y el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, el remanente fue medido en placa sensibilizada con CL, datos de la tabla 8.

### 6.1.6. Ensayos de adsorción en placa sensibilizada con $\beta_2$ GP-I

Para los ensayos de adsorción de la clona C3 y C8 con CL y CL- $\beta_2$ GP-I en placa sensibilizada. La detección de la actividad remanente se hizo en placas sensibilizada con  $\beta_2$ GP-I libre de CL (ver figura 12). En la tabla 9 se puede observar una mayor adsorción en la clona C3 tanto para CL como para el complejo CL- $\beta_2$ GP-I comparado con la clona C8 tanto en la primera como en la segunda ronda (46.4% y 46.1% vs 35.6% y 34.9% en la primera ronda y 71.3% y 76% vs 58.6% y 62.4% en la segunda ronda), mientras que en la cuarta ronda solo la clona C8 presento la adsorción más baja (70.2%) comparada tanto con la absorción en CL (C8) como con la absorción de CL y CL- $\beta_2$ GP-I de la clona C3. Los resultados comparados de CL y del complejo CL- $\beta_2$ GP-I no muestran diferencias intraclonas.

Ronda	C3*		C8*	
	B2GPI-CL	CL	B2GPI-CL	CL
1	0	0	0	0
2	46.4	46.1	35.6	34.9
3	71.3	76	58.6	62.4
4	100	93.7	70.2	90.6

Tabla 9. Adsorción de las clonas C3 y C8 contra CL y el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, en placas sensibilizadas con  $\beta_2$ GP-I.\* Resultados reportados en % de absorción.

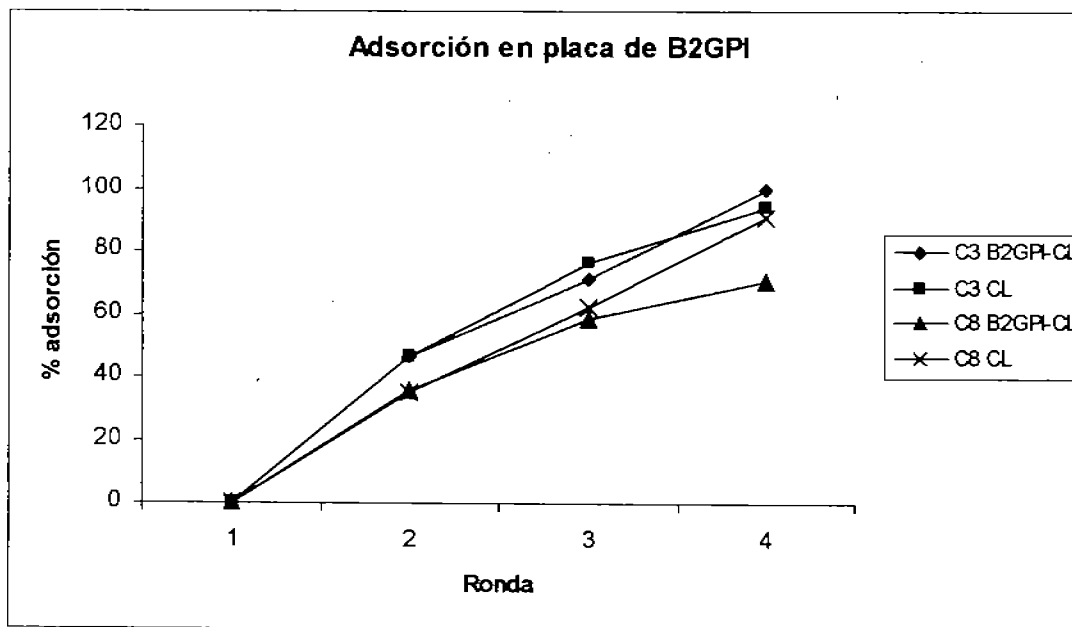


Fig 12. Curva de adsorción de las clonas C3 y C8 contra CL y el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, el remanente fue determinado en placas sensibilizadas con  $\beta_2$ GP-I, datos de la tabla 9

#### 6.1.7. Ensayos de inhibición con $\beta_2$ GP-I

Con respecto a los ensayos de inhibición con  $\beta_2$ GP-I, se varió la concentración de la  $\beta_2$ GP-I y se mantuvo constante la concentración de los fago-anticuerpos, la actividad remanente se detectó en placas sensibilizadas con CL- $\beta_2$ GP-I, en placas con CL y en placas con  $\beta_2$ GP-I (ver figura 13). Para la clona C3 no se observó una inhibición dosis-respuesta, pero la inhibición se mantiene constante a las diferentes concentraciones y con los diferentes antígenos (~ 50% de inhibición). Mientras que para la clona C8 se observa una curva dosis respuesta tanto en placa sensibilizada con  $\beta_2$ GP-I como en placa con CL, además la  $\beta_2$ GP-I fue capaz de inhibir la unión a CL con más fuerza a una concentración de 25  $\mu$ g/mL (67.2%), comparada con las placas sensibilizadas con  $\beta_2$ GP-I y CL- $\beta_2$ GP-I (22.7% , 33.8% respectivamente) (ver tabla 10).

Mg/mL	C3		C8				CN
	B2GPI-CL	CL	B2GPI	B2GPI-CL	B2GPI	CL	
25	43.9	42.3	49.9	33.8	22.7	67.2	6.8
12.5	41.3	48	49.2	54.3	23.9	56.6	6.3
6.25	50.1	33	45.4	27.28	12.2	46.7	5.5
3.125	36.9	41.3	37.5	34.3	10.65	24.7	6.2

Tabla 10. Porcentaje de inhibición para ambas clonas con la  $\beta_2$ GP-I contra CL, el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la  $\beta_2$ GP-I.

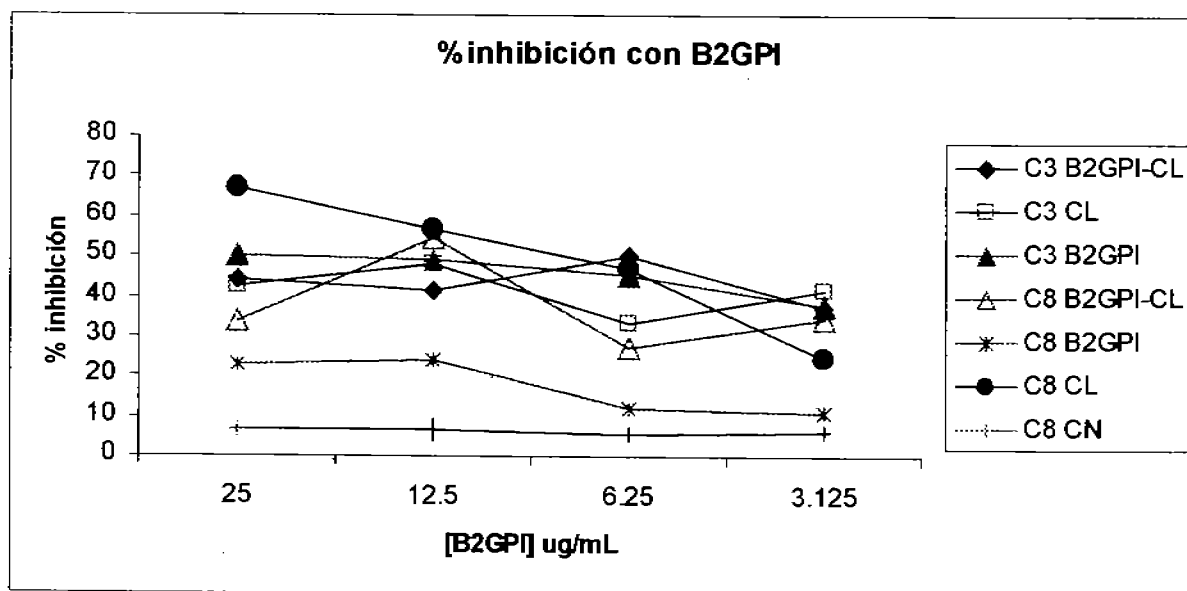


Figura 13. Curva de inhibición de las clonas C3 y C8 con  $\beta_2$ GP-I, en placas sensibilizadas con CL, el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y la  $\beta_2$ GP-I, datos de la tabla 10.

## 6.2. Modelo murino

### 6.2.1. Ajuste del inóculo de fago anticuerpo

El ajuste del inóculo de fago anticuerpo en las ratonas (ver figura 14). Mostró que la concentración de  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL es la más adecuada ya que en ella se da la mayor reactividad de los sueros contra el fago M13KO7 para ambas clonas:  $0.675 \pm 0.22$  DO para C3 y  $0.611 \pm 0.14$  DO para C8 (ver tabla 11). También se observó una alta reactividad a esa concentración contra  $\beta_2$ GP-I tanto para C3 como C8 ( $0.666 \pm 0.09$  DO y  $1.221 \pm 0.52$  DO respectivamente). Mientras que para la CL en ambas clonas

encontró más reactividad a una concentración de  $1 \times 10^{11}$  ( $0.361 \pm 0.19$  OD para C3 y  $0.336 \pm 0.10$  DO para C8). En el caso de la reactividad contra el complejo CL- $\beta_2$ GPI, la clona C3 mostró alta reactividad a la concentración de  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL ( $0.461 \pm 0.17$  DO) y la clona C8 mostró la mayor reactividad a una concentración de  $1 \times 10^{11}$  UFC/mL ( $0.404 \pm 0.07$  DO).

$1 \times 10^{10}$ UFC/mL	$\beta_2$ GPI*	CL*	CL- $\beta_2$ GPI*	M13*
Control	$0.1545 \pm 0.03$	$0.117 \pm 0.02$	$0.145 \pm 0.02$	$0.206 \pm 0.06$
P1 (0.1)	$0.1876 \pm 0.06$	$0.1156 \pm 0.06$	$0.162 \pm 0.07$	$0.454 \pm 0.18$
C3 (0.1)	$0.2584 \pm 0.06$	$0.31 \pm 0.05$	$0.131 \pm 0.02$	$0.155 \pm 0.05$
C3 (1)	$0.666 \pm 0.10$	$0.2875 \pm 0.08$	$0.461 \pm 0.17$	$0.675 \pm 0.22$
C3 (10)	$0.6128 \pm 0.014$	$0.361 \pm 0.19$	$0.25 \pm 0.11$	$0.47 \pm 0.07$
C8 (0.1)	$0.294 \pm 0.11$	$0.125 \pm 0.02$	$0.171 \pm 0.06$	$0.357 \pm 0.12$
C8 (1)	$1.221 \pm 0.52$	$0.306 \pm 0.04$	$0.221 \pm 0.01$	$0.611 \pm 0.14$
C8 (10)	$0.631 \pm 0.06$	$0.316 \pm 0.09$	$0.404 \pm 0.07$	$0.53 \pm 0.17$

Tabla 11. Promedio de la reactividad de los sueros de ratonas inmunización con diferentes concentraciones de fago-anticuerpo. \*Resultados reportados en DO a 450 nm

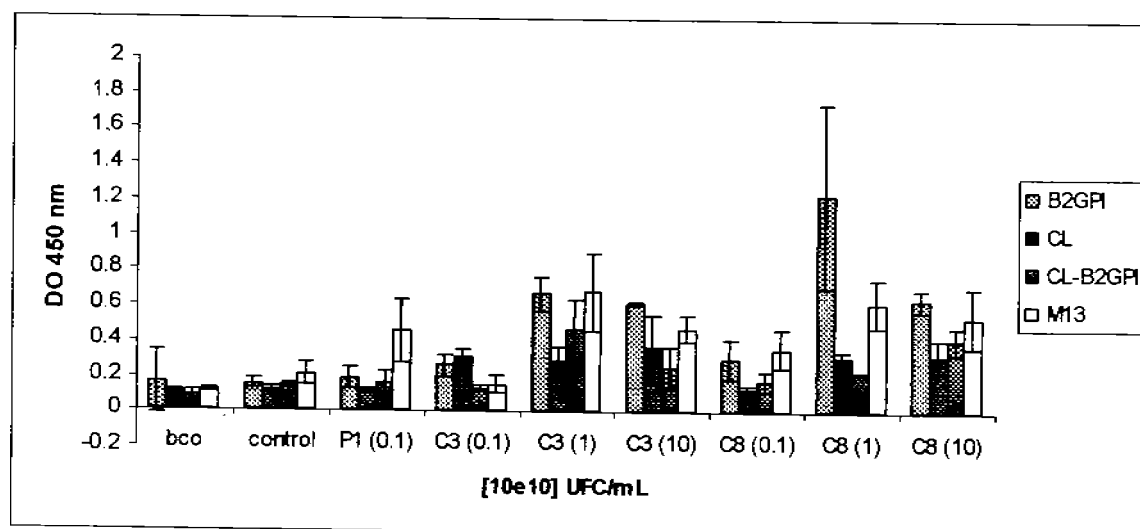


Fig 14. Reactividad de los sueros de las ratonas inmunizadas a diferentes concentraciones de la clonas C3 y C8. Contra  $\beta_2$ GPI, CL y CL- $\beta_2$ GPI, datos de la tabla 11.

## 6.2.2. Inducción del SaF en el modelo murino.

### 6.2.2.1. Reactividad de los sueros contra la $\beta_2$ GP-I

Para conocer la capacidad del fago-anticuerpo en desarrollar las manifestaciones del SaF y una vez ajustada la concentración del inóculo, se inmunizó a las ratonas en el día cero de embarazo (día en que se juntaron los machos con las hembras). La concentración de los fago-anticuerpos fue de  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL. En la fig. 15 se muestra la reactividad de los sueros contra la  $\beta_2$ GP-I. Se observa que los sueros de los ratones no presentaron diferencias en la reactividad interclonas en el mismo día de la toma de muestras. Pero se muestra una tendencia de disminución de la reactividad intraclona en los distintos días de tomada la muestra (ver tabla 12).

	Día			
	0	7	14	21
C		$0.3067 \pm 0.09$	$0.3203 \pm 0.09$	$0.257 \pm 0.03$
P		$0.421 \pm 18$	$0.3515 \pm 0.16$	$0.2725 \pm 0.02$
F	$0.357 \pm 0.095$	$0.543 \pm 0.01$	$0.445 \pm 0.12$	$0.2835 \pm 0.05$
C3		$0.4668 \pm 0.07$	$0.4672 \pm 0.09$	$0.3528 \pm 0.04$
C8		$0.4723 \pm 0.11$	$0.3384 \pm 0.72$	$0.1466 \pm 0.11$

Tabla 12. Promedio de la reactividad de los sueros contra la  $\beta_2$ GP-I en dos diferentes días de toma de muestra. Los datos se reportaron en DO a 450nm.

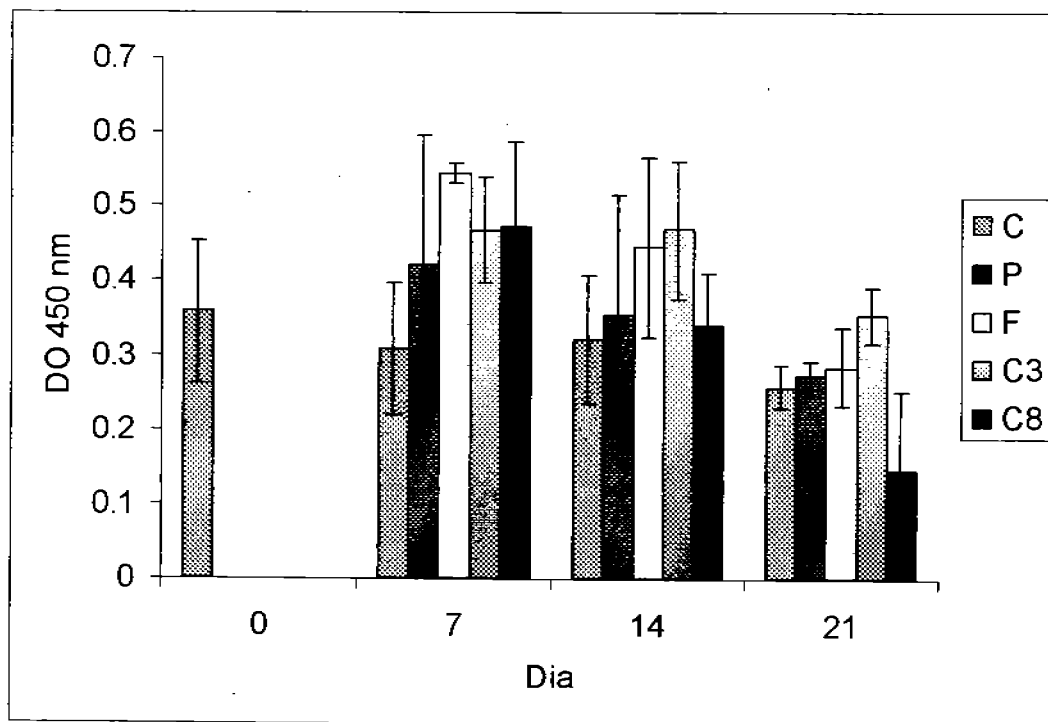


Fig.15 Reactividad de los sueros contra la  $\beta_2$ GP-I, en los diferentes días de la toma de muestra, datos de la tabla 12; C= control; P= PBS; F= Fago; C3= clona C3; y C8=clona C8.

#### 6.2.2.2. Reactividad contra CL- $\beta_2$ GP-I

En el caso de la reactividad de los sueros contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, no se observaron cambios (ver figura 16) y la reactividad se mantuvo constante en las diferentes tomas de muestra (ver tabla 13) y con los diferentes grupos de inmunización.

	Día			
	0	14	21	23
C		0.1853 ± 0.01	0.186 ± 0.01	0.183 ± 0.01
P	0.175 ± 0.0288	0.201 ± 0.01	0.213 ± 0.01	0.2355 ± 0.01
F		0.1923 ± 0.01	0.199 ± 0.02	0.2068 ± 0.01
C3		0.2108 ± 0.01	0.2132 ± 0.02	0.2477 ± 0.06
C8		0.2045 ± 0.03	0.2138 ± 0.02	0.2358 ± 0.02

Tabla 13. Promedio de la reactividad de los sueros contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, en los diferentes días de la toma de muestras. Resultados reportados en DO a 450 nm. C= Control; P= PBS; F= fago irrelevante; C3= clona C3; y C8: clona C8.



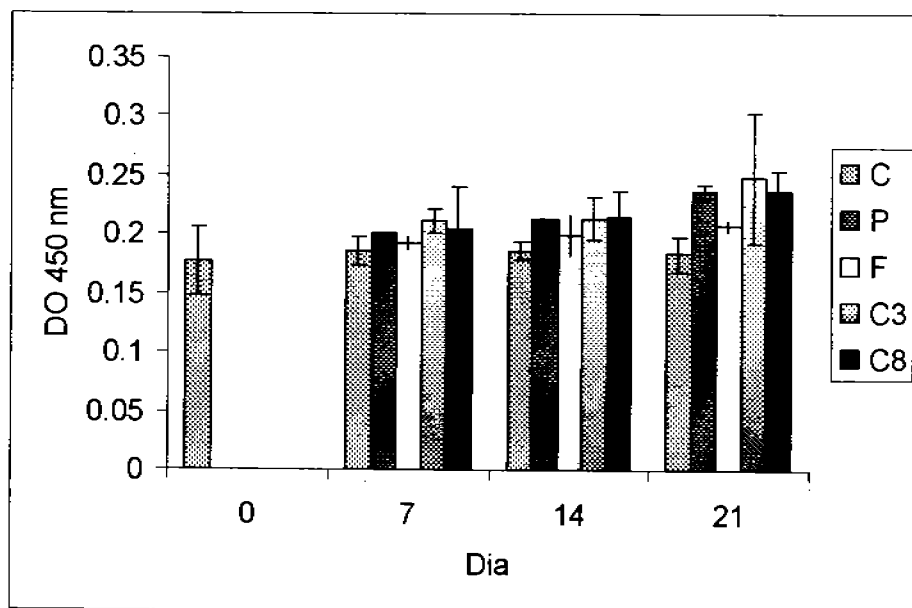


Fig. 16 Reactividad de los sueros de los diferentes grupos de ratonas en placas sensibilizadas con el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, datos de la tabla 13, DO a 450 nm. C= Control; P= PBS; F= Fago irrelevante; C3= clona C3; y C8= clona C8.

#### 6.2.2.3. Reactividad contra CL

Para la reactividad contra la CL (ver figura 17) los sueros de las ratonas inoculados con las diferentes clonas no mostraron cambios a los días 7 y 14 después de la inoculación. No así el día 21 donde los sueros de las ratonas de C3 ( $0.5843 \pm 0.69$ ) y C8 ( $0.3634 \pm 0.06$ ) si presentaron un incremento con respecto a los controles tanto de PBS como del fago irrelevante ( $0.2345 \pm 0.07$  y  $0.2808 \pm 0.06$  respectivamente) (ver tabla 14).

	Día			
	0	7	14	21
C		$0.2183 \pm 0.04$	$0.1943 \pm 0.01$	$0.1565 \pm 0.025$
P	$0.2485 \pm 0.0319$	$0.2495 \pm 0.012$	$0.191 \pm 0.20$	$0.2345 \pm 0.07$
F		$0.2185 \pm 0.01$	$0.212 \pm 0.03$	$0.2808 \pm 0.07$
C3		$0.2555 \pm 0.03$	$0.2656 \pm 0.07$	$0.5843 \pm 0.69$
C8		$0.2345 \pm 0.03$	$0.2984 \pm 0.07$	$0.3634 \pm 0.06$

Tabla 14. Promedio de la reactividad de los sueros de los ratones inoculados con las diferentes clonas. Los datos se reportaron en DO a 450 nm. C= control; P= PBS; F= fago irrelevante; C3= clona C3; y C8= clona C8.

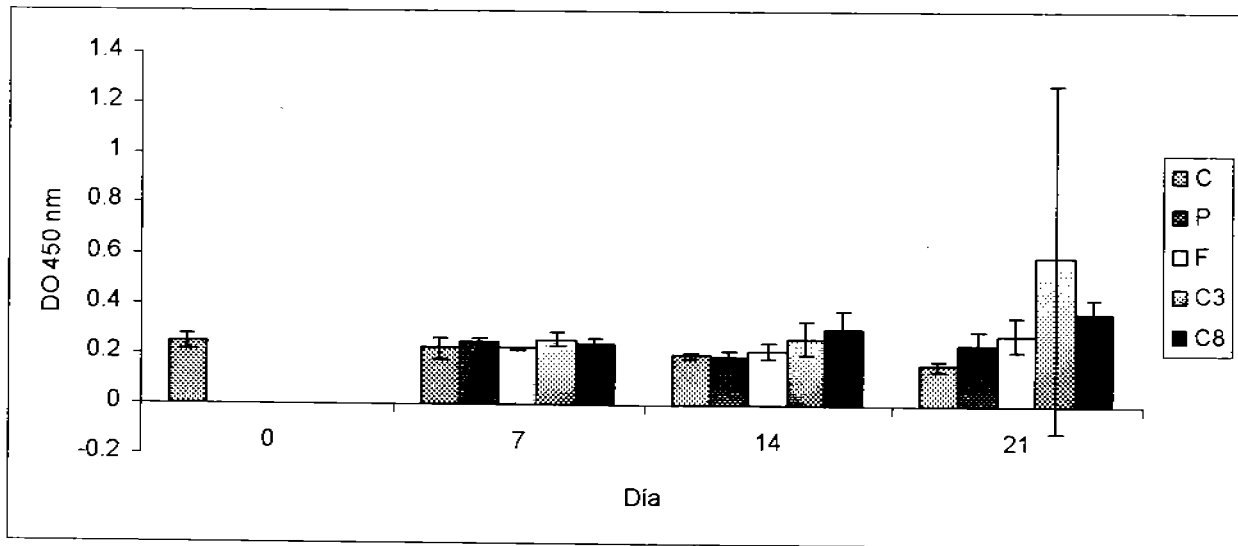


Fig 17. Reactividad de los diferentes sueros contra CL a diferentes días de la toma de muestras, datos de la tabla 14. C= control; P= PBS; F= Fago irrelevante; C3= clona C3 y C8= clona C8.

#### 6.2.2.4. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

Para determinar la actividad de anticoagulante lúpico, se utilizó muestras de plasma y se determinó el TTPa para cada muestra en diferente día (ver figura 18). En la tabla 15 se presentan los resultados en segundos y como se puede observar en el día 7 hay un incremento del TTPa para los plasmas de los ratones inmunizados con la clona del fago irrelevante ( $45.05 \pm 7.6$  s), C3 ( $41.82 \pm 9.1$  s) y C8 ( $60.6 \pm 8.8$  s) comparada al control ( $8.5 \pm 2.4$  s) y PBS ( $17.9$  s), en el día catorce los plasmas de la clona del Fago ( $34.6 \pm 6.3$  s) y C3 ( $34.6 \pm 13.2$  s) presentaron disminución, mientras que los plasmas de las clonas de PBS ( $61.8$  s) y control ( $68.2$  s) aumentaron. En el día 21 se observó disminución del TTPa para los plasmas de la clona de PBS ( $18.7$  s), control ( $47.7 \pm 19.8$ ), y se incrementó los plasmas de fago irrelevante ( $51.7$  s), C3 ( $87.1 \pm 64.6$ ), en tanto que las muestras de la clona C8 no presentaron coagulación en un 100%

	Día		
	7*	14*	21*
P	17.90 ± 0.000	61.80 ± 0.0000	18.70 ± 0.0000
C	8.50 ± 2.4	68.20 ± 0.0000	47.75 ± 19.87
F	45.06 ± 7.55	34.60 ± 6.31	51.70 ± 0.0000
C8	60.60 ± 8.79	60.43 ± 15.91	NC
C3	41.82 ± 9.14	34.60 ± 13.22	87.1 ± 64.63

Tabla 15. Tiempo de Tromboplastina parcial activada, de las muestras de plasma de los diferentes grupos de ratonas. P= PBS, C= control, F= fago irrelevante, C3= clona C3, C8= clona C8 y NC= No coaguló.

\*Tiempo reportado en segundos

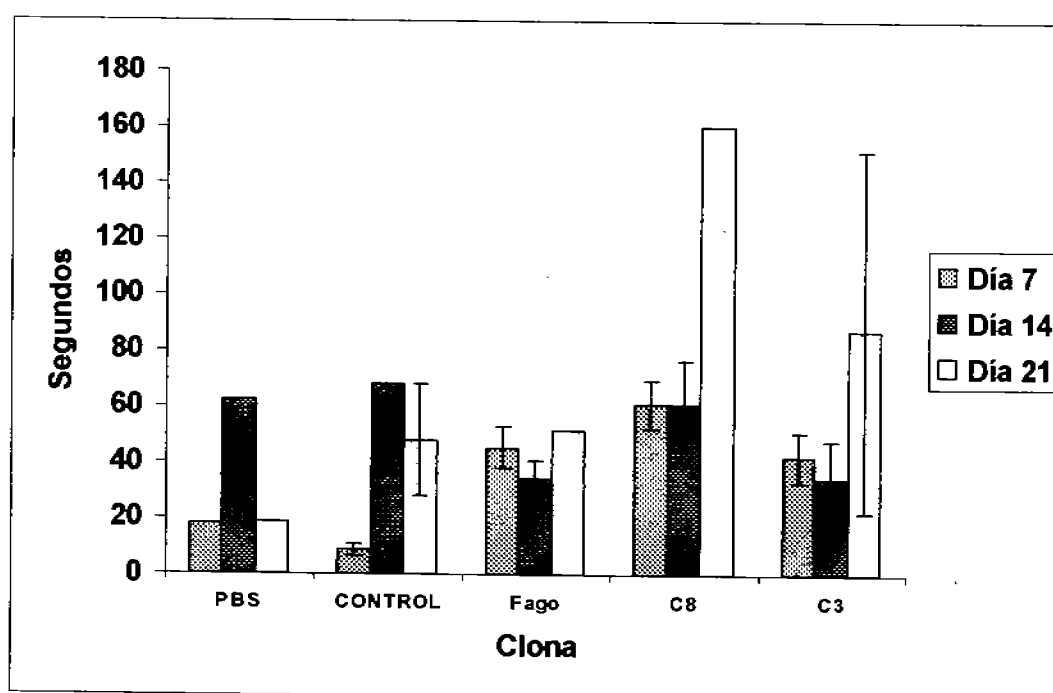


Fig. 18. Tiempo de tromboplastina parcial activada a los diferentes días de la toma de muestras, datos de la tabla 15.

#### 6.2.2.5. Estimación plaquetaria

En la figura 19 se muestran los resultados del conteo de plaquetas de los diferentes grupos a distintos días. Al día 7 de inoculación se observa una disminución en el número de plaquetas de las ratonas inmunizada con PBS ( $328 \pm 52.3 \times 10^9/L$ ), Fago irrelevante ( $323 \pm 195.3 \times 10^9/L$ ) y la clona C8 ( $248.6 \pm 62 \times 10^9/L$ ). En el día 14

sólo las ratonas inmunizadas con el fago irrelevante presento un decremento mayor ( $296 \pm 96.2 \times 10^9/L$ ) y al día 21 se incremento a  $370.6 \pm 146.1 \times 10^9/L$  (ver tabla 16).

	Día			
	0	7	14	21
C*		$458.3 \pm 79.3$	$446 \pm 66.8$	$443.3 \pm 68$
P*	$453.5 \pm$	$328 \pm 52.3$	$316 \pm 42.4$	$303.5 \pm 14.8$
F*	55.2	$323 \pm 195.3$	$296 \pm 96.2$	$370.6 \pm 146.1$
C3*		$435 \pm 121.7$	$324 \pm 152.7$	$390 \pm 59.4$
C8*		$248.6 \pm 62$	$368.6 \pm 172$	$373 \pm 149.2$

Tabla 16. Estimación plaquetaria en los distintos día de la toma de muestras de las ratonas inmunizadas con las diferentes clonas. C= control; F= fago irrelevante; P= PBS; C3= clona C3; y C8= clona C8  
\*Datos reportados en  $10^9/L$

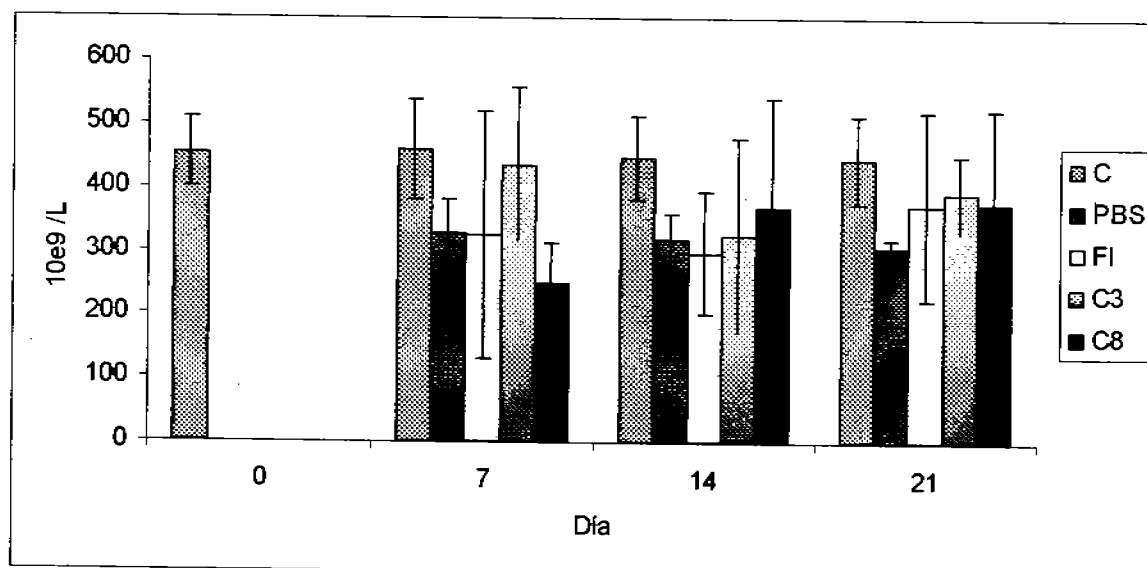


Fig 19. Estimación plaquetaria de las muestra sanguíneas de las ratonas a los diferentes días de la toma de muestra, datos de la tabla 16. C= control; FI= fago irrelevante; C3= clona C3; y C8= clona C8

#### 6.2.2.6. Resorción fetal

Para observar el desarrollo fetal en las ratonas. Se sacrificaron las ratonas a los días 7, 14 y 21. Tanto el día 7 como el 14 no se observaron diferencias en el desarrollo de todos los grupos. Al día 21, se observó que el 20% de las ratonas inmunizadas con

la clona C3 presentaron resorción fetal, mientras que las ratonas de los demás grupos no presentaron alteraciones en el desarrollo fetal (ver figura 20).

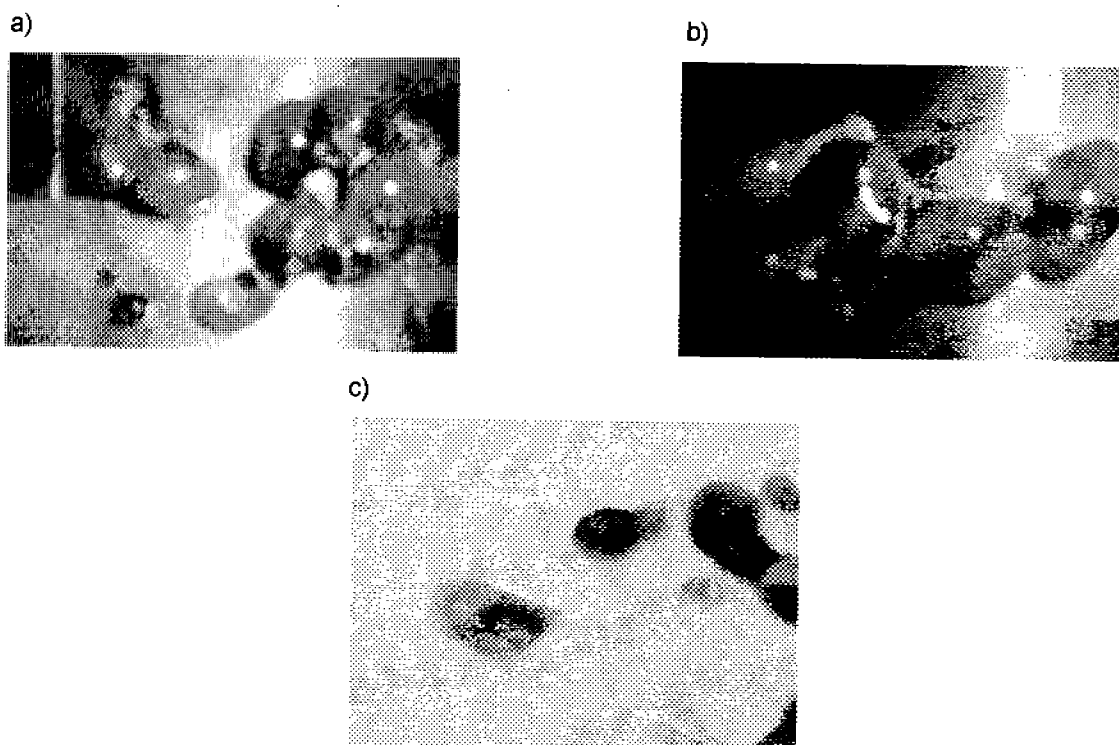


Figura 20. Úteros de ratonas inmunizadas con las diferentes clonas al día 21 para determinar la resorción fetal. a) Útero de ratona control; b) Útero de ratona inmunizada con la clona C8; y c) Útero y embrión de ratona inmunizada con la clona C8.

#### 6.2.2.7. Citocinas

En el perfil de citocinas, se encontró en el día 14 una disminución del GM-CSF en los sueros de las ratonas inoculadas con el fago irrelevante ( $117.1 \pm 154.6$  pg/mL) y presento un leve incremento al día 21 ( $359.5 \pm 142.6$  pg/mL) y para la clona C8 la expresión de GM-CSF se elevó el día 21 ( $1339.3 \pm 219.3$  pg/mL) comparada con el control ( $461.5 \pm 123.3$  pg/mL) al día 21 y con el mismo grupo al día 14 ( $524 \pm 98$  pg/mL). La IL-6 presentó un ligero incremento el los diferentes grupos comparados con el control y al día 21 se incremento en el control comprada con el día 14 ( $80.5 \pm 13.7$  vs  $13.3 \pm 6.1$  pg/mL respectivamente), disminuyo en el caso del grupo con PBS comparado con el día 14 ( $14.82 \pm 7.54$  vs  $45.64 \pm 12.4$  pg/mL respectivamente) y se

incremento en el grupo de la clona C3 al día 21 ( $480.4 \pm 153.2$  pg/mL) comparada con el control del mismo día ( $80.5 \pm 13.7$  pg/mL).

La IL-1 $\beta$  se presentó un aumento al día 14 en la clona inoculada con PBS ( $65.8 \pm 6.7$  pg/mL) y un ligero aumento para el grupo de fago irrelevante ( $39.4 \pm 5.1$  pg/mL) y la clona C8 ( $29.9 \pm 3.5$  pg/mL) comparada con el control ( $15.8 \pm 2.5$  pg/mL). Al día 21 se observó disminución en los grupos de PBS ( $18.3 \pm 7.6$  pg/mL), fago irrelevante ( $16.9 \pm 3.5$  pg/mL) y la clona C3 ( $8.1 \pm 2.5$  pg/mL) comparada con el control ( $39.9 \pm 5.5$  pg/mL). En el caso de la IL-2 se encontró aumentada en el grupo de C3 en el día 14 como en el día 21 comparada con el control al día 14 y 21 ( $26.8 \pm 4.5$ ,  $97.8 \pm 7.5$  vs  $7.2 \pm 2.5$ ,  $23.8 \pm 6.5$  pg/mL respectivamente). Para la MCP-1 se encontró un incremento en la clona C8 al día 14 ( $233.5 \pm 60.6$  pg/mL) comparado con el control ( $105.5 \pm 20.5$  pg/mL) dicho incremento se mantuvo al día 21. En el caso de TNF- $\alpha$  no se observó cambios en el título en el día 14 de todos los grupos, pero sí se observó un incremento al día 23 en la clona C8 comparada con el control en el mismo día ( $23.67 \pm 4.8$  vs  $9.2 \pm 3.3$  pg/mL) (ver tabla 17).

		Clona				
		Control (pg/mL)	PBS (pg/mL)	Fago (pg/mL)	C3 (pg/mL)	C8 (pg/mL)
GM-CSF	Día 14	419.5 $\pm$ 96.03	477.9 $\pm$ 160.02	117.1 $\pm$ 154.6	633.1 $\pm$ 128.5	524 $\pm$ 98
	Día 21	461.5 $\pm$ 123.3	515.9 $\pm$ 90.32	359.5 $\pm$ 142.6	490.9 $\pm$ 153.7	1339.3 $\pm$ 219.3
IL-6	Día 14	13.3 $\pm$ 6.1	45.64 $\pm$ 12.4	46.2 $\pm$ 0.34	52.3 $\pm$ 9.5	51.2 $\pm$ 17.9
	Día 21	80.5 $\pm$ 13.7	14.82 $\pm$ 7.54	79.1 $\pm$ 17.4	480.4 $\pm$ 153.2	54.3 $\pm$ 29.1
IL-1 $\beta$	Día 14	15.8 $\pm$ 2.5	65.8 $\pm$ 6.7	39.4 $\pm$ 5.1	18.7 $\pm$ 5.6	29.9 $\pm$ 3.5
	Día 21	39.9 $\pm$ 5.5	18.3 $\pm$ 7.6	16.9 $\pm$ 3.5	8.1 $\pm$ 2.5	30.4 $\pm$ 5.5
IL-2	Día 14	7.2 $\pm$ 2.5	11.4 $\pm$ 3.3	13.3 $\pm$ 2.9	26.8 $\pm$ 4.5	8.1 $\pm$ 4.1
	Día 21	23.8 $\pm$ 6.5	24.9 $\pm$ 3.9	9.26 $\pm$ 5.9	97.8 $\pm$ 7.5	15.9 $\pm$ 5.1
MCP-1	Día 14	105.5 $\pm$ 20.5	112.8 $\pm$ 47.4	120.3 $\pm$ 14.3	187 $\pm$ 41.8	233.5 $\pm$ 60.6
	Día 21	50.4 $\pm$ 17.5	40.28 $\pm$ 9.4	131.6 $\pm$ 41.3	62.8 $\pm$ 19.8	232.1 $\pm$ 30.6
TNF- $\alpha$	Día 14	20.31 $\pm$ 2.1	13.5 $\pm$ 3.8	13.6 $\pm$ 2.7	15.1 $\pm$ 5.2	13.51 $\pm$ 2.1
	Día 21	9.2 $\pm$ 3.3	6.3 $\pm$ 3.9	10.6 $\pm$ 1.9	6.7 $\pm$ 3.3	23.67 $\pm$ 4.8

Tabla 17. Cuantificación de citocinas en los días 14 y 21 de los diferentes grupos de ratones. Datos reportados en pg/mL

### 6.3. Estudio molecular

Al amplificar las secuencias, ambas secuencias presentaron un tamaño aproximado de 700pb (ver figura 21a) y la digestión con la enzima de restricción *Mva I* mostró que ambas clonas presentan un patrón de digestión similar (ver figura 21b). En ambos casos se observaron una banda de 400pb, una de 320 pb, una de 200pb y una de 100pb.

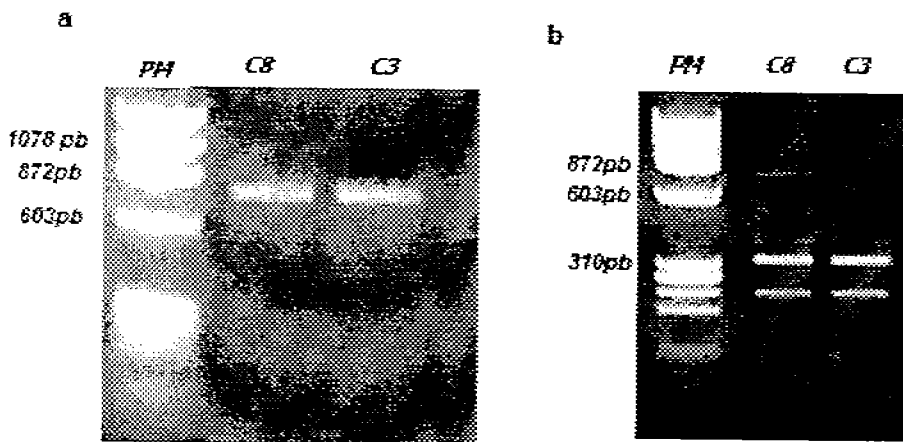


Figura 21 Patrón electroforetico de las clonas C3 y C8. a) Rescate de los fragmentos de ambas clonas y b) patrones de digestión de ambas clonas

Al comparar las secuencias de los re-arreglos de C3 y C8, se encontró una diferencia de 83 pb en la parte 3' a 60pb de la secuencia de re-arreglos VJ (ver figura 22a), dicha secuencia se puede inferir que es codificable (ver figura 22b).

#### a) comparación secuencia de nucleótidos

```

C8      GGT GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT
C3      -----

GGG GCC GCA TAG ACG ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT ACA GAA AAT
--- --- --- --- --- --G AAG TTT GAT GTA -CC TGG T-T -AG --G GTC CC- GGA

TCA TTT ACT AAC GTC TGG AAA GAC GAC AAA CTT TTT AAA ATC
AC- GCC C-C --A ACC CTC -TT T-T --- -GT AG- AGG CG- T-C
    
```

b) comparación secuencia de aminoácidos

```

C8      G A A A E Q K L I S E E D L N G A A D T V E S C L A K P H T E N S
C3      - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
      F T N V W K D D K L F K I
      A P K T L I Y D S S R R F
  
```

Fig 22. Comparación de secuencias de las clonas C3 y C8 en la parte 3'. a) Diferencias en aproximadamente 83pb; b) comparación de secuencias en aminoácidos, predichas por la secuencia de nucleótidos.

Mientras que las secuencias de los re-arreglos obtenidos fueron comparados con la base de datos VBase, no se encontró gen V<sub>H</sub>, el primer fragmento (antes del fragmento unidor) de las clonas C3 y C8 presentaron una homología del 51.5% con la fracción FW1 del gen de línea germinal DPL7/ML1.2 (IGLV1S2)+ (ver figura 23a), las secuencia presenta 32 mutaciones puntuales (ver tabla 18), dichas mutaciones fueron sustitutivas, mientras que en la secuencia de aminoácidos presenta una homología del 18% con el producto del FW1 del gen DPL7/ML1.2 (IGLV1S2)+ (ver figura 23b).

a) secuencia nucleótidos

```

C8      ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC
C3      - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
DPL7/VL1.2 (IGLV1S2)+ CA- TCT GT- --G A-G CAG CC- C-- T-A --G T-T -GG
  
```

```

                                     _____ CDRI
TCC TCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
G-- C-- --- CAG -G- --- --- A-- --- -GC ACT GGG AGC AGC TCC AAC ATC
  
```

```

_____
GGG GCA GGT TAT GAT GTA CAC TGG TAC CAG CAG CTT CCA
  
```



b) secuencia aminoácidos

	1	10	18
C8	T V T V S S G T T V T V S S G T T V		
C3	- - - - -		
DPL7/VL1.2 (IGLV1S2)+	Q S V - T Q P P S - S G A P G Q R -		

Fig. 23. Comparación del primer fragmento con el gen de línea germinal. a) Comparación de secuencias de nucleótidos para las clonas C3 y C8 con el gen de línea germinal DPL7/VL1.2 (IGLV1S2)+; b) Comparación en secuencia de aminoácidos de los productos génicos de las clonas C3 y C8 con el producto del gen de línea germinal DPL7/VL1.2 (IGLV1S2)+.

Clona	1er fragmento	
	C3	C8
Gen	DPL7/VL1.2 (IGLV1S2)+	DPL7/VL1.2 (IGLV1S2)+
Homología	51.5%	51.5%
Mutaciones	32/66	32/66
Mutación S	16	16
Mutación R	2	2

Tabla 18. Características mutacionales del primer fragmento de ambas clonas. S= silenciosa; R= sustitutiva.

El segundo fragmento del re-arreglo (ver figura 24a) de ambas mostró una homología del 94.9% con el gen  $V_L$  de línea germinal de cadena ligera 1b.366F5/DPL5...+ y una homología del 92% con el gen  $J_L$  de línea germinal JL3b (ver figura 24c). Ambas secuencias mostraron 14 mutaciones puntuales de 279 pb, 9 de las 14 mutaciones estuvieron presentes en los CDRs y 5 en los FWs (ver tabla 19), todas las mutaciones presentes fueron sustitutivas. El análisis estadístico mostró que las mutaciones presentes en los CDRs son dirigidas por antígeno ( $p=0.0245$ ) (ver tabla 20), Al evaluar las mutaciones por CDR se encontró que dichas mutaciones tanto del CDR1 como del CDR2 son dirigidas por antígeno ( $p=0.023$  y  $p=0.0002$  respectivamente), mientras que las mutaciones en los FW no son dirigidas por antígenos ( $p=0.365$ ). La secuencia del gen J mostró 4 mutaciones puntuales, de las cuales todas fueron sustitutivas. En la secuencia de aminoácidos (ver figura 24c) se observó una homología

del 88.1% con el producto del gen V<sub>L</sub> 1b.366F5/DPL5...+ y una homología del producto génico J<sub>L</sub> del 66.7% con el producto del gen JL3b (ver figura 24d).

a) Comparación en nucleótidos gen V<sub>L</sub>

```
C3          cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc
C8          -----
1b.366F5/DPL5...+ -----
```

CDR1

```
cca gga cag aag gtc acc atc tcc tgc tct gga agc agc tcc aac att ggg aag
-----
-----t
```

```
ttt --- gat gta tcc tgg tat cag cag gtc cca gga aca gcc ccc aaa acc ctc
-----
aa- ..... t-- --- --- --- --- a-- --- --- --- --- ct- ---
```

CDR2

```
att tat gac agt --- --- --- --- --- agt agg cga ttc tca ggg att cct gac
-----
--- --- --- -a- --- --- --- -a- -a- --- cc- --- --- ---
cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc --- --- acg tca gcc gcc ctg gac atc acc
-----
-----a-----
```

```
gga ctc cag att ggg gac gag gcc act tat tac tgc ggg aca tgg gat
-----
-----c-----
```

b) Comparación en aminoácidos gen V<sub>L</sub>

```
C3          Q S V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S
C8          -----
1b.366F5/DPL5...+ -----
```

CDR1	CDR2
S N I G K F - D V S W Y Q Q V P G T A P K T L I Y D S	- - - - - S R R
- - - - -	- - - - -
- - - - N N - Y - - - - - L - - - - - L - - - - - N - - - - -	- - - - - N K -
-----	
F S G I P D R F S G S K S G - - T S A A L D I T G L Q I G D E A T Y Y C G	
- - - - -	- - - - -
P - - - - -	- - - - - T - - - - - T - - - - -
-----	
T W D	
- - - - -	
- - - - -	

c) Comparación de nucleótidos gen J<sub>L</sub>

C8	TGCGGGACATGGGATGAAGGCCTGAGTGG	GTG	GGT	GTT	TGG	CGG	AGG	GAC	CAA	GGT
C3	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---
JL3b	-----	T--	---	---	C--	---	---	---	---	-C-
-----										
CAC	CGT	CCT	AG							
---	---	---	---							
G--	---	---	---							

d) comparación de aminoácidos gen J<sub>L</sub>

C8	V G V W R R D Q G H R P
C3	- - - - -
JL3b	L - - R - - - - A D - -

Fig. 24 Comparación de las secuencias del segundo fragmento con el gen de línea germinal. a) Comparación de nucleótidos de ambas clonas con el gen V<sub>L</sub> de línea germinal 1b.366F5/DPL5...+; b) comparación en aminoácidos de ambas clonas con el producto génico del gen de línea germinal 1b.366F5/DPL5...+; c) Comparación de nucleótidos de ambas clonas con el gen J<sub>L</sub> de línea JL3b; d) comparación en secuencia de aminoácidos predichas por las secuencias de nucleótidos de ambas clonas con el producto génico del gen de línea germinal JL3b

Clona	2do fragmento	
	C3	C8
Gen	1b.366F5/DPL5...+	1b.366F5/DPL5...+
Homología	94.9%	94.9%
Mutaciones gen V <sub>L</sub>	14/279	14/279
Mutaciones S	0	0
Mutaciones R	14	14
Mutaciones CDR	9	9
Mutaciones FW	5	5
Mutaciones gen J <sub>L</sub>	4/30	4/30
Mutaciones S	0	0
Mutaciones R	4	4

Tabla 19. Comparación mutacional de las clonas C3 y C8 con el gen de línea germinal 1b.366F5/DPL5...+ y JL3b

	2do Fragmento, Valor de p	
	C3	C8
FW total	0.3675	0.36795
CDR total	0.02452	0.0245
FW2	0.9486	0.9486
FW3	0.93	0.93
CDR1	0.0232	0.0232
CDR2	0.0002	0.0002

Tabla 20. Análisis estadístico multinomial de las clonas con el gen de línea germinal 1b.366F5/DPL5...+

## 7. Discusión

En la actualidad la metodología de expresión en fagos filamentosos representa una importante alternativa en el campo del diagnóstico e investigación, permite diseñar y bioseleccionar *in vitro* péptidos y/o completas proteínas que son expresados en la superficie de bacteriófagos filamentosos. El péptido y/o proteínas son fusionados genéticamente a una de las proteínas de la cápside viral. Esta fusión resulta en el despliegue del péptido y/o proteína en el exterior del fago, en tanto que, el DNA que codifica para la fusión queda dentro del mismo fago (Santamaría, 2003).

En el presente trabajo, estudiamos dos clones de anticuerpos en formato ScFv generados previamente mediante la tecnología de expresión en fagos filamentosos a partir de linfocitos de sangre periférica de una paciente con SaF primario (Languren y cols. 2006). En el primer estudio, de la genoteca obtuvimos tres clones con alta reactividad, dos contra  $\beta_2$ GP-I y una contra protrombina (Languran y cols. 2006). A partir de la misma genoteca, obtuvimos dos clones más a las que denominamos C3 y C8, ambas clonás presentaron alta reactividad medida por a  $OD_{450nm}$  contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I, mediana reactividad contra la  $\beta_2$ GP-I libre de FL y baja reactividad contra CL (ver figura 7 y 8).

El análisis de la reactividad de las clonas C3 y C8 contra fosfolípidos, ambas reconocieron tanto con FLs aniónicos como neutros, pero con afinidades diferentes, lo que sugiere que el grupo fosfato de la CL juega un papel muy importante en la unión. Las clonas presentaron reactividad cruzada contra los diferentes antígenos probados (CL- $\beta_2$ GP-I,  $\beta_2$ GP-I y CL) La especificidad de la reactividad se comprobó por ensayos de inhibición. La clona C3 mostró inhibición a la unión de CL- $\beta_2$ GP-I,  $\beta_2$ GP-I y CL cuando se incubó con el mismo antígeno. En tanto que la actividad de la clona C8 contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I,  $\beta_2$ GP-I o CL se inhibió con el complejo CL- $\beta_2$ GP-I,  $\beta_2$ GP-I o CL solubles, efecto ocasionado por el incremento en la densidad del antígeno dado tanto de la solución de inhibición como del antígeno en

la placa. Resultados similares fueron obtenidos por Roubey cuando incubó aFL con  $\beta_2$ GP-I en placas irradiadas, el propone que el reconocimiento del antígeno por los aFL se debe al incremento en la densidad del mismo y no a la exposición de epítopes crípticos (Roubey y cols., 1995). Igarashi sugiere la importancia de la unión bivalente de los aFL de baja afinidad y además que puede existir la posibilidad de que el proceso de dimerización del antígeno permita la exposición de ciertos epítopes crípticos (Igarashi y col., 1996). Por lo que el incremento en la densidad antigénica y la exposición de ciertos epítopes pueden estar íntimamente relacionados con el desarrollo del SaF.

En cuanto a la capacidad patogénica de las clonas C3 y C8, ambas produjeron manifestaciones clínicas y de laboratorio del SaF y ninguna de las dos clonas rompió la red de regulación idiotipo-anti-idiotipo e indujo la generación de anticuerpos  $a\beta_2$ GP-I, pero si observamos incremento en la reactividad contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I. En el caso de la clona C3 el 20% de las ratonas al día 21 mostraron un incremento importante en la reactividad contra CL (figura 17), además presentaron resorción fetal, manifestación clínica que se traduce en el humano como pérdida fetal, y TTPa elevado.

El 100% de las ratonas inoculadas con la clona C8 presentaron un leve incremento en la reactividad contra CL y TTPa elevado, es decir actividad de anticoagulante lúpico. No detectamos disminución en el número de plaquetas en ningún grupo. Nuestros resultados muestran que las clonas obtenidas pueden ser patogénicas y que el rompimiento de la red idiotipo anti-idiotipo tiene un papel importante en la inducción del SaF en nuestro modelo. La modificación de la red idiotipo anti-idiotipo en el desarrollo del SaF fue documentada previamente por Blank y cols. en 1994 y posteriormente, en 1999 demostrando la capacidad de inducir SaF experimental en modelos murinos tras la administración de anticuerpos monoclonales de isotipo IgM obtenidos de un paciente con SaF secundario y anticuerpos en formato ScFv. Las ratonas que incrementaron los títulos de aCL,  $a\beta_2$ GP-I, tuvieron trombocitopenia, TTPa prolongado y resorción fetal (Blank y cols.

1994; Blank y cols. 1999). Ghavari y sus colaboradores reportaron que al inocular ratones PL/J con anticuerpos que reconocen péptidos de determinantes antigénicos de CMV, se incrementa la adhesión de leucocitos a células del endotelio y hay además aumento en la formación de trombos (Gharavi y cols. 2002). Aunque no solo los anticuerpos aFL son capaces de generar rompimiento de la tolerancia, Tincani en el 2002 demostró que al inocular ratones con  $\beta_2$ GP-I humana, se rompe la tolerancia y se incrementan los títulos de  $\alpha\beta_2$ GP-I humana, bovina y de ratón, con lo que demostraron que se generan anticuerpos contra epitopes compartidos por las  $\beta_2$ GP-I de las tres especies (Tincani y cols. 2002). Blank y cols. por su parte identificaron, de una biblioteca de hexapéptidos de la  $\beta_2$ GP-I expresados por fagos filamentosos, tres péptidos que fueron reconocidos por anticuerpos monoclonales anti- $\beta_2$ GP-I humanos, los tres péptidos inhibieron la activación endotelial *in vitro* y previnieron el SaF experimental (Blank y cols. 1999).

En los mecanismos de inmunorregulación, las citocinas juegan un papel muy importante tanto en los procesos normales como en algunas patologías durante el embarazo. Los estudios de los niveles de citocinas en enfermedades autoinmunes muestran secreción de múltiples proteínas, fenómeno al que se le ha llamado perfiles de citocinas. En pacientes con lupus eritematoso generalizado, se ha descrito la disminución de los niveles de IL-2 y presencia de defectos en la respuesta de linfocitos de sangre periférica después del estímulo con fitohemaglutinina o concavalina A (Murakawa y col. 1988). En pacientes con SaFP, Ahmed reportó que no hay correlación entre los niveles de IL-2 y TNF con las manifestaciones clínicas del SaFP (Ahmed y cols. 1992). Fishman por su parte observó que al inducir el SaF experimental en ratones balb/c con el anticuerpo monoclonal H3, los esplenocitos de dichos ratones después del estímulo con concavalina A disminuyen la producción de IL-2, IL-3 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monolitos (GM-CSF) (Fishman y cols., 1992). En nuestro estudio observamos que hay incremento en los niveles de IL-2 en los sueros de las ratonas inoculadas con el fago-anticuerpo de la clona C3 a partir del día 14 y se mantiene hasta el día 21. Nuestros resultados confirman lo reportado por Chaouat y

cols. en 1990, quién además observó un incremento de  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  en pacientes con pérdida fetal recurrente (Chaouat y cols. 1990; Raghupathy. 2001). En relación al GM-CSF, en las ratonas inoculadas con C3, aumentaron sus niveles el día 14 y disminuyeron al día 21, lo cual podría explicar la pérdida fetal, debido a que el incremento de GM-CSF es importante durante el embarazo junto con IL-3 ya que permiten el desarrollo normal de la placenta y del producto, además de evitar la pérdida fetal por la disminución de la actividad por parte de las células NK (Fishman y cols., 1992).

Las ratonas inoculadas con la clona C8 presentaron incremento en los niveles de GM-CSF hasta el día 21. IL-6 aumentó hasta el día 21 en el grupo de ratonas inoculadas con el fago anticuerpo de la clona C3, fenómeno que ocurrió con disminución en los niveles de IL-1 $\beta$  en el día 14 y 21.

El grupo de ratonas inmunizadas con la clona C8 mostraron incremento tanto de IL-6 como IL-1 $\beta$  al día 14 manteniéndose hasta al día 21. El resultado de IL-1 $\beta$  concuerda con lo reportado, debido a que el aumento de IL-1 $\beta$  está implicado en la implantación del embrión (Simón y cols. 1994). En modelos murinos el bloqueo de receptores de IL-1 antes del periodo de implantación da como resultado la inhibición de la implantación (Simón y cols. 1994). En el caso de la IL-6 los niveles no se alteraron, lo que confirma las observaciones de Ahmed, quien no observó relación de los niveles de IL-6 con el desarrollo de SaF primario y lupus (Ahmed y cols. 1992).

La molécula MCP-1 estuvo incrementada en los sueros del grupo de ratones inoculados con la clona C3, el incremento se observó el día 14 con disminución al día 21. En los sueros de las ratonas del grupo inmunizado con la clona C8 observamos incremento de MCP-1 al día 14 y se mantuvo hasta el día 21, nuestros datos discrepan de los reportados previamente. Cho y cols que observaron incremento de MCP-1, el cual correlacionó con los títulos altos de aCL IgG, con lo que propone que los aCL pueden incrementar la producción de MCP-1 por las



células endoteliales, lo que facilita la migración de monocitos al endotelio, la activación endotelial, ocasionando la formación de trombos (Cho y cols. 2002). Chaiworapongsa observó el mismo efecto y lo relacionó con un alto riesgo para desarrollar pérdida fetal (Chaiworapongsa y cols. 2002).

El grupo de ratonas inmunizadas con la clona C8 mostró un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$  al día 21, sin embargo, no observamos alteraciones en el desarrollo embrionario. En éste sentido, Ahmed y colaboradores observaron en humanos que no existe correlación entre los niveles TNF y manifestaciones clínicas del SaF (Ahmed y cols. 1992). Berman, por el contrario, observó correlación entre los niveles de TNF y la pérdida fetal en un modelo murino (Berman y cols. 2005).

Los estudios moleculares mostraron que ambas clonas tienen el mismo patrón de digestión y el análisis de las secuencias reveló que usan los mismos genes. Sin embargo, una parte de la secuencia que flanquea a los re-arreglos presenta diferencias entre las clonas. Dicha diferencia puede generar un rearrreglo conformacional distinto con reactividades diferentes. Por otro lado, al analizar las secuencias no identificamos rearrreglos de cadenas pesadas, únicamente rearrreglos de cadenas ligeras. En el caso del primer fragmento antes del péptido de unión, las secuencias tienen una homología del 51.5% con el FW1 de gen DPL7/ML1.2 (IGLV1S2) con gran cantidad de mutaciones sustitutivas, por lo que es posible que la secuencia no pertenezca al gen en cuestión, y solo sea una secuencia irrelevante producto de la manipulación de los re-arreglos. El segundo fragmento mostró una homología del 94.9% con el gen V<sub>L</sub> 1b.366F5/DPL5...+ y 92% con el gen JL3b. Este re-arreglo es el mismo de las dos clonas reportadas por Languren y cols. en el 2006, pero varían en el número, y el sitio de localización de las mutaciones tanto para el gen V<sub>L</sub> como el gen JL3b. Además, el análisis binomial de los CDRs de las clonas de Languren mostró que las mutaciones no son dirigidas por antígeno, en tanto que, el análisis mutacional de las clonas del presente estudio mostró que las mutaciones localizadas en los CDRs 1 y 2 son dirigidas por antígeno. El análisis global de las mutaciones no mostró diferencia significativa.

Por otro lado, nuestros resultados indican que la reactividad está dada principalmente por el re-arreglo de la cadena ligera. Este mismo efecto fue reportado por Kumar quién manipuló el re-arreglo de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal con actividad aFL y observó que no se afectó la afinidad, no así cuando modificó el re-arreglo de la cadena ligera con lo que se incrementó la reactividad a otro antígeno (Kumar y cols. 2005). En contradicción a nuestros resultados y a los de Kumar, un metanálisis reportado por Giles y colaboradores mostró que tanto la cadenas pesada como la cadena ligera son importantes para el reconocimiento de la CL (Giles y cols. 2003). Se requieren más estudios para esclarecer la participación de los re-arreglos de las cadenas pesadas y ligeras en el reconocimiento de los autoantígenos relacionados con los anticuerpos patogénicos presentes en los pacientes con SaF y en el modelo murino del mismo.

## 8. Conclusiones

- La clona C3 reconoce a la  $\beta_2$ GP-I libre de FL en fase sólida, al complejo CL- $\beta_2$ GP-I, FTS, DNAdc, FTG y tiene poco reconocimiento por CL libre de  $\beta_2$ GP-I.
- La clona C8 reconoce a la  $\beta_2$ GP-I en fase sólida, con menor reactividad a los fosfolípidos: FTS y FTG. Además, presenta una fuerte reactividad contra el complejo CL- $\beta_2$ GP-I y una baja reactividad contra la CL libre de  $\beta_2$ GP-I.
- La CL y el complejo CL- $\beta_2$ GP-I inhiben la reactividad de las clonas C3 y C8 contra CL, CL- $\beta_2$ GP-I, en tanto que la  $\beta_2$ GP-I soluble no inhibe la reactividad de las clonas contra los diferentes antígenos
- El 20% de las ratonas del grupo inoculado con C3 presentó resorción fetal y títulos altos de anticuerpos anti-CL.
- El 20% de las ratonas inoculadas con C3 y el 100% de los inoculados con C8 mostraron TTPa prolongado en el día 21, es decir mostraron actividad de anticoagulante lúpico
- Los sueros de las ratonas inoculadas con la clona C3 presentaron incremento de las citocinas IL-2 e IL-6 y los sueros de las ratonas inoculados con la clona C8 presentaron incremento de GM-CSF, MCP-1 y TNF- $\alpha$ .
- Las clonas C3 y C8 tienen el rearreglo genético  $V_L$  1b.366F5/DPL5...+ y JL3b. No identificamos el gen  $V_H$ . Además presentaron diferencias en el extremo 3' de la secuencia.

## 9. Anexo I

### 2xYT

Bacto-triptona	16 g
Bacto-extracto de levadura	10 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	aforar a 1 L
pH	7.4

### Dietanolamina (DEA)

DEA	10 %
Cl <sub>2</sub> Mg	0.5 mM
pH	9.8

### Medio Minimo Esencial M9 (5x)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5 g
H <sub>2</sub> O	1 L

Esterilizar en autoclave

a 800 mL de H<sub>2</sub>O adicionar 200 mL de M9 (5x)

MgSO <sub>4</sub> 1M	2 mL
Glucosa 20 %	20 mL
CaCl <sub>2</sub> 1M	0.1 mL
Tiamina	10 µg/mL
Agar	18 g

**2xYTA**

Medio 2xYT

Ampicilina 100 µg/mL

**2xYTAG**

Medio 2xYTA

Glucosa 2 %

**2xYTAK**

Medio 2xYTA

Kanamicina 50 µg/mL

**Tris-acetato-EDTA (TAE) 1x**

Tris-base 4.84 g

Ácido acético glacial 1.2 mL

EDTA 0.5 M 0.2 mL

**PBS 1x**

NaCl 8 g

KCl 0.2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 gH<sub>2</sub>O aforar a 1 L

pH 7.2

## 10. Bibliografía.

Ahmed, K., Khamashta, MA., Vianna, JL. & Hughes, GRV. **IL-2, IL-6 and TNF levels in primary antiphospholipid syndrome.** *Clin Exp Rheum.* 1992; **10**: 503-4

Alarcón-Segovia, D. & Cabral, AR. **The anti-phospholipid antibody syndrome: clinical and serological aspects.** *Baillière's Clin Rheumatol.* 2000; **14**: 139-150

Alarcón-Segovia, D. & Sanchez-Guerrero, J. **Primary antiphospholipid syndrome.** *J Rheumatol.* 1989; **16**: 482-8

Alvarado, C., Bahena, S., Llorente, L., Martinez-Castillo, A., Alarcón-Segovia, D. & Cabral, AR.  **$\beta_2$ -Glycoprotein-I mRNA Transcripts are expressed by hepatocytes but not by resting or activated human endothelial cells.** *Throm Res* 1998; **90**: 239-43

Alves, JD., Ames, PRJ, Donohue, S., Stanyer, L., Noorouz-Zadeh, J., Ravirajan, C. & Isenberg, DA. **Antibodies to high-density lipoprotein and  $\beta_2$ -glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in Systemic Lupus Erythematosus and Primary Antiphospholipid Syndrome.** *Arthritis Rheum.* 2002; **46**: 2686-2694

Amengual, O., Atsumi, T. & Koike, T. **Antiprotrombin antibodies and diagnosis of antiphospholipid syndrome.** *Clin Immunol.* 2004; **112**: 144-9

Asherson, RA., Cervera, R., Piette, JC., Font, J., Lie, JT. & Burcoglu, A. **Catastrophic antiphospholipid syndrome. Clinical and laboratory features of 50 patients.** *Medicine.* 1998; **104**: 381-5

Asherson, RA. & Shoenfeld, Y. **The role of infection in the pathogenesis of catastrophic antiphospholipid syndrome-molecular mimicry?.** 2000; **27**: 12-14

Atsumi, T., Tsutsumi, A., Amengual, O., Khamashta, MA., Hughes, G. & Miyosi, Y. **Correlation between  $\beta_2$ -glycoprotein I valine/leucine<sup>247</sup> polymorphism and anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome.** *Rheumatology*. 1999; **38**: 721-3

Balada, E., Ordi-Ros, J., Paredes, F., Villarreal, J., Mauri, M. & Vilardell, M. **Antiphosphatidylethanolamine antibodies contribute to the diagnosis of antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus.** *Scand J Rheumatol*. 2001; **30**: 235-41

Berman, J., Girardi, G. & Salmon, JE. **TNF- $\alpha$  is critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss.** *J Immunol*. 2005; **174**: 485-90

Bervers, EM., Galli, M. & Barbui, T. **Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human protrombin.** *Thromb Haemost*. 1991; **66**: 629-32

Blank, M., Asherson, RA., Cervera, R. & Shoenfeld, Y. **Antiphospholipid syndrome infectious origin.** *J Clin Immunol*. 2004; **24**: 12-23

Blank, M., Faden, D., Tincani, A., Kopolovic, J., Goldberg, I., Gilburd, B., Allegri, F., Balestrieri, G., Valesini, G. & Shoenfeld, Y. **Immunization with anticardiolipin cofactor (Beta-2-Glycoprotein I) Induces experimental antiphospholipid syndrome in naïve mice.** *J Autoimmun*. 1994; **7**: 441-55

Blank, M., Krause, I., Fridkin, M., Keller, N., Kopolovic, J., Goldberg, I., Tobar, A. & Shoenfeld, Y. **Bacterial induction of autoantibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome.** *J Clin Invest*. 2002; **109**: 797-804

Blank, M., Shoenfeld, Y., Cabilli, S., Heldman, Y., Fridkin, M. & Katchalski-Katzir, E. **Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides.** *Proc Natl Acad Sci.* 1999; **96**: 5164-8

Blank, M., Waisman, A., Mozes, E., Koike, T. & Shoenfeld, Y. **Characteristic and pathogenic role of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I single-chain Fv domains: induction of experimental antiphospholipid syndrome.** *Int Immunol.* 1999; **11**: 1917-26

Bouma, B., de Groot, PG., van den Elsen, JMH., Ravelli, RBG., Schouten, A., Simmelink, MJA., Derksen, RHWM., Kroon, J. & Gros, P. **Adhesion mechanism of human  $\beta_2$ -glycoprotein I to phospholipid based on its crystal structure.** *EMBO J.* 1999, **18**: 5166-74

Bowie, EJW., Thompson, JH., Pascuzzi, CA. & Owen, CA. **Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants.** *J Lab Clin Med.* 1963; **62**: 416-30

Brighton, T., Dai, Y., Hogg, PJ. & Chesterman, CN. **Microheterogeneity of beta-2 glycoprotein I: implications for binding to phospholipids.** *Biochem J.* 1999; **340**: 59-67

Cabiedes, J. & Cabral, AR. **Anti- $\beta_2$ -glycoprotein-I antibodies in ScFv format.** *Autoimmun Rev.* 2005; **4**: 289-95

Cabral, AR., Cabiedes, J. & Alarcón-Segovia, D. **Hemolytic anemia related to an IgM autoantibody to phosphatidylcholine that binds in vitro to stored and to bromelain-treated erythrocytes.** *J Autoimmun.* 1990; **3**: 773-87

Cai, G., Gou, Y. & Shi, J. **Purification of apolipoprotein H by polyethyleneglycol precipitation.** *Prot exp pur.* 1996; **8**: 341-6



Canobbio, I., Balduini, C. & Torti, M. **Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex.** *Cell Signal* 2004; **16**: 1329-44

Chaiworapongsa, T., Romero, R., Tolosa, J.E., Yoshimatsu, J., Espinosa, J., Kim, Y.M., Kim, J.C., Bujold, E., Kalache, K. & Edwin, S. **Elevated monocyte chemoattractant protein-1 in amniotic fluid is a risk factor for pregnancy loss.** *J Mater Fetal Neonatal Med.* 2002; **12**: 158-64

Chamley, L.W., Duncalf, A.M., Konarkowska, B., Miychell, M.D. & Johnson, P.M. **Conformationally altered beta 2-glycoprotein I is the antigen for anti-cardiolipin autoantibodies.** *Clin Exp Immunol.* 1999; **115**: 571-6

Chamley, W., Allen, J.L. & Johnson, P.M. **Synthesis of  $\beta_2$  glycoprotein by the human placenta.** *Placenta.* 1997; **18**: 403-10

Chaouat, G., Menu, E., Clark, D.A., Dy, M., Minkowski, M. & Wegmann, T.G. **Control of fetal survival in CBA X DBA/2 mice by lymphokine therapy.** *J Reprod Fertil.* 1990; **89**: 447-58

Cho, C., Cho, M., Chen, P.P., Min, S., Hwang, S., Park, K., Kim, W., Min, J. & Park, S. **Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells.** *J Immunol.* 2002; **168**: 4209-15

Chukwuocha, R.U., Hsiao, E.T., Shaw, P., Witzt, J.L. & Chen, P.P. **Isolated, characterization and sequence analysis of five IgG Monoclonal anti- $\beta_2$ -glycoprotein I and anti-protrombin antigen-binding fragments generated by phage display.** *J Immunol.* 1999; **163**: 4604-11

Di Simone, N., Raschi, E., Testoni, C., Castellani, R., D'Asta, M., Shi, T., Krisil, SA., Caruso, A. & Moroni, PL. **Pathogenic role of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies in antiphospholipid associated fetal loss: characterisation of  $\beta$ 2-glycoprotein I binding to trophoblast cells and functional effects of anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies in vitro.** *Ann Rheum Dis.* 2005; **64**: 462-7

Espinosa, G., Cervera, R., Font, J. & Shoenfeld, Y. **Antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms.** *Autoimmun rev.* 2003; **2**: 86-93

Exner, T., Rickard, KA. & Kronenberg, H. **A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns,** *Br J Haematol.* 1978; **40**: 143-151

Feinstein, DI. & Rapaport, SI. **Acquired inhibitors of blood coagulation.** *Prog Hemost Thromb.* 1972; **1**: 75-95

Fishman, P., Bakimer, R., Blank, M., Sredni, D., Djaldetti, M. & Shoenfeld, Y. **The putative role of cytokines in the induction of primary anti-phospholipid syndrome mice.** *Clin Exp immunol.* 1992; **90**: 266-70

Galli, M., Comfurius, P., Maasen, C., Hemker, HC., De Baets, MH., Van Breda-Vriesmen, PJC., Barbui, T., Zwaal, RFA. & Bevers, EM. **Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor.** *Lancet.* 1990; **335**: 1544-7

Galli, M., Luciani, D., Bertolini, G. & Barbui, T. **Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature.** *Blood.* 2003; **101**: 1827-32

Gambino, R., Ruiu, G., Cassader, M. & Pagano, G. **Apolipoprotein H: a two-step isoaltion method.** *J Lipid Res.* 1996; **37**: 902-4

Gambino, R., Ruiu, G., Pagano, G. & Cassader, M. **Characterization and representative structures of N-oligosaccharides bound to apolipoprotein H.** *J Lipid Med Cell Signal.* 1997; **17**: 191-205

Gambino, R., Ruiu, G., Pagano, G. & Cassader, M. **Qualitative Analysis of the carbohydrate composition of apolipoprotein H.** *J Prot Chem.* 1997; **16**: 205-12.

Gamsjaeger, R., Johs, A., Gries, A., Gruber, HJ., Romanin, C., Prassl, R. & Hinterdorfer, P. **Membrane binding of  $\beta_2$ -glycoprotein I can be described by a two-state reaction model: an atomic force microscopy and surface plasmon resonance study.** *Biochem J.* 2005; **389**: 665-73

Gezer, S. **Antiphospholipid syndrome.** *Dis Mon.* 2003; **49**: 671-742.

Gharavi, AE., Pierangeli, SS., Espinola, RG., Liu, X., Colden-Stanfield, M. & Harris, EN. **Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo.** *Arthritis Rheum.* 2002; **46**: 545-52

Giles, I., Lambrianides, N., Latchman, D., Chen, P., Chukwuocha, R., Isenberg, D & Rahman, A. **The critical role of arginine residues in the binding of human monoclonal antibodies to cardiolipin.** *Arthritis Res ther.* 2005; **7**: R47-R56

Giles, IP., Haley, J., Nagl, S., Latchman, DS., Chen, PP., Chukwuocha, RU., Isenberg, DA. & Rahman, A. **Relative importance of different human aPL derived heavy and light chains in the binding of aPL to cardiolipin.** *Mol Immunol.* 2003; **40**: 49-60

Giles, IP., Haley, JD., Nagl, S., Isenberg, DA., Latchman, DS. & Rahman, A. **A systematic analysis of sequence of human antiphospholipid and anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies: the importance of somatic mutations and certain sequence motifs.** *Sem Arthritis Rheum.* 2003; **32**: 246-65

Giles, IP., Isenberg, DA., Latchman, DS. & Rahman, A. **How do antiphospholipid antibodies bind  $\beta_2$ -glycoprotein I?** *Arthritis Rheum.* 2003; **48**: 2111-21

Hanly, J. **Antiphospholipid síndrome: an overview.** *Clin Med Am J.* 2003; **168**: 1675-82

Harris, EN., Gharavi, AE., Boey, ML., Patel, BM., Mackworth-Young, CG. & Loizou, S. **Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus.** *Lancet.* 1983; **2**: 1211-4

Harris, EN., Gharavi, AE., Wasley, GD. & Hughes, GR. **Use of an enzyme-linked immnosorbent assay and of inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disorders.** *J Infect Dis.* 1988; **157**: 23-31.

Hirose, N., Williams, R., Alberts, AR., Furie, RA., Chastash, EK., Jain, RI., Sison, C., Lahita, RG., Merrill, JT., Cucurull, E., Ghavari, AE., Sammaritano, LR., Salmon, JE., Hashimoto, S., Sawada, T., Chu, CC., Gregersen, PK. & Chiorazzi, N. **A role for the polymorphism at position 247 of the  $\beta_2$ -glycoprotein I gene in the generation of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies in the antiphospholipid syndrome.** *Arthritis Rheum.* 1999; **42**: 1655-61

Hunt, JE., Simpson, RJ. & Krilis, SA. **Identification of a region of  $\beta_2$ -glycoprotein I critical for lipid binding and anticardiolipin antibody cofactor activity.** *Proc Natl Acad Sci.* 1993; **90**: 2141-5

Ieko, M., Ichikawa, K., Triplett, DA., Matsuura, E., Atsumi, T., Sawada, K. & Koike, T.  **$\beta_2$ -glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies.** *Arthritis Rheum.* 1999; **42**: 164-74

Igarashi, M., Matsuura, E., Igarashi, Y., Nagae, H., Ichikawa, K., Triplett, DA. & Koike, T. **Human  $\beta_2$ -glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using deleted mutants expressed by baculovirus system.** *Blood.* 1996; **87**: 3262-70

Kertesz, Z., Yu, B., Steinkasserer, A., Haupt, H., Benham, A. & Sim, RB. **Characterization of binding of human  $\beta_2$ -glycoprotein I to cardiolipin.** *Biochem J.* 1995; **310**: 315-21

Koch, J., Breitling, F. & Dübel, S. **Rapid titration of multiple sample of filamentous bacteriophage (M13) on nitrocellulose filters.** *Biotech.* 2000; **29**: 1196-1202

Koike, T. & Matura, AE. **What is the "true" antigen for antiphospholipid antibodies? (letters).** *Lancet* 1990; **337**: 671-2

Kumar, S., Nagl, S., Kalsi, JK., Ravirajan, CT., Athwal, D., Latchman, DS., Pearl, LH. & Isenberg, DA. **Beta-2-glycoprotein specificity of human anti-phospholipid antibody resides on the light chain: a novel mechanism for acquisition of cross-reactivity by an autoantibody.** *Mol Immunol.* 2005; **42**: 39-40

Kumar, S., Nalg, S., Kalsi, JK., Ravirajan, CT., Athwal, D., Latchman, DS., Pearl, LH. & Isenberg, DA. **Beta-2-glycoprotein specific of human anti-phospholipid antibody resides on the light chain: a novel mechanism for acquisition of cross-reactivity by an autoantibody.** *Mol Immunol.* 2005; **42**: 39-48

Languren, M., Becerril, B., Cabral, AR., Fernández-Altuna, LE., Pascual, V., Hernández-Ramírez, DF. & Cabiedes, J. **Characterization of monoclonal anti- $\beta_2$ -glycoprotein-I and anti-prothrombin antibody fragments generated by phage display from a patient with primary antiphospholipid syndrome.** *J Autoimmun.* 2006; **26**: 57-65

Levine, JS., Branch, DW. & Rauch, J. **The antiphospholipid syndrome.** *N Eng J Med.* 2002; **346**: 752-63

Lozier, J., Takahashi, N. & Putnam, FW. **Complete amino acid sequence of human plasma  $\beta_2$ -glycoprotein I.** *Proc Natl Acad Sci.* 1984; **81**: 3640-4

Lutters, BCH., Derksen, RHW., Tekelenburg, WL., Lenting, PJ., Arnout, J. & de Groot, PG. **Dimers of  $\beta_2$ -glycoprotein-I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2.** *J Biol Chem.* 2003; **278**: 33831-8

Matsuura, E., Igarashi, M., Igarashi, Y., Nagae, H., Ichikawa, K., Yasuda, T. & Koike, T. **Molecular definition of human  $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI) by cDNA cloning and inter-species differences of  $\beta_2$ GPI in alteration of anticardiolipin binding.** *Int Immunol.* 1991; **3**: 1217-21

Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K., Suzuki, T., Sumida, T., Yasuda, T. & Koike, T. **Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor.** *J Immunol.* 1992; **148**: 3885-91

Matsuura, E., Igarashi, Y., Yasuda, T., Triplett, DA. & Koike, T. **Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface.** *J Exp Med.* 1994; **179**: 457-62

Mcneil, HP., Simpson, RJ., Chesterman, CN. & Krilis, SA. **Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta_2$ -Glycoprotein I (apolipoprotein H).** *Proc Natl Acad Sci.* 1990; **87**: 4120-4

Miyakis, S., Giannakopoulos, B. & Krilis, SA. **Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease.** *Thromb Res.* 2004; **114**: 335-346

Murakawa, Y. & Sakane, T. **Deficient phytohemagglutinin-induced interleukin-2 activity in patients with inactive systemic lupus erythematosus is correctable by the addition of phorbol myristate acetate.** *Arthritis Rheum.* 1988; **31**: 826-33

Nilsson, IM., Astedt, B., Hedner, U. & Berezine, D. **Intrauterine death and circulating anticoagulant "antithromboplastin".** *Acta Med Scand.* 1975; **197**: 153-9

Oosting, JD., Derksen, RHW., Entjes, HT., Bouma, BN. & de Groot, PG. **Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of beta 2-glycoprotein I.** *Thromb Haemost.* 1992; **67**: 499-502

Oosting, JD., Derksen, RHW. & Bobbink, IWG. **Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with protrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism?** *Blood.* 1993; **81**: 2618-25

Pasqualini, R. & Rouslahti, E. **Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries.** *Nature.* 1996; **380**: 364-6

Pierangeli, SS., Blank, M., Liu, X., Espinola, R., Fridkin, M., Vega, M., Roye-Green, K., Nigel, E. & Shoenfeld, Y. **A peptide that shares similarity with bacterial antigens reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in vivo.** *J Autoimmun.* 2004; **22**: 217-25

Pierangeli, SS., Espinola, RG., Liu, X. & Harris, EN. **Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin.** *Circ Res.* 2001; **88**: 245-50

Pierangeli, SS., Harris, EN., Davis, SA. & DeLorenzo, G.  **$\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI) enhances cardiolipin binding activity but is not the antigen for antiphospholipid antibodies.** *Br J Haematol.* 1992; **82**: 565-70

Polz, E., Wurm, H. & Konstner, GM. **Investigations on  $\beta_2$ -glycoprotein I in the rat: Isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions.** *Int J Biochem.* 1980; **11**: 265-70

Prieto, GA., Cabral, AR., Zapata-Zuñiga, M., Simon, AJ., Villa, AR., Alarcón-Segovia, D. & Cabiedes, J. **Valina/valina genotype at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies.** *Arthritis Rheum.* 2003; **48**: 471-4

Raghupathy, R. **Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm.** *Semin Immunol.* 2001; **13**: 219-27

Rand, JH. **Molecular pathogenesis of the phospholipid syndrome.** *Circ Res.* 2002; **90**: 29-37



Rauch, J. **Lupus anticoagulant antibodies: Recognition of phospholipids-binding protein complex.** *Lupus*. 1998; **7**: S29-S31

Reutelingsperger, CPM., Hornstra, G. & Hemker, HC. **Isolation and partial purification of novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord.** *Eur J Biochem*. 1985; **151**: 625-9

Roubey, RA., Eisenberg, RA., Harper, MF. & Winfield, JB. **"Anticardiolipin" autoantibodies recognize beta 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid importance of Ag density and bivalent binding.** *J Immunol*. 1995; **154**: 954-60

Roubey, RAS., Pratt, CW., Buyon, JP. & Winfield, JB. **Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon b2glycoprotein I.** *J Clin Invest*. 1992; **90**: 1100-4

Sanghera, DK., Kristensen, T., Hamman, RF. & Kamboh, MI. **Molecular basis of the apolipoprotein H ( $\beta_2$ -glycoprotein I) protein polymorphism.** *Hum Genet*. 1997; **100**: 57-62

Sanmarcos, M., Alessi, MC., Harle, JR., Sapin, C., Aillaud, MF., Gentile, S., Juhan-Vague, I. & Weiller, PJ. **Antibodies to phosphatidylethanolamine as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thrombosis.** *Thromb Haemost*. 2001; **85**: 800-5

Santamaría, H. **Phage display y su aplicación en el diagnóstico clínico.** *Rev Invest Clin*. 2003; **55**: 711-8

Schousbe, I. & Rasmussen, MS. **Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of factor XII in plasma by b2-glycoprotein I and anti-b2-glycoprotein I.** *Thromb Haemost*. 1995; **73**: 789-804

Schwarzenbacher, R., Zeth, K., Diederichs, K., Gries, A., Kostner, GM. & Laggner, P. **Crystal structure of human  $\beta_2$ -glycoprotein I: implicatins for phospholipids binding and the antiphospholipid syndrome.** *EMBO J.* 1999; **18**: 6228-39

Shi, T., Giannakopoulos, B., Yan, X., Yu, P., Berndt, MC., Andrew, RK., Rivera, J., Iverson, M., Cockerill, KA., Linnik, MD. & Krilis, SA. **Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I Antibodies in complex with  $\beta_2$ -Glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V.** *Arthritis Rheum.* 2006; **54**: 2558-2567

Shi, T., Iverson, GM., Qi, JC., Cockerill, KA., Linnik, MD., Konecny, P. & Krilis, SA. **Beta 2-glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor Xlla: loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I.** *Proc Natl Acad Sci.* 2004; **101**: 3939-44

Shi, W., Chong, BH., Hogg, PJ. & Chesterman, CN. **Anticardiolipin antibodies block the inhibition by  $\beta_2$ -glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets.** *Thromb Haemost.* 1993; **70**: 342-5

Simón, C., Frances, A. & Piquette, G. **Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin 1 receptor antagonist.** *Endocrinology.* 1994; **134**: 519-20

Smith, GP. & Petrenko, VA. **Phage display.** *Chem Rev.* 1997; **97**: 391-410

Stone, S., Pijnenborg, R., Vercruyse, L., Poston, R., Khamashta, MA., Hunt, BJ. & Poston, L. **The plancental bed in pregnancies complicated by primary antiphospholipid syndrome.** *Placenta.* 2006; **27**: 457-67

Tait, JF. & Gibson, D. **Phospholipid binding of annexine V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content.** *Arch Biochem biophys.* 1992; **298**: 187-91

Tektonidou, M. **Antiphospholipid syndrome.** *Orphanet encyclopedia.* 2004; 1-6

Thiagarajan, P. & Tait, JF. **Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets.** *J Biol Chem.* 1990; **265**: 17420-3

Thiagarajan, P. & Tait, JF. **Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles.** *J Biol Chem.* 1991; **266**: 24302-7

Tincani, A., Gilburd, B., Abu-Shakra, M., Blank, M., Allegri, F., Ottaviani, R., Riboni, M., Meroni, PL., Balestrieri, G. & Shoenfeld, Y. **Immunization of naïve Balb/c mice with human  $\beta_2$ -glycoprotein I breaks tolerance to the murine molecule.** *Arthritis Rheum.* 2002; **96**: 1399-404

Triplett, DA. **Assay for detection of antiphospholipid antibodies.** *Lupus.* 1994; **3**: 281-287

Vlachoyiannopoulos, PG., Mauragani, CP., Bourazopoulou, E., Balistari, AV. & Routsias, J. **Anti-CD40 antibodies in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus.** *Thromb Haemost.* 2004; **92**: 1303-11.

Wang, S., Sun, Y. & Sui, S. **Membrane-induced conformational change in human apolipoprotein H.** *Biochem J.* 2000; **348**: 103-6

Willems, GM., Janssen, MP., Pelsers, MM., Comfurius, P., Galli, M., Zwaaf, RF. & Bevers, EM. **Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody  $\beta_2$ -glycoprotein I complexes to lipid membranes.** *Biochemistry.* 1996; **35**: 13833-42

Wilson, WA., Ghavari, AE., Koike, T., Lockshin, MD., Branch, DW., Piette, J., Derksen, R., Harris, EN., Hughes, G., Triplett, DA., & Khamashta, MA. **International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome.** *Arthritis Rheum.* 1999; **42**: 1309-1311

Yasuda, S., Atsumi, T., Leko, M., Matsuura, E., Kobayashi, K., Inagaki, J. & Koike, T. **Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis.** *Blood.* 2004; **103**: 3766-72.

Yasuda, S., Atsumi, T., Matsuura, E., Kaihara, K., Yamamoto, D., Ichikawa, K. & Koike, T. **Significance of Valine/leucine<sup>247</sup> polymorphism of  $\beta_2$ -glycoprotein I in antiphospholipid syndrome.** *Arthritis Rheum.* 2005; **52**: 212-218

Yodfat, O., Blank, M., Krause, I. & Shoenfeld, Y. **The pathogenic role of anti-phosphatidylserine antibodies: active immunization with antibodies leads to the induction of antiphospholipid syndrome.** *Clin immune immunopath.* 1996; **78**: 14-20