



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

SEDE ACADEMICA (SEDE SUR):

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN.

SEDE DEL PROYECTO:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA IGNACIO CHAVEZ

**AUTOANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA, ANTI- α_2 -GPI Y ANTI- PROTROMBINA.
EVALUACION DE SU FRECUENCIA Y VALOR PREDICTIVO DE DESENLACE EN
PACIENTES CON CARDIOPATIA ISQUEMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS
PRESENTA

M. en C. ARNULFO HERNAN NAVA ZAVALA

TUTOR Y DIRECTOR DE TESIS :

DR. PEDRO ANTONIO REYES LOPEZ

CO-TUTOR Y CO-DIRECTOR::

DR.SERGIO PONCE DE LEON ROSALES

CARDIOLOGO ASESOR:

DR.EDUARDO CHUQUIURE VALENZUELA

MEXICO D.F.

MAYO DEL 2013



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.

Dr. Pedro Antonio Reyes López
Investigador en Ciencias Medicas "F"
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III
Profesor Titular del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Medicas,
Odontológicas y de la Salud

Dr. Sergio Ponce de León Rosales
Investigador en Ciencias Medicas "F"
Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III
Profesor Titular del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Medicas,
Odontológicas y de la Salud

Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas
Responsable de la Entidad Académica
Investigador en Ciencias Medicas "F"
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III
SEDE ACADEMICA (SEDE SUR): INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

DEDICATORIA

A María del Carmen, Mi Esposa, extensión del ser, amor y vida.

A Graciela del Carmen, nuestra hija, amor, sublimación y eternidad.

A Mis Padres, Otilia y Francisco.

Al Dr. Pedro Antonio Reyes López

Al Dr. Sergio Ponce de León Rosales

Al Dr. Roberto Kretschmer Schmid, presencia en ausencia

INDICE

INDICE	3
RESUMEN	4
PALABRAS CLAVE	4
INTRODUCCION	6
Estructura de la Beta2-GPI	9
Niveles plasmáticos de la beta2-GPI	11
Anticuerpos antifosfolípido y cardiopatía isquémica	12
JUSTIFICACION	14
OBJETIVO	14
MATERIAL Y METODO	14
RESULTADOS	20
DISCUSION	27
CONCLUSIONES	28
PERSPECTIVAS	29
BIBLIOGRAFIA	30

RESUMEN

Los anticuerpos antifosfolípido (aFL) se han descrito en ausencia de enfermedad autoinmune y asociados a cardiopatía isquémica (CI), con resultados discordantes. En México, la CI tiene alta morbi-mortalidad. La frecuencia de los aFL en pacientes con CI debe determinarse con mayor fidelidad.

Material y Método. Se incluyeron casos consecutivos con diagnóstico de CI. El estudio incluyó electrocardiograma, biometría hemática, PCRas, determinación en suero de enzimas (TGO, DHL, CK, CK-MB) y a juicio del cardiólogo tratante estudios como ecocardiograma, angiografía-angioplastía, revascularización coronaria. Determinación en suero de aFL IgG por ensayo inmunoenzimático, incluyendo anticardiolipina (aCL), anti *2-Glicoproteína I (a 2-GPI)* y antiprotrombina (aPT).

Resultados: Se evaluaron 194 pacientes con edad (Md) 62; 20 a 91. El 68% fueron varones. La frecuencia para aCL, *a 2-GPI* y *aPT* fue de 2%, 0.7% y 11% respectivamente y para los aFL acumulados fue de 14% (n=21). A la inclusión, la comparación entre los subgrupos con y sin AFL mostro diferencias ($p < 0.05$) para IMC (25; 17 a 30 vs 26; 18 a 38) y plaquetas (188; 71 a 310 vs 229; 52 a 693); diferencia marginal ($p = 0.96$) para hipertensión arterial sistémica (38% vs 59%). Sin embargo, al comparar por el desenlace, el subgrupo con MACE mostro mayores valores ($p < 0.05$) para PCRas (38; 0.9 a 279 vs 20; 0.2 a 298), CK-MB (14; 2 a 300 vs 8; 1 a 222), Troponina I (2.1; 0.02 a 99 vs 0.3; 0.01 a 441), leucocitos (10750; 5200 a 18700 vs 8800; 3200 a 90000); la misma tendencia marginal ($p < 0.1 > 0.05$) se identifico para CK (185; 36 a 2936 vs 129; 12 a 4100) y Uso de Tabaco (82% vs 64%). En contraste el subgrupo sin MACE mostro mayores valores con tendencia marginal ($p < 0.1 > 0.05$) para Dislipidemia (32% vs 51%) y factor reumatoide (20; 20 a 20 vs 20; 20 a 400).

Discusión. La baja frecuencia de aCL y α_2 -GPI muestra que no son marcadores relevantes al momento del ingreso. Sin embargo, en dos recientes informes en la literatura en un grupo de pacientes con CI con coronariopatía en la arteriografía, describen 40% de α_2 -GPI . Por otra parte la frecuencia incrementada de los anticuerpos aPT en el presente trabajo, confirma lo descrito por otros autores.

PALABRAS CLAVE

ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO

CARDIOPATIA ISQUEMICA

ANTICUERPOS ANTIPROTROMBINA

INTRODUCCION

Puede considerarse al síndrome antifosfolípido (SAF) como un trastorno de la coagulación sanguínea caracterizado por eventos trombóticos esporádicos, impredecibles y potencialmente mortales. El SAF puede identificarse entre otros factores mediante la detección de diversos autoanticuerpos que reaccionan contra varios fosfolípidos o proteínas de la coagulación, conocidos como anticuerpos antifosfolípido (aFL). Los anticuerpos anticardiolipina (aCL) y el anticoagulante lúpico (AL) han sido los principales anticuerpos descritos en asociación con manifestaciones clínicas como trombosis vascular, ya sea arterial ó venosa, trombocitopenia y pérdida fetal. Estas asociaciones se han descrito principalmente en grupos de pacientes con lupus eritematoso generalizado, donde permiten integrar el diagnóstico de síndrome antifosfolípido secundario (SAFS), que con menor frecuencia existe en otras enfermedades autoinmunes (1-7).

Hay casos en los que los pacientes muestran aFL y las manifestaciones clínicas asociadas en ausencia de enfermedad autoinmune, es en este contexto que se ha propuesto y aceptado el concepto de síndrome antifosfolípido primario (SAFP) (8).

En este modelo de enfermedad, el SAF, las condiciones están dadas para que un anticuerpo persistente en un ambiente de autoinmunidad exprese su avidéz por estructuras dependientes de fosfolípidos que participan en la coagulación. En esta propuesta, las estructuras reconocibles por el anticuerpo estarían expuestas solo en algunos momentos cuando existe daño vascular que requiere de la activación de los sistemas de coagulación sanguínea, lo que explicaría porque no en todos los casos los anticuerpos se asocian a manifestaciones clínicas (9,10).

Vale la pena mencionar que las pruebas laboratoriales de que se dispone actualmente para la detección de anticuerpos antifosfolípido no permiten predecir la ocurrencia de la trombosis y por supuesto tampoco la fase de la enfermedad en que podría ocurrir, quizá el obstáculo más importante sea la heterogeneidad de los anticuerpos involucrados. Posiblemente la evidencia más consistente respecto a asociaciones potencialmente predictivas sea el hecho de que el mayor riesgo de trombosis es conferido por la presencia de títulos altos de aCL y en particular del isotipo IgG (2, 11).

Es bien conocido que los aCL requieren para su adherencia in vitro un cofactor plasmático, la β -glicoproteína I (β -GPI), con actividad anticoagulante. Esta β -GPI ha sido utilizada como antígeno y se detectan ahora anticuerpos contra β -GPI (anti β -GPI) (7-11). La β -GPI es una glucoproteína con una sola cadena polipeptídica de 326 aminoácidos, contiene 5 dominios de aproximadamente 60 aminoácidos cada uno, que semejan una estructura multiasa y es rica en cisteína. El quinto dominio es atípico, conteniendo un puente disulfuro más que los otros dominios; este dominio permite incluir a la β -GPI dentro de una familia de proteínas que tienen una estructura semejante y que se ha conocido como la superfamilia de consenso corto repetido ó más recientemente la superfamilia de la proteína controladora de complemento repetida (11), que, incluye a la haptoglobina, factores del complemento como C1r, C1s, H entre otras proteínas.

La β -GPI es también conocida como apolipoproteína H, es una proteína de 50-kDa descrita por primera vez en 1961 (12), se reconoció en 1968 la primera persona clínicamente sana con deficiencia de esta proteína (13)

Inicialmente no recibió mucha atención ya que no se le identificó asociación con ninguna función. El nombre de apolipoproteína H sugiere participación en el metabolismo de

lípidos, pero en realidad es una inexactitud histórica de asignación de nomenclatura. En el plasma, la β -GPI no está asociada ni incorporada a las partículas de lipoproteínas (14).

El interés en esta proteína aparentemente obsoleta se incrementó en 1990, ya que la β -GPI fue identificada como el antígeno más importante en el SAF (15-17), vinculando así el estado protrombótico autoinmune con los eventos trombóticos arteriales y venosos así como las complicaciones del embarazo distintivos de esta enfermedad, en combinación con la presencia de anticuerpos antifosfolípido con especificidad identificada en sangre (18).

Actualmente se acepta que estos anticuerpos están dirigidos contra las proteínas unidas a los fosfolípidos de carga negativa y no contra los fosfolípidos propiamente. La evidencia en modelos animales muestra que el antígeno dominante en el SAF es la β -GPI, la cual tiene afinidad, si bien relativamente baja, por los fosfolípidos aniónicos (19).

La importancia de los anticuerpos contra β -GPI es apoyada por la inyección de estos anticuerpos a ratones, incrementando la formación de trombos cuando los ratones recibieron un trauma, mostrando también resorción fetal en los ejemplares gestantes (20-23).

Si bien es clara la importancia de la β -GPI en la fisiopatología del SAF, estos experimentos in vivo no revelan la función fisiológica de la proteína.

Para explicar el papel de la β -GPI en las manifestaciones del SAF se ha propuesto que los anticuerpos contra β -GPI podrían condicionar la inducción de una nueva función de la proteína. Los estudios realizados administrando fragmentos Fab y F(ab')₂ mostraron que la dimerización de la β -GPI produjo un incremento por 1000 de la afinidad por fosfolípidos aniónicos (19).

En adición, los experimentos in vivo demostraron que al administrar en hámsteres fragmentos de IgG de un paciente, se indujo la formación de trombos como respuesta al

daño vascular, apoyando la importancia de la bivalencia de la interacción de la α_2 -GPI con los fosfolípidos aniónicos (24)

Sin embargo, estos hallazgos no explican la función de la proteína.

Estructura de la α_2 -GPI

La α_2 -GPI es una glicoproteína ligadora de fosfolípidos aniónicos y pertenece a la superfamilia de proteínas de control del complemento (CCP). Los integrantes de esta superfamilia están compuestos por secciones repetidas de alrededor de 60 aminoácidos con dos puentes disulfuro conservados. Los integrantes incluyen a más de 50 proteínas de mamíferos, principalmente miembros del sistema del complemento (25).

El dominio CCP funciona como un módulo de interacción proteína - proteína en muchas moléculas diferentes.

La α_2 -GPI está compuesta POR 326 aminoácidos organizados en 5 dominios CCP (26).

Los primeros cuatro dominios tienen conservadas las secuencias habituales, pero el quinto dominio es aberrante. Este dominio tiene una inserción de 6 residuos, una extensión de 19 residuos en el extremo C-terminal y un puente disulfuro adicional que incluye una cisteína C-terminal. Estos aminoácidos adicionales en el dominio V son los responsables de la característica distintiva del mismo, ya que constituyen un parche extenso con carga positiva que determina la afinidad por los fosfolípidos aniónicos. La α_2 -GPI humana contiene cuatro sitios de N-glucosilación (Arg143, Arg164, Arg174 y Arg234) que se localizan en el tercer y cuarto dominios, y un sitio (Thr130) con azúcar "O-linked". Los glucanos acumulan aproximadamente el 20% de la masa molecular total (27).

La estructura como cristal de la α_2 -GPI fue elucidada en 1999 por dos grupos. (28, 29)

Esta estructura de cristal de la proteína muestra un estrecho arreglo de los primeros cuatro dominios, con el dominio V dispuesto en ángulo recto respecto a los otros dominios, como un bastón de hockey. El sitio de unión a fosfolípidos se localiza lateralmente en la base del dominio V. Este sitio tiene dos fragmentos principales, un parche grande con carga positiva con 14 aminoácidos y una asa hidrofóbica, flexible. Esta asa flexible contiene en su región interfacial una secuencia clásica Trp-Lys, confiriéndole la capacidad potencial de insertarse en la membrana (30).

La estructura de cristal de la proteína permite predecir que cuando la β -GPI se une a una capa de lípidos, los dominios I al IV quedan expuestos fuera de la capa de lípidos, con lo que el sitio de unión potencial para los autoanticuerpos contra la β -GPI que se localizan en el dominio I quedan totalmente exhibidos (31).

Algunos experimentos empleando Rayos-X con ángulo pequeño sugieren que la β -GPI, en solución adopta una conformación con un bucle adicional entre los dominios II y III (32). Esta orientación espacial de la β -GPI diferente en solución podría explicar la observación de que los autoanticuerpos anti- β -GPI solo reconocen a la β -GPI cuando se encuentra adherida a la superficie y no en solución (32).

Es probable que la posición de los carbohidratos de los dominios II y III ocultan el epítopo para los autoanticuerpos dirigidos contra el dominio I. La unión de la β -GPI a las superficies aniónicas genera un cambio en su conformación con la exposición del epítopo para los autoanticuerpos. (32, 33)

Recientemente, mediante estudios con microscopía electrónica en presencia y ausencia de anticuerpos, se ha documentado que la β -GPI purificada de plasma puede existir en dos conformaciones diferentes. En el plasma se presenta como una proteína circular en la cual el dominio I interactúa con el dominio V. Después de la interacción con las superficies

aniónicas, la proteína se abre y adopta la conformación en bastón de hockey, que recuerda a la estructura de cristal (34).

Niveles plasmáticos de la β_2 -GPI

La β_2 -GPI se sintetiza predominantemente en los hepatocitos y sus niveles circulantes son variables, entre 50 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (35).

Los niveles plasmáticos de la β_2 -GPI se incrementan con la edad y disminuyen tanto en el embarazo como en pacientes con infarto cerebral o infarto miocárdico (36).

Es interesante que en los pacientes con SAF los niveles de β_2 -GPI se han informado moderadamente elevados (37).

Los niveles plasmáticos de la β_2 -GPI están regulados parcialmente por polimorfismos en la región promotora del gen. Existen diversos polimorfismos de un solo nucleótido en la región promotora del gen, sin embargo se ha identificado solamente dos de ellos (-32C>A y -700>A) que correlacionan con la disminución de niveles plasmáticos. (38, 39)

Se han descrito anticuerpos contra otras proteínas ligadoras de fosfolípidos y con participación en la coagulación, como cierta clase de anticoagulante lúpico que reacciona contra protrombina cuando esta última se encuentra inmovilizada habitualmente en una superficie plástica. Los anticuerpos antiprotrombina (aPT) son en la actualidad susceptibles de medirse (40).

Los anticuerpos dirigidos contra β_2 -GPI o protrombina parecen correlacionar mejor con la morbilidad del SAF que los anticuerpos antifosfolípido en general y se ha especulado que los anticuerpos dirigidos contra ciertos epitopes de estas proteínas podrían ser los predominantemente patogénicos (2) y por lo tanto podrían mejorar la capacidad predictiva de patogenicidad y disminuir o eliminar la necesidad de realizar otras pruebas como los

aCL. Sin embargo, esta propuesta no puede considerarse válida ya que la sensibilidad, especificidad y consistencia de las pruebas de aFL actualmente disponibles no permiten utilizarlas como predictivas de trombosis en un contexto clínico. Además, debe destacarse que aunque existen subgrupos de anticuerpos antifosfolípido que no parecen conferir riesgo de trombosis, como los asociados a infecciones, no se ha demostrado que todos los anticuerpos con reactividad contra fosfolípidos solos no son patogénicos. Así, en un trabajo recientemente publicado se considera que no hay evidencia suficiente para descartar las pruebas clásicas de anticuerpos antifosfolípido a favor de las pruebas que detectan anticuerpos específicos contra proteínas ligadoras de fosfolípidos (2). De hecho, debe considerarse que la interpretación de que los anticuerpos antifosfolípido que no se unen a proteínas son benignos, encuentra sustento mayormente anecdótico y por otro lado, los fosfolípidos por si mismos son de importancia crítica en teorías de patogenicidad actualmente aceptadas (2).

Anticuerpos antifosfolípido y cardiopatía isquémica

Los aCL y otros anticuerpos antifosfolípido se han descrito en ausencia de enfermedad autoinmune y existen varios trabajos que han intentado evaluar la asociación de aFL con enfermedad aterosclerosa de las arterias coronarias manifestada como cardiopatía isquémica, encontrando resultados discordantes (41-58).

Es conveniente recordar que en nuestro país, las enfermedades cardiovasculares representan una de las primeras causas de morbi-mortalidad y que de entre ellas, la cardiopatía isquémica en sus diversas manifestaciones ocupa un lugar predominante. Al revisar la estadística demográfica de morbi-mortalidad para el año 1999, 2006 y 2008 publicada por la Secretaría de Salud en su portal de internet <http://www.ssa.gob.mx>

encontramos la información mencionada. Así, entidades como el infarto al miocardio y angina son causas prominentes de morbi-mortalidad. Estas entidades están estrechamente relacionadas con la enfermedad aterosclerosa, particularmente de arterias coronarias. Actualmente se dispone de medios auxiliares de diagnóstico en estas entidades, ocupando un lugar destacado métodos como electrocardiograma, pruebas sanguíneas para detección de enzimas y proteínas estructurales miocárdicas como troponina I entre otras. Las moléculas involucradas en la respuesta de fase aguda condicionan un componente inflamatorio prominente en enfermedades como artritis reumatoide, endocarditis infecciosa y han sido estudiadas en la cardiopatía isquémica, describiéndose la participación de citocinas y proteínas de fase aguda en especial la proteína C reactiva que es la molécula que podría representar utilidad clínica inmediata. Se ha intentado establecer la asociación entre los niveles de estas moléculas y la evolución clínica de los pacientes, en especial evaluar su valor predictivo para eventos como muerte e infarto miocárdico recurrente, los resultados no han sido concluyentes (57).

En algunos estudios con diseño de casos y controles se ha descrito la asociación entre diferentes tipos de anticuerpos antifosfolípido e infarto del miocardio (41, 53, 54), sin embargo, en otros no se ha encontrado esta asociación (46, 57, 59) . Algunos estudios prospectivos han examinado la asociación entre ciertos aFL e infarto del miocardio, encontrando algunos de ellos el aCL como el anticuerpo asociado (42, 56, 58) aunque otros estudios con diseño aproximadamente equivalente no han encontrado esas asociaciones (48, 50-52). Entre los aFL estudiados se han incluido los anti- β_2 -GPI y los anti-protrombina, los resultados discordantes también los alcanzan a ellos, por lo que la frecuencia de los aFL en pacientes con cardiopatía isquémica requiere de estudios que la determinen con mayor fidelidad.

JUSTIFICACIÓN

Es necesario, para la correcta utilización de la determinación de estos anticuerpos, conocer la frecuencia y coexistencia de aCL, anti α_2 -GPI, anti-protrombina en pacientes con cardiopatía isquémica y pacientes con sospecha y con diagnóstico de SAEP.

Es claro que se requiere determinar la capacidad predictiva de estos anticuerpos para complicaciones de la cardiopatía isquémica, en particular infarto, reinfarto y muerte.

El adquirir los conocimientos mencionados permitiría avanzar en la definición de la utilidad clínica de la determinación de estos anticuerpos, ya que en el estado actual del conocimiento no se justifica su determinación indiscriminada en pacientes con cardiopatía isquémica. Debe considerarse el aspecto costo-beneficio y desde el punto de vista de investigación en el laboratorio clínico es necesario primero definir si es útil hacer estas determinaciones de aFL y segundo, cuales serían los aFL indicados.

OBJETIVO

Identificar la frecuencia, coexistencia y valor predictivo de desenlace de los aCL, anti- α_2 -GPI y anti-PT en pacientes con cardiopatía isquémica

MATERIAL Y MÉTODO

Pacientes con Cardiopatía Isquémica.

Se incluyeron los casos consecutivos que ingresaron a la Unidad Coronaria del INCICH y en los cuales el cardiólogo tratante estableció en el expediente clínico el diagnóstico de cardiopatía isquémica. El estudio habitual de estos pacientes incluyó electrocardiograma, estudios de laboratorio con biometría hemática, determinación en suero de enzimas (TGO, DHL, CK, CK-MB) y a juicio del cardiólogo tratante estudios como ecocardiograma, angiografía-angioplastía, revascularización coronaria.

Clasificación de pacientes con cardiopatía isquémica.

Se tomaron del expediente clínico los diagnósticos de egreso, estratificando en las siguientes categorías, a) infarto al miocardio b) angina inestable c) sin cardiopatía isquémica demostrable d) varios.

Además de recabar el diagnóstico del expediente, se tomaron datos individuales para clasificación como infarto al miocardio, requiriendo al menos dolor precordial, elevación de CK dos veces sobre el valor normal máximo y desnivel del segmento S-T en el electrocardiograma.

Información clínica asociada a anticuerpos antifosfolípido.

Se recabaron del expediente clínico los datos que permitieron la clasificación eventual del síndrome antifosfolípido (60). Se incluyeron morbilidad obstétrica en su caso, oclusión trombótica o embólica tanto arterial como venosa y trombocitopenia.

Muestra sanguínea para estudios de autoanticuerpos.

Se recuperó el suero de la primera muestra sanguínea disponible enviada al laboratorio de Urgencias durante la admisión y antes de los procedimientos diagnósticos ó terapéuticos. El suero se almacenó a -70°C hasta ser procesado.

Periodo de evaluación para desenlace.

Se consideró la evaluación basal la efectuada durante su internamiento, como evaluación final se consideró la información consignada en el expediente clínico por el cardiólogo de la clínica de seguimiento correspondiente al periodo de 60 a 90 días posteriores al evento mórbido índice. De no estar disponible la información en el periodo mencionado se tomó la información correspondiente a la consulta mas cercana en tiempo. En los casos sin información disponible, se intentó contactar al paciente o familiares por conducto del Departamento de Trabajo Social del propio Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Definición de desenlace

Se considerará tanto infarto al miocardio como reinfarto, con los criterios de clasificación ya consignados y el otro evento será la muerte. Se empleará el constructo del acumulado de estas variables, se designó como MACE.

Detección de anticuerpos IgG anticardiolipina

El fundamento del ensayo inmunoenzimático ha sido referido previamente (6, 43). con algunas modificaciones (61). El procedimiento consiste en: 1) sensibilizar placas de 96 micropozos con cardiolipina disuelta en etanol y se deja secar en sistema de vacío con atmósfera inerte. 2) Bloquear con amortiguador salino de fosfatos 10 mM pH 7.4 conteniendo

suero de bovino neonato al 10% (PBS.SBN), incubar a temperatura ambiente. 3) Lavar cuatro veces con amortiguador salino de fosfatos 10 mM pH 7.4 sin suero bovino (PBS), 300 μ L/pozo/lavado. 4) Añadir por triplicado 100 μ L de la dilución 1:100 del suero del paciente en PBS.SBN, incubar 1 hora a temperatura ambiente. 5) Lavar cuatro veces 6) Se agrega IgG conjugada con peroxidasa, reactiva contra IgG humana, se incuba por 15 minutos, se lava con la solución amortiguadora con 4 repeticiones. Se agrega la solución que contiene el sustrato de la peroxidasa, TMB (3, 3', 5, 5'.tetrametilbenzidina). Después de 15 minutos de incubación, la reacción es detenida con una solución acida (HCl). Se lee a 450 nm. El sistema utilizado se encuentra disponible comercialmente (EUROIMMUN, Germany). El fabricante establece como umbral de positividad el valor 12 GPL.

Detección de anticuerpos a α -GPI.

La medición se efectuó en muestras de suero empleando la técnica de ensayo inmunoenzimático. El sistema utilizado se encuentra disponible comercialmente (EUROIMMUN, Germany). Incluye α -GPI inmovilizada en la fase solida de las microplacas de 96 pozos. Se agrega el suero diluido 1:101, en cada pozo y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos. Se efectúa el paso de lavado para eliminar el suero remanente. Se agrega IgG conjugada con peroxidasa, reactiva contra IgG humana, se incuba por 15 minutos, se lava con la solución amortiguadora con 4 repeticiones. Se agrega la solución que contiene el sustrato de la peroxidasa, TMB (3, 3', 5, 5'.tetrametilbenzidina). Después de 15 minutos de incubación, la reacción es detenida con una solución acida (HCl). Se lee a 450 nm. El fabricante establece como umbral de positividad 20 UA (Unidades Arbitrarias).

Detección de anticuerpos anti-protrombina.

La medición se efectuó en muestras de suero empleando la técnica de ensayo inmunoenzimático. El sistema utilizado se encuentra disponible comercialmente (Generic Assays, Dahlewitz, Germany). Incluye protrombina inmovilizada en la fase sólida de las microplacas de 96 pozos. Se agrega el suero diluido 1:101, en cada pozo y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos. Se efectúa el paso de lavado para eliminar el suero remanente. Se agrega IgG conjugada con peroxidasa, reactiva contra IgG humana, se incuba por 15 minutos, se lava con la solución amortiguadora con 4 repeticiones. Se agrega la solución que contiene el sustrato de la peroxidasa, TMB (3, 3', 5, 5'.tetrametilbenzidina). Después de 15 minutos de incubación, la reacción es detenida con una solución ácida (HCl). Se lee a 450 nm. El fabricante establece como umbral de positividad >15 UA.

Calculo del tamaño de la muestra

Utilizando la formula $n = 2PQ(Zr + Zs)^2 / u^2$, en donde $P = P_{control} + P_{tratado} / 2 = 0.05 + 0.25 / 2 = 0.15$,

$$Q = 1 - P = 1 - 0.15 = 0.85; Zr = 1.96; Zs = 0.84$$

$$u = P_{control} - P_{tratado} = 0.20$$

Obtenemos $n = 50$ sujetos por grupo.

Análisis de resultados

Se empleó estadística descriptiva paramétrica y no paramétrica con promedios, desviación estándar, medianas, rangos, valores mínimo-máximos, percentiles. En la estadística inferencial se empleó paramétrica ó no paramétrica según corresponda a la distribución de las variables. Para comparaciones de variables dicotómicas y categóricas, Chi cuadrada, para variables dimensionales prueba t de Student y como alternativa Mann-Wihtney. Así mismo análisis de regresión logística.

RESULTADOS

El número de casos evaluados con síndrome coronario agudo en el periodo de marzo a agosto del 2003 para inclusión en este protocolo fue de 194, de ellos se eliminaron 45 por falta de muestra sanguínea basal e información clínica insuficiente. Se reunieron los requisitos de ser hospitalizados y tener disponible la muestra de suero de su ingreso previo a cualquier invasión diagnóstico–terapéutica en 149 pacientes.

En este grupo incluido de 149 pacientes con SCA (cuadro 1), se tiene una gran dispersión etaria, sin embargo, la mediana se encuentra en la séptima década de la vida. Se confirma 2/3 de sujetos de género masculino.

Cuadro 1. Frecuencia de características demográficas y clínicas al ingreso en 149 pacientes con Síndrome Coronario Agudo	
Edad (Md; VMín a VMáx, en años)	62; 20 a 91
Genero Masculino	101 (68%)
Peso (Kg)	70; 40 a 100
Estatura (m)	1.64; 1.34 a 1.89
Diabetes Mellitus	70 (47%)
Hipertensión Arterial Sistemica	84 (56%)
Dislipidemia	70 (47%)
Tabaquismo	102 (69%)
NYHA	
I	50 (34%)
II	69 (46%)
III	24 (16%)
IV	6 (4%)

La frecuencia de factores de riesgo coronarios reconocidos es elevada, siendo preponderante la de la diabetes mellitus y la hipertensión arterial sistémica en alrededor de la mitad de los sujetos. De igual forma el tabaquismo es representado en 2/3 de la muestra. La alteración de lípidos es también cercana a la mitad de los sujetos. La clase funcional de la New York Heart Association (NYHA) con el 20% de los sujetos en los grados III y IV acumulados.

La evaluación de antecedentes cardiovasculares y potencialmente relacionados al síndrome antifosfolípido fue efectuada en estos pacientes (Cuadro 2); respecto a los primeros, fueron representados en esta muestra por infarto al miocardio previo en la mitad de los casos aproximadamente y una mínima proporción refirió enfermedad vascular cerebral. En cuanto a los segundos, se manifestaron con morbilidad obstétrica, los demás indicadores clínicos fueron casos esporádicos que no marcan tendencia.

Cuadro 2. Frecuencia de antecedentes cardiovasculares y relacionados a síndrome Antifosfolípido al ingreso en 149 pacientes con Síndrome Coronario Agudo	
Síndrome Coronario Agudo IAM-EST IAM-SEST	87 (58%)
Enfermedad Vascular Cerebral	4 (3%)
Perdida Embarazo	9 (Sobre 48 mujeres)
Epilepsia	1 (0.7%)
Trombosis Venosa Profunda	1 (0.7%)
Corea, Livedo, Migraña, Tromboembolia Pulmonar, Oclusion Arterial	0 casos

La frecuencia de los AFL fue baja, siendo prácticamente nula tanto para aCL como para α_2 -GPI. Sin embargo en el caso de aPT, aunque es una frecuencia baja define a un subgrupo de pacientes, y así al considerar la frecuencia acumulada arroja 1/6 de pacientes con este rasgo serológico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia de anticuerpos antifosfolipido acumulados y distribución por inmunoespecificidad; al ingreso en 149 pacientes con Síndrome Coronario Agudo	
Anticuerpos Antifosfolipido Acumulados	21 (14%)
Anticuerpos Anticardiolipina	3 (2%)
Anticuerpos Anti-Beta2 Glucoproteína I	1 (0.7%)
Anticuerpos Anti-Protrombina	17 (11%)

La distribución de los títulos (Cuadro 4) de los AFL obviamente tendió a niveles bajos y solamente en el caso de aPT se tienen varios casos que superan claramente el umbral de positividad, como permite inferirlo la distribución indicada por el elevado valor máximo de esta variable que condiciona una distribución sesgada a la derecha

Como es de esperarse, las moléculas con actividad enzimática de origen cardíaco, directamente involucradas muestran valores elevados como claramente lo muestran en el cuadro 4 las cifras para creatinfosfocinasa (CK) y su fracción miocárdica (CK-MB).

Cuadro 4. Títulos séricos* de moléculas cardíacas y autoanticuerpos al ingreso en 149 pacientes con Síndrome Coronario Agudo	
Moléculas Cardíacas	
CK	164; 12 a 4100
CK-MB	9.2; 1.2 a 300
Troponina I	0.8; 0.01 a 441
Proteína C reactiva alta sensibilidad	22.4; 0.22 a 298
Autoanticuerpos	
Anticuerpos Anticardiolipina (GPL)	1.2; 0.1 a 63
Anticuerpos Anti-Beta2 Glucoproteína I (UA)	1.5; 0.1 a 23
Anticuerpos Anti-Protrombina (UA)	1.1; 0.1 a 76

De igual forma, los niveles de troponina I muestran elevación aunque existen algunos casos que muestran estos valores en el rango normal, lo cual se explica ya que la curva de elevación de estos marcadores estructurales del miocardio pueden elevarse más tardíamente que las enzimas.

Al observar los resultados de las diferentes variables cuando son comparadas en base a la estratificación de subgrupos con y sin anticuerpos Antifosfolípido (Cuadro 5) es claro que no hay diferencias incluyendo a la glucosa, PCRas y factores C3 y C4.

Sin embargo llama la atención que tanto para el IMC como para las cifras de plaquetas se exhibe significancia estadística para una disminución de ambos valores en el subgrupo de pacientes con AFL.

Cuadro 5. Características de pacientes con cardiopatía isquémica al momento de inclusión en el estudio según la presencia de aFL.

Variable	Con aFL (n=21)	Sin aFL (n=128)	p
Sexo Femenino (%)	24	34	.456
Edad (Promedio \pm DE)	62.67 \pm 16.58	62.47 \pm 12.52	.949
Uso de Tabaco (%)	61.9	69.5	.613
DM (%)	57.1	45.3	.352
Dislipidemia (%)	38.1	48.4	.481
HAS (%)	38.1	59.4	.096
IMC >30 (%)	4.8	13.3	.471
Peso en kg (Md; Vmin a Vmax)	65; 40 a 90	70.5; 50 a 100	.419*
Estatura (m)	1.68; 1.34 a 1.83	1.64; 1.45 a 1.89	.451*
IMC	25.15; 17.31 a 30.12	26.44; 18.42 a 38.35	.027*
CK	173; 31 a 1456	161; 12 a 4100	.653*
CK-MB	9.5; 1.8 a 300	8.8; 1.2 a 222	.842*
Troponina I	.9; .01 a 59.6	.7; .01 a 441	.853*
Leucocitos	9400; 5200 a 18700	9250; 3200 a 90000	.719*
Plaquetas (10^3)	188; 71 a 310	228.5; 52 a 693	.018*
PCR-as	18.3; .22 a 298	25.5; .42 a 292	.294*
C3	136; 51.3 a 286	142.5; 38.2 a 302	.659*
C4	27.3; 11.6 a 99.4	32.45; 1.95 a 145	.175*
Factor Reumatoide	20; 20 a 400	20; 20 a 125	.609*

*Obtenido empleando prueba U de Mann-Whitney; Chi cuadrada o Prueba exacta de Fisher según proceda. Md = mediana; VMín = valor mínimo; VMáx = valor máximo; Kg = kilogramos; m = metro; CK = creatinina; CK-MB = fracción miocárdica de la CK; PCRhs = proteína C reactiva de alta sensibilidad; C3 y C4 = fracciones 3 y 4 del complemento. aFL = anticuerpos antifosfolípido

La frecuencia de desenlaces según la presencia de factores de riesgo, objetivo del proyecto, muestra que al considerar la muerte, no hay asociación con ninguno de ellos, incluyéndolos AFL.

Sin embargo, al considerar MACE, solo hay significancia para la asociación de hipertensión, que muestra una menor proporción de MACE, con un riesgo relativo con intervalos de confianza al 95% inferiores a la unidad.

Cuadro 6. Análisis de la medición basal de factores asociados con la ocurrencia de MACE a 90 días

Variable	Con MACE (n=34)	Sin MACE (n=115)	p
Sexo Femenino (%)	32	32	1
Edad (Promedio ±DE)	62.29 ±14.81	62.56 ±12.62	.919
Uso de Tabaco (%)	82.4	64.3	.059
DM (%)	47.1	47	1
Dislipidemia (%)	32.4	51.3	.077
HAS (%)	47.1	59.1	.241
IMC >30 (%)	5.9	13.9	.367
AFL (%)	20.6	12	.261
Peso en kg (Md; Vmin a Vmax)	69; 40 a 97	71.5; 40 a 100	.215*
Estatura (m)	1.64; 1.48 a 1.82	1.64; 1.34 a 1.89	.664*
IMC	25.67; 17.31 ^a a 38.35	26.42; 18.02 a 35.43	.205*
CK	185.5; 36 a 2936	129; 12 a 4100	.056*
CK-MB	14; 2.4 a 300	7.6; 1.2 a 222	.015*
Troponina I	2.09; .02 a 98.5	.3; .01 a 441	.001*
Leucocitos	10750; 5200 a 18700	8800; 3200 a 90000	.001*
Plaquetas (10 ³)	217.5; 71 a 395	222; 52 a 693	.342*
PCR-as	39.65; .91 a 279	19.5; .22 a 298	.016*
C3	134; 68.4 a 214	142; 38.2 a 302	.171*
C4	33.7; 12 a 145	31,2; 1.95 a 99.4	.991*
Factor Reumatoide	20; 20 a 20	20; 20 a 400	.062*

*Calculado con prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney

Md = Mediana; Vmin = Valor mínimo; Vmax = Valor máximo

Análisis de regresión logística

Se efectuó tomando en cuenta las tendencias y la validez clínico-biológica de los factores de riesgo, el modelo incluyó AFL, diabetes, hipertensión, tabaquismo tomando como desenlace MACE, resultando no significativo.

DISCUSION

Los resultados mostrados en nuestro estudio en relación a los datos clínico-demográficos indican una población de pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) que representa en general lo descrito por algunos autores (41, 42, 45, 50).

El predominio del género masculino así como la frecuencia de los factores de riesgo cardiovascular confirman estas descripciones. La baja frecuencia de los anticuerpos aCL y los *a* α -GPI muestra que por lo menos en este grupo de pacientes no son marcadores relevantes al momento del ingreso, independientemente de las características o subgrupos clínicos, se suman así a las descripciones que indican una baja frecuencia de los mismos (46, 48, 57, 59). Sin embargo, en dos recientes informes en la literatura (62, 63) en un grupo de pacientes con SCA estratificados por la presencia o no de coronariopatía en la arteriografía, describen una frecuencia cercana al 40% de AFL a expensas de anticuerpos *a* α -GPI, vale la pena mencionar que en este diseño la prueba no desempeña un papel como elemento predictivo o que indique un riesgo, ya que requiere de conocer primero el resultado de la coronariografía para después describir que se asocia con ciertos desenlaces, esa asociación parece estar dada mas por el resultado de enfermedad coronaria. El otro estudio es un derivado del mismo grupo de pacientes a quienes posteriormente en las

mismas muestras midieron los niveles de complejos circulantes de LDL oxidada/Beta-2 glicoproteína I, la conclusión no es diferente al anterior.

Por otra parte la frecuencia incrementada de los anticuerpos aPT en el presente trabajo, aunque no es un marcador que se asocie a la mayoría de los casos, confirma lo descrito por otros autores (40-45). Al evaluar la asociación de los AFL con MACE, no se identifica significancia estadística. Sin embargo, cuando se estratifica por la presencia de AFL, esta se asocia estadísticamente con menores cifras de IMC y de plaquetas, así como con una menor frecuencia de hipertensión.

Llama la atención la potencial interacción entre AFL y la hipertensión en relación al desenlace (MACE), aunque el análisis de regresión logística elimino relación en las condiciones de este estudio.

CONCLUSIONES

La identificación de eventos aparentemente independientes apoya la investigación en esta línea de marcadores que participen en la patogenia de sistemas efectores que confluyen en diversos momentos, como son la coagulación, inflamación e inmunidad. La ocurrencia de autoanticuerpos que inciden en moléculas procoagulantes así como la documentación del estado trombofílico que acompaña a la aterosclerosis- cardiopatía isquémica indica que es pertinente incluir pruebas que permitan monitorear diferentes momentos de las vías patogénicas potencialmente activadas (62-65). Así, la determinación de activación de trombina y determinación de dímeros-d permitirá conocer un panorama general de fase de amplificación de la coagulación y fibrinólisis (64, 65), la determinación de componentes del sistema inmune deberá incluir autoanticuerpos que incluyan los que actúan en la vía de

fibrinólisis así como moléculas de inmunidad innata, especialmente receptores semejantes a Toll (TLR).

PERSPECTIVAS

Es esencial el incrementar el tamaño de la muestra para validar la determinación de todos los marcadores involucrados.

Probablemente documentar el estado de activación de diferentes vías, al momento del ingreso permitirá mejorar el desempeño para estimar el RR del desenlace en estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV: Antiphospholipid antibodies. Clin Rheum Dis 1985;11:591-609.
- 2.- Merrill JT. Antiphospholipid (Hughes) Syndrome. Which antiphospholipid antibody tests are more useful?. Rheumatic Diseases Clinics of North America 2001;27,3:
- 3.- Harris EN: Syndrome of the Black Swan. Br J Rheumatol 1987;26:324-6.
- 4.- Harris EN. Anticardiolipin antibodies and autoimmune disease. Current Opinion Rheumatol 1989;1:215-220
- 5.- Harris EN. Serologic detection of antiphospholipid antibodies. Stroke 1992;23:S13
- 6.- Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Hidden anti-phospholipid antibodies in normal human sera circulate as immune complexes whose antigen can be removed by heat, acid, hypermolar buffers or phospholipase treatments. Eur J Immunol 1998;28:2108-2114.
- 7.- Celli CM, Gharavi AE, Chaimovich H. Opposite beta2-glycoprotein I requirement for the binding of infectious and autoimmune antiphospholipid antibodies to cardiolipin liposomes is associated with antibody avidity. Biochim Biophys Acta 1999;1416:225-238.

- 8.- Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, Outt HH, Harris EN, Vilardell-Torres M, Hughes GRV: The “primary” antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:366-74.
- 9.- Hunt JE, Adelstein S, Krilis SA. New basic aspects of the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12:661-8.
- 10.- Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV: Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and antiphospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46:1-6.
- 11.- Schultz DR. Antiphospholipid Antibodies: Basic Immunology and Essays. *Sem Arthritis Reum* 1997;26,5.724-739.
- 12.- Schultze HE, Heide K, Haupt H. U”ber ein bisher unbekanntes niedermolekularis b2-globulins des human serums. *Naturwissenschaften* 1961; 48: 719.
- 13.- Haupt H, Schwick HG, Störiko K. [On a hereditary beta-2-glycoprotein I deficiency]. *Humangenetik*. 1968;5(4):291-3. German. PubMed PMID: 5670607.
- 14.- A ar C, de Groot PG, Levels JH, Marquart JA, Meijers JC. Beta2-glycoprotein I is incorrectly named apolipoprotein H. *J Thromb Haemost*. 2009 Jan;7(1):235-6. Epub 2008 Nov 11. PubMed PMID: 19017258.

- 15.- 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 USA* 1990; 87: 4120–4.
- 16.- Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, De Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies (ACA) are directed not to cardiolipin but to a plasma cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544–7.
- 17.- Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease (letter). *Lancet*. 1990;336:177–8.
- 18.- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi D, Branch W, Brey RL, Cervera R, Derksen RHWM, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the preliminary classification criteria for antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295–306.
- 19.- Willems GM, Janssen MP, Pelsers MAL, Comfurius P, Galli M, Zwaal RFA, Bevers E. Role of divalency in the high affinity binding of cardiolipin antibody–beta-2-glycoprotein I complexes to lipid membranes. *Biochemistry* 1996; 35: 13833–42.
- 20.- Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, Bossi F, Ziller F, Sblattero D, Meroni P, Tedesco F. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-

glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* 2005; 106:2340–6.

21.- Romay-Penabad Z, Montiel-ManzanoMG, Shilagard T, Papalardo E, Vargas G, Deora AB, Wang M, Jacovina AT, Garcia-Latorre E, Reyes-Maldonado E, Hajjar KA, Pierangeli SS. Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects in vitro and in vivo. *Blood* 2009; 114: 3074–83.

22.- Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna YS, Girardi G, Herz J, Urbanus RT, de Groot PG, Thorpe PE, Salmon JE, Shaul PW, Mineo C. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte–endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via b2GPI and apoER2. *J Clin Invest* 2011; 121:120–31.

23.- Romay-Penabad Z, Aguilar-Valenzuela R, Urbanus RT, Derksen RHW, Pennings MTT, Papalardo E, Shilagard T, Vargas G, Hwang Y, deGroot PG, Pierangeli SS. Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in murine model of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2011; 117: 1408–14.

24.- Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermynen J, Hoylaerts MF, Arnout J. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood* 2003; 101:157–62.

- 25.- Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 2011; 17: 317–29.
- 26.- Lozier J, Takahashi N, Putman FW. Complete amino acid sequence of human plasma b2-glycoprotein I. Molecular cloning and mammalian expression of human beta 2-glycoprotein I cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 81: 3640–4.
- 27.- Kristensen T, Schousboe I, Boel E, Mulvihill EM, Hansen RR, Møller KB, Møller NP, Sottrup-Jensen L. Molecular cloning and mammalian expression of human beta 2-glycoprotein I cDNA. *FEBS Lett* 1991; 289: 183–6.
- 28.- Bouma B, de Groot PG, van der Elsen JMH, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink MJA, Derksen RHW, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human b2-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18: 5166–74.
- 29.- Schwartzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Crystal structure of human b2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J* 1999; 18: 6228–31.
- 30.- de Planque MR, Kruijtz JA, Liskamp RM, Marsh D, Greathouse DV, Koeppe RE 2nd, de Kruijff B, Killian JA. Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane alpha-helical peptides. *J Biol Chem* 1999; 274: 20839–46.

- 31.- de Laat B, Derksen RHW, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG. Pathogenic anti-b2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of b2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood* 2006; 107: 1916–24.
- 32.- Hammel M, Kriechbaum M, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Solution structure of human and bovine beta(2)-glycoprotein I revealed by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* 2002; 321: 85–97.
- 33.- Kondo A, Miyamoto T, Yonekawa O, Giessing AM, Østerlund EC, Jensen ON. Glycopeptide profiling of beta-2-glycoprotein I by mass spectrometry reveals attenuated sialylation in patients with antiphospholipid syndrome. *J Proteomics* 2009; 73: 123–33.
- 34.- Agar C, van Os GM, Mörögelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, Derksen RH, Meijers JC, de Groot PG. Beta2-Glycoprotein I can exist in two conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116:1336–43.
- 35.- Rioche M, Masseyeff R. Synthesis of plasma beta 2 glycoprotein I by human hepatoma cells in tissue culture. *Biomedicine* 1974; 21:420–3.
- 36.- Lin F, Murphy R, White B, Kelly J, Feighery C, Doyle R, Pittock S, Moroney J, Smith O, Livingstone W, Keenan C, Jackson J. Circulating levels of beta2-glycoprotein I in thrombotic disorders and in inflammation. *Lupus*. 2006;15(2):87-93. PubMed PMID: 16539279.

- 37.- Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA, Hunt JE, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM. Patients with anticardiolipin antibodies with and without antiphospholipid syndrome: their clinical features and beta 2-glycoprotein-I plasma levels. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 482–7.
- 38.- Kamboh MI, Manzi S, Mehdi H, Fitzgerald S, Sanghera DK, Kuller LH, Atson CE. Genetic variation in apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I) affects the occurrence of antiphospholipid antibodies and apolipoprotein H concentrations in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1999; 8: 742–50.
- 39.- Suresh S, Demirci FY, Lefterov I, Kammerer CM, Ramsey-Goldman R, Manzi S, Kamboh MI. Functional and genetic characterization of the promoter region of apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). *FEBS J* 2010; 277: 951–63.
- 40.- Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Palosuo T, Vaarala O. Antibodies to prothrombin crossreact with plasminogen in patients developing myocardial infarction. *Br J Haematol* 1998 Feb;100(2):374-9
- 41.- Vaarala O, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L, Puurunen M, Aho K, Palosuo T. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995;91,1:23-27.
- 42.- Vaarala O, Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Aho K, Palosuo T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost.*

1996Mar;75(3):456-9.

43.- Palosuo T, Virtamo J, Haukka J, Taylor PR, Aho K, Puurunen M, Vaarala O. High antibody level to prothrombin imply a risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in middle-aged-men—a nested case-control study. *Thromb Haemost* 1997;78(4):1178-82.

44.- Ludia C, Domenico P, Monia C, Emilia A, Sandra F, Agatina AL, et al. Antiphospholipid antibodies: a new risk factor for restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty?. *Autoimmunity* 1998;27,3:141-148

45.- Vaarala O. Antiphospholipid antibodies and myocardial infarction. *Lupus* 1998;7, Suppl 2:S132-134

46.- Erkkilä AT, Närvänen O, Lehto S, Uusitupa MIJ, Ylä-Herttuala S. Autoantibodies against oxidized Low-Density lipoprotein and cardiolipin in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:204-209.

47.- Yilmaz E, Adalet K, Yilmaz G, Badur S, Erzengin F, Koylan N, Ozsaruhan O, Ertem G, Buyukozturk K. Importance of serum anticardiolipin antibody levels in coronary heart disease. *Clin Cardiol* 1994;17:117-121.

- 48.- Phadke KV, Phillips RA, Clarke DT, Jones M, Naish P, Carson P. Anticardiolipin antibodies in ischaemic heart disease: marker or myth?. *Br Heart J.* 1993 May;69(5):391-4.
- 49.- Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert AK. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):3159-63.
- 50.- Sletnes KE, Smith P, Abdelnoor M, Arnesen H, Wisloff F. Antiphospholipid antibodies after myocardial infarction and their relation to mortality, reinfarction, and non-haemorrhagic stroke. *Lancet.* 1992 Feb 22;339(8791):451-453.
- 51.- De Caterina R, d'Ascanio A, Mazzone A, Gazzetti P, Bernini W, Neri R, Bombardieri S. Prevalence of anticardiolipin antibodies in coronary artery disease. 1990;65(13):922-923.
- 52.- Tsakiris DA, Marbet GA, Burkart F, Duckert F. Anticardiolipin antibodies and coronary heart disease. *Eur Heart J.* 1992 Dec;13(12):1645-8.
- 53.- Zuckerman E, Toubi E, Shiran A, Sabo E, Shmuel Z, Golan TD, Abinader E, Yeshurun D. Anticardiolipin antibodies and acute myocardial infarction in non-systemic lupus erythmatosus patients: a controlled prospective study. *Am J Med.* 1996 Oct;101(4):381-6.

- 54.- Sherer Y, Shemesh J, Tenenbaum A, Praprotnik S, Harats D, Fisman EZ, Blank M, Motro M, Shoenfeld Y. Coronary calcium and anti-cardiolipin antibody are elevated in patients with typical chest pain. *Am J Cardiol.* 2000 Dec 15;86(12):1306-11.
- 55.- Farsi A, Domeneghetti MP, Fedi S, Capanni M, Giusti B, Marcucci R. High prevalence of anti.beta2 glycoprotein I antibodies in patients with ischemic heart disease. *Autoimmunity* 1999;30,2:93-98.
- 56.- Bili A, Moss AJ, Charles WF, Zareba W, Watelet LFM, Sanz I. Anticardiolipin antibodies and recurrent coronary events. A prospective study of 1150 patients. *Circulation* 2000;102:1258-1263.
- 57.- Bogaty P, Robitaille NM, Solymoss S, Boyer L, Auger D, Labbe L, Simard S, Rail J, Genest J Jr, Turgeon J. Atherogenic, hemostatic, and other potential risk markers in subjects with previous isolated myocardial infarction compared with long-standing uncomplicated stable angina. *Am Heart J.* 1998 Nov;136(5):884-893.
- 58.- Brey RL, Abbott RD, Curb JD, Sharp DS, Ross GW, Stallworth CL, Kittner SJ. beta(2)-Glycoprotein 1-dependent anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and myocardial infarction: the honolulu heart program. *Stroke.* 2001 Aug;32(8):1701-6.
- 59.- Cortellaro M, Boschetti C, Cardillo M, Barbui T. Antiphospholipid antibodies in patients with previous myocardial infarction. *Lancet.* 1992 Apr 11;339(8798):929-30

60.- Wilson WA. Classification criteria for antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 2001;27,3:499-505.

61.- Nava A, Bañales JL, Reyes PA: Effect of Heat Inactivation and Sheep Erythrocyte Adsorption on the Titer of Anticardiolipin Antibodies in Primary Antiphospholipid Syndrome and Healthy Blood Donors' Sera. *J Clin Lab Anal* 1992;6:148-50.

62.- Greco TP, Conti-Kelly AM, Greco T Jr, Doyle R, Matsuura E, Anthony JR, Lopez LR. Newer antiphospholipid antibodies predict adverse outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2009 Oct;132(4):613-20. PubMed PMID:19762540.

63.- Greco TP, Conti-Kelly AM, Anthony JR, Greco T Jr, Doyle R, Boisen M, Kojima K, Matsuura E, Lopez LR. Oxidized-LDL/beta(2)-glycoprotein I complexes are associated with disease severity and increased risk for adverse outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Am J Clin Pathol.* 2010 May;133(5):737-43. PubMed PMID: 20395520.

64.- Borissoff JI, Heeneman S, Kiliñç E, Kassák P, Van Oerle R, Winckers K, Govers-Riemslog JW, Hamulyák K, Hackeng TM, Daemen MJ, ten Cate H, Spronk HM. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation.* 2010 Aug 24;122(8):821-30. Epub 2010 Aug 9. PubMed PMID: 20697022.

65.- Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res.* 2009 Jun 1;82(3):392-403. Epub 2009 Feb 19. Review. PubMed PMID: 19228706.