

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

“EXPRESION DE FACTOR TISULAR
Y
NIVELES SERICOS DE ANTICUERPOS ANTI
LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD OXIDADA
EN EL
SINDROME ANTIFOSFOLIPIDO PRIMARIO”

Tesis presentada por Alberto Rivera Gallego para aspirar al grado de
Doctor en Medicina

Barcelona, 2000

Este trabajo de investigación ha sido realizado con la ayuda de la beca del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad de España (96/1597).

“A mis Padres, que con cariño, amistad y comprensión, han sabido encauzarme al lugar donde estoy; a mi mujer, por el amor y apoyo que me da y a mis hijos, que son la felicidad y el estímulo para continuar luchando”.

D. CESAR MARTINEZ VAZQUEZ, Doctor en Medicina,
Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de
Santiago de Compostela.

CERTIFICO: que el presente trabajo de investigación
titulado “Expresión de factor tisular y niveles séricos de
anticuerpos anti lipoproteína de baja densidad oxidada en
el síndrome antifosfolípido primario”, ha sido realizado
bajo mi dirección por D. Alberto Rivera Gallego y reúne
las condiciones de originalidad y rigor científicos
necesarios para ser presentado como tesis doctoral, con el
fin de optar al grado de doctor en medicina.

Y, para que así conste, expido y firmo el presente
certificado.

Barcelona, Febrero del 2000

Fdo: Dr D. César Martínez Vázquez

D. JAUME GUARDIA MASSO, Doctor en Medicina,
Catedrático de Medicina de la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICO: que el presente trabajo de investigación
titulado “Expresión de factor tisular y niveles séricos de
anticuerpos anti lipoproteína de baja densidad oxidada en
el síndrome antifosfolípido primario”, ha sido realizado
bajo mi tutela por D. Alberto Rivera Gallego y reúne las
condiciones de originalidad y rigor científicos necesarios
para ser presentado como tesis doctoral, con el fin de optar
al grado de doctor en medicina.

Y, para que así conste, expido y firmo el presente
certificado.

Barcelona, Febrero del 2000

Fdo: Dr D. Jaime Guardia Massó

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar expresar mis más sincero agradecimiento a la persona que ha depositado toda su confianza en mi, asumiendo la dirección de esta tesis, el **Dr. César Martínez Vázquez**. Con paciencia, dedicación, trabajo y profesionalidad, ha sido el maestro del que he obtenido los consejos necesarios para llevar a término el presente trabajo.

Al **Profesor D. Jaume Guardia Massó**, por haber asumido la tutoría y sin cuyo apoyo, sabiduría y consejos no hubiera podido iniciar y culminar esta tesis.

Al **Dr Josep Ordi-Ros**, quién para mi es el introductor en el mundo del síndrome antifosfolípido y al **Dr Miguel Vilardell Tarrés**. Su apoyo material ha sido imprescindible en la ejecución del trabajo, así como, sus consejos, atinadas críticas y su aliento.

A los **Dres Khamashta y Hughes** (Lupus Research Unit, St thomas Hospital, Londres) y **Rayo Llerena**, cuya contribución técnica ha sido esencial.

Al **Profesor D. Carlos Fernández Jardón**, por su contribución al diseño y análisis estadístico del estudio.

Al **Dr Bernardo sopeña Pérez-Argüelles**, por su inestimable apoyo tanto humana como científica a lo largo de estos años.

A la dirección del **Complejo Hospitalario Xeral-Ciés**, por la ayuda y facilidades que en todo momento han prestado para la ejecución del presente proyecto.

INDICE

I.- INTRODUCCION.....	1
I.1.- RECUERDO HISTORICO	2
I.2.- INMUNOLOGIA DEL SAF	4
2.1.- β 2-GLICOPROTEINA I	4
2.2.- ANTICUERPOS ANTIPROTROMBINA.....	6
2.3.- OTROS ANTIGENOS DIANA	7
I.3.- FACTOR TISULAR	9
3.1.- LOCALIZACION DEL FACTOR TISULAR.....	10
3.2.- PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL FACTOR TISULAR	10
3.2.1.- FT y hemostasis.....	10
3.2.2.- Expresión de FT en monocitos periféricos	11
3.2.3.- FT y trombosis venosa.....	12
3.2.4.- FT, aterosclerosis y trombosis arterial.....	13
3.2.5.- Otras funciones del FT.....	14
I.4.- LDL – ox	16
4.1.- CONCEPTO	16
4.2.- FORMACION DE LA LDL – ox.....	17
4.3.- LUGAR DE MODIFICACION DE LA LDL	18
4.4.- LDL –ox Y ATEROGENESIS.....	18
4.4.1.- Incremento de la captación de colesterol por los macrófagos	19

4.4.2.- Provocación de respuesta inmune	19
4.4.3.- Alteraciones de la coagulación y de las propiedades de la pared arterial	20
II.- HIPOTESIS DE TRABAJO	22
III.- OBJETIVOS.....	25
IV.- PACIENTES Y METODOS.....	27
IV.1.- PACIENTES	28
1.1.- CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE TROMBOSIS	28
1.2.- GRUPO CONTROL	29
IV.2.- METODOS	30
2.1.- DETERMINACIONES GENERALES	30
2.2.- ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA	30
2.3.- ANTICOAGULANTE LUPICO	31
2.4.- ANTICUERPOS ANTI β 2-GLICOPROTEINA I.....	31
2.5.- ANTICUERPOS ANTI LDL – ox.....	32

2.6.- EXPRESION DE ANTIGENO DE FACTOR TISULAR	
EN MONOCITOS.....	33
2.6.1.- Obtención de células mononucleares de sangre periférica	33
2.6.2.- Incubación con sueros problema	33
2.6.3.- Marcaje con anticuerpo monoclonal anti FT	34
2.6.4.- Lectura de monocitos fluorescentes positivos para	
factor tisular por citometria de flujo	34
2.7.- ANA	35
2.8.- anti-DNA	35
IV.3.- ESTUDIO ESTADISTICO.....	37
V.- RESULTADOS	38
V.1.- DATOS GENERALES	40
1.1.- EDAD Y SEXO DE LOS PACIENTES Y CONTROLES.....	40
1.2.- ANTECEDENTES PERSONALES DE INTERES	40
V.2.- CLINICA	42
2.1.- EVENTOS TROMBOTICOS	42
2.1.1.- Trombosis única	42
2.1.2.- Trombosis de repetición.....	43
2.2.- ABORTOS DE REPETICION	43

2.3.- OTROS EVENTOS	44
V.3.- DATOS DE LABORATORIO.....	45
3.1.- ANA Y anti-DNA	45
3.2.- TROMBOPENIA.....	45
3.3.- ANTICOAGULANTE LUPICO	45
3.4.- LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD (LDL).....	46
V.4.- PARAMETROS OBJETO DE ESTUDIO	49
4.1.- ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA TIPO Ig G.....	49
4.2.- ANTICUERPOS ANTI β 2-GLICOPROTEINA.....	51
4.3.- ANTICUERPOS ANTI LDL-ox	53
4.4.- EXPRESION DE FACTOR TISULAR.....	55
V.5.- CORRELACIONES	57
V.6.- ESTUDIO UNIVARIANTE	65
6.1.- TROMBOSIS	65
6.2.- TROMBOSIS ARTERIAL	66
6.3.- TROMBOSIS VENOSA.....	68
V.7.- ESTUDIO MULTIVARIANTE.....	70
7.1.- TROMBOSIS	70
7.2.- TROMBOSIS ARTERIAL	71
7.3.- TROMBOSIS VENOSA.....	71

VI.- DISCUSION.....	73
VI.1.- MECANISMOS TROMBOTICOS DEL SAF	75
1.1.- VIA DE LA PROTEINA C.....	75
2.2.- PROSTACICLINA / TROMBOXANO	76
2.3.- ANTITROMBINA III.....	77
2.4.- FIBRINOLISIS.....	77
VI.2.- LDL – ox Y SAF.....	79
2.1.- LDL – ox EN EL SAF	79
2.2.- SIGNIFICADO DE LA ELEVACION DE ANTICUERPOS	
ANTI – LDL –ox	81
VI.3.- SAF Y FACTOR TISULAR.....	86
3.1.- FT EN EL SAF	86
3.2.- MECANISMOS DE INCREMENTO DEL FT.....	87
VII.- CONCLUSIONES.....	90
VIII.- BIBLIOGRAFIA	93

I.- INTRODUCCION.

I.1.- RECUERDO HISTORICO.

La asociación de trombosis, tanto venosa como arterial y/o pérdidas fetales de repetición y/o trombopenia con la presencia de autoanticuerpos con afinidad por los fosfolípidos aniónicos (véase anticuerpos anticardiolipina [aCL] y/o anticoagulante lúpico [AL]) se reconoce como síndrome antifosfolípido o síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) (1).

Dicho síndrome puede ocurrir en asociación a lupus eritematoso sistémico (LES) u otras enfermedades autoinmunes (SAF secundario) o en ausencia de dichas patologías denominándose SAF primario (SAFP) (2-4).

El SAF nace con el desarrollo de los tests serológicos para sífilis iniciado en 1907 por Wassermann. La denominación de cardiolipina proviene de la identificación por Pangborn (5) del componente antigénico esencial utilizado para dichos test a partir de corazón de vaca. Con el desarrollo de test serológicos más

específicos para sífilis (6), Moore (7) identifica individuos con falsos positivos, tanto transitoriamente (generalmente asociado a infecciones) como persistentemente, objetivándose en este último caso un alto riesgo de desarrollo de LES o enfermedades relacionadas (8). Finalmente, fueron primero Harris (9) mediante RIA y posteriormente Loizou (10) mediante ELISA, quienes consiguieron detectar directamente los aCL.

En la década de los 50 varios autores (11, 12) describen en pacientes con LES un inhibidor adquirido de la coagulación, acuñándose el término AL años después (13). Aunque denominado anticoagulante por alargar los test de coagulación in vitro y, en principio, descrito en pacientes con hemorragia (11), no se ha demostrado asociación con sangrados anormales (14) y si con fenómenos trombóticos (15, 16), así como con trombocitopenia y muertes fetales de repetición .

Aunque conocido desde décadas, no es hasta los años 80 en que Hughes, Harris y otros autores nos hacen tomar conciencia del SAF (9, 17-21).

I.2.- INMUNOLOGIA DEL SAF.

Aunque en un principio se creyó que el antígeno (Ag) sobre el que actuaban los anticuerpos (Ac) antifosfolípido (AAF) eran los fosfolípidos, hoy en día se considera que son Ac contra proteínas plasmáticas o complejos de éstas con fosfolípidos (22). Entre los múltiples Ac, aquellos frente a beta 2-glicoproteína I (Ac anti β 2-GPI) y antiprotrombina son los más frecuentemente encontrados en pacientes con SAF, aunque otros muchos frente a complejos proteínas-fosfolípido han sido involucrados (23).

2.1.- β 2-GLICOPROTEÍNA I.

En 1990 tres grupos diferentes publican simultáneamente la necesidad de suero o plasma para que se produzca la unión entre los aCL y la cardiolipina (24-26), demostrando que era la beta 2 glicoproteína I (β 2-GPI) el componente necesario para dicha ligazón. Posteriormente se caracterizó el lugar de unión de la β 2-GPI a los fosfolípidos aniónicos, localizándose en el quinto dominio, en un segmento rico en lisina (27, 28).

Descrita en 1961 por Schultze (29), fue Lozier (30) el primero en determinar su secuencia aminoácida. La β 2-GPI es una glicoproteína de 50 kD perteneciente a la familia de proteínas de control del complemento al estar

compuesta por cinco de las secuencias repetitivas o “sushi domains” que las caracterizan (31, 32). Está presente en el plasma a una concentración aproximada de 200 $\mu\text{g/ml}$, circulando, en parte, asociada a lipoproteínas

Posee gran avidéz por los fosfolípidos aniónicos, demostrándose, mediante estudios *in vitro*, inhibición de la fase de contacto de la vía intrínseca de la coagulación (33), la agregación plaquetaria dependiente de la ADP (34), la actividad protrombinasa dependiente de las plaquetas (35) y la generación del factor Xa generado por las plaquetas (36). Debido a lo anterior se le ha adjudicado un papel anticoagulante *in vivo*, aunque en contra de dicho papel estaría que su déficit no se asocia a trombosis (37).

Los aCL, a su vez, pueden unirse a la $\beta 2$ -GPI en ausencia de fosfolípido (38, 39), si en el ELISA utilizado, las placas se irradian previamente. Otros métodos de detección también corroboran este hecho (40, 41). El lugar de unión de los aCL no se conoce por el momento.

Un fenómeno importante en el rol patogénico de la $\beta 2$ -GPI en el SAF es la comprobación de que su presencia distingue los aCL asociados a alteraciones clínico-analíticas de aquellos no patogénicos, que ocurren asociados a infecciones (26, 42). En este sentido, recientes estudios demuestran que los Ac anti $\beta 2$ -GPI se asocian de manera más específica que los aCL a las manifestaciones clínicas del SAF (41, 43, 44). Asimismo, Gharavi et al (45) demuestran la inducción de AAF en ratones y conejos mediante la inmunización previa con $\beta 2$ -GPI.

Por último, una parte de los Ac anti β 2-GPI poseen actividad de AL (46-48).

2.2.- ANTICUERPOS ANTIPROTROMBINA.

Dentro del conjunto de AAF y en el contexto histórico del estudio del AL se encuentran los Ac anti protrombina.

La presencia de AL fue descrita inicialmente por Loeliger (49) y Rapaport (50) en pacientes con LES que presentaban sangrado y disminución de la protrombina plasmática. Bajaj et al (51) son los primeros en describir la presencia de Ac anti protrombina en dos pacientes con AL e hipoprotrombinemia, hecho que posteriormente se confirma en pacientes sin niveles bajos de protrombina (52, 53).

Según el método utilizado su prevalencia en el SAF varía de un 50-55% (placas de ELISA con irradiación _ o con cloruro de polivinilo altamente activado) hasta un 90% (placas de ELISA revestidas con fosfatidilserina) (54, 55).

Aunque los Ac anti β 2-GPI y anti protrombina pueden desempeñar actividad anticoagulante, la alteración de los test de coagulación dependiente de fosfolípido es diferente. Mediante estudios in vitro los Ac anti protrombina

alteran la conversión de protrombina en trombina mediante los factores Xa y Va y la conversión del factor X por los factores IXa y VIII, siendo necesario la presencia de fosfolípidos aniónicos para ambas reacciones, mientras que los Ac anti β 2-GPI únicamente alterarían la conversión de protrombina en trombina (56).

Diferentes estudios han demostrado la asociación de AL con trombosis, hecho conflictivo en los estudios realizados hasta la fecha con Ac anti protrombina (54, 57, 58).

2.3.- OTROS ANTIGENOS DIANA.

Oosting et al (59) encuentran en 7 de 30 pacientes con AAF, Ac frente a complejos fosfolípido-proteína C o S, aunque este hecho no ha sido corroborado por otros autores (60). En cuanto a los niveles de proteína C y S se encuentran resultados discordantes (60, 61). Pengo et al (54) no encuentran asociación de dichos Ac con fenómenos trombóticos, aunque si correlación con los Ac anti protrombina.

Los Ac anti anexina V ha sido investigada por diversos autores encontrándose resultados discordantes (62). Recientemente, Satoh et al (63) encuentran dichos Ac en pacientes con LES y los correlacionan con los episodios trombóticos.

Otro tipo de Ac estudiados son los anti fosfatidiletanolamina, hallándose en algunos pacientes con SAF (64), sugiriéndose que dichos Ac estarían dirigidos contra el complejo fosfatidiletanolamina con kininógeno de alto o bajo peso molecular (65).

Aho et al (66) en su estudio de 146 pacientes con LES encuentran asociación entre Ac anti fosfatidilserina tanto con trombosis como con AL, habiéndose publicado esta última asociación con AL previamente (67). Mediante la inmunización con Ac IgG anti fosfatidilserina en ratón, Yodfat et al (68) fueron capaces de provocar un SAF, sugiriendo, de acuerdo con otros autores (67), que la manera de actuación sería mediante su unión a fosfolípidos impidiendo la formación del complejo protrombinasa-protrombina.

Otros Ac se han encontrado o sugerido en pacientes con SAF (69, 70).

I.3.- FACTOR TISULAR.

El factor tisular (FT) es una glicoproteína de membrana de 295 aminoácidos (aa) que contiene una porción extracelular de 219 aa, una porción transmembrana hidrofóbica de 23 aa y un tallo citoplasmático de 21 aa (71). La parte extracelular funciona como el receptor del factor (F) VII/VIIa (72).

Por sus características estructurales pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas, que incluiría a interferon γ y γ -receptores (73).

Entre sus propiedades, es indudable que es el principal iniciador de la coagulación in vivo al unirse al F VII/VIIa, complejo que activaría tanto al F X como F IX (74). Asimismo, existen datos suficientes que soportan su papel fundamental en la trombosis e inflamación asociada a sepsis, cancer, metástasis y aterosclerosis, así como fuerte sospecha de su rol en la angiogénesis y embriogénesis asociada a tumores (75). Por último se ha sugerido una función como receptor verdadero, mediando en la señal intracelular.

3.1.- LOCALIZACION DEL FACTOR TISULAR.

Por técnicas inmunohistoquímicas se ha localizado en lugares físicamente separados de la circulación sanguínea como barreras tisulares entre el cuerpo y el ambiente y límites entre órganos (ej. Adventicia de vasos sanguíneos y cápsulas fibrosas de hígado, bazo y riñón) (76). Debido a este patrón de distribución, el FT normalmente no se expresa en las cél. sanguíneas y endoteliales y, por lo tanto, solo una injuria vascular activaría la cascada de la coagulación.

A nivel celular, aparte de pericitos y fibroblastos componentes de o que rodean los vasos sanguíneos, gran cantidad de células de diferentes órganos presentan FT como epitelio glomerular, células del sistema nervioso y pulmón, miocitos cardíacos y células de la capa externa de la piel, pared del tracto gastrointestinal, partes del tracto genitourinario y de la placenta (77).

3.2.- PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL FACTOR TISULAR.

3.2.1.- FT y hemostasis.

De acuerdo con lo expresado anteriormente, únicamente una alteración de la barrera normal de las células endoteliales que separa la circulación

sanguínea del FT, provocaría la expresión de FT uniéndose al F VII o VIIa y, posteriormente iniciando la cascada de la coagulación, que llevaría en último término a la formación de trombina y fibrina (78). La parte extracelular del FT serviría como receptor del F VII o VIIa (79) (el lugar de contacto entre F VIIa y FT se extendería desde la base de la parte carboxiterminal hasta la cima de la aminoterminal de la porción extracelular del FT).

La unión FT-F VII/VIIa aparentemente es independiente de la composición lipídica de la membrana en que se ancla el FT. Sin embargo, la potencia con la cual este complejo cataliza la activación de los F X y IX depende fuertemente de la cantidad de fosfolípido aniónico para asociarse con el sustrato (78).

Las primeras cantidades formadas de F Xa son cruciales para la posterior producción de trombina (F II) (80). A su vez, la trombina posee efectos feedback positivos incluyendo la activación del F VIII y V, así como es un potente activador de las plaquetas. Pero el F Xa formado vía FT es rápidamente inactivado por la antitrombina y el inhibidor de la vía del FT (TFPI), mientras que el F Ixa se inactiva más lentamente y se une a las plaquetas activadas por la trombina vía F VIIIa (81).

3.2.2.- Expresión de FT en monocitos periféricos.

Para objetivar la expresión de FT en monocitos se ha utilizado

estimulación con lipopolisacárido (LPS) comprobándose que aunque dicha expresión es constante en un individuo determinado, puede variar hasta 50 veces entre distintas personas. Los individuos con alta expresión, ésta puede estar mediada por la interacción entre plaquetas y monocitos (82).

Los granulocitos incrementarían la expresión del FT inducida por LPS en monocitos al interaccionar con las plaquetas y dicha interdependencia celular se bloquearía con Ac anti P-selectina (83).

3.2.3.- FT y trombosis venosa.

Aunque se desconoce el evento inicial que provoca la trombosis venosa, la activación de la coagulación junto el éstasis serían esenciales en su patogénesis. En situaciones de alto riesgo, como cirugía mayor y trauma, se ha reportado un incremento de la expresión del FT, aunque no se ha correlacionado con la trombosis clínica ni con la activación de la coagulación. Fuera de las anteriores situaciones, la formación del trombo se podría explicar por exposición del FT a la sangre secundario a daño de la pared vascular, activación de células endoteliales y/o reclutamiento de leucocitos activados (75).

El daño de la pared vascular únicamente parece jugar un papel en la trombosis asociada a trauma mayor. Aunque in vivo no se ha demostrado la activación de la coagulación por monocitos, existen trabajos in vitro que demuestran su participación en la formación del trombo en áreas de éstasis (84).

3.2.4.- FT, aterosclerosis y trombosis arterial.

La aterosclerosis es la primera causa de trombosis arterial (85). La mayoría de las células presentes en la placa (endoteliales, mononucleares y musculares lisas) son capaces de sintetizar FT en respuesta a una serie de moléculas implicadas en el proceso de aterosclerosis (citokinas, factores de crecimiento, LDL modificada, etc) (86). En modelos animales ateroscleróticos o bajo dieta aterogénica se ha comprobado incremento de la actividad del FT así como incremento de la actividad procoagulante en respuesta a endotoxina (87, 88). Asimismo se ha comprobado en modelos animales sometidos a isquemia y reperfusión (89).

Los monocitos juegan un papel crucial en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Cuando se transforman en macrófagos en la pared de los vasos son “scavengers” para la LDL-ox. Posteriormente se transformarían en células espumosas (evento más temprano en el proceso de aterosclerosis). Excepto el endotelio, tanto las áreas celulares como acelulares de las lesiones ateroscleróticas expresan FT (86, 90) y existe gran evidencia que la ruptura de la placa está mediada por la expresión de FT que provocaría la formación de trombos (75).

Aunque no existe evidencia de activación del sistema de coagulación en fases tempranas del proceso de aterosclerosis, las plaquetas pueden jugar un papel importante. Las plaquetas activadas por la trombina inducen IL-8 y proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) en monocitos, productos asociados al

desarrollo de aterosclerosis (91).

Trabajos preliminares demostraban que la LDL-ox era capaz de inducir la expresión del FT en células del sistema monocito/macrófago (92) así como en células endoteliales(93). Posteriormente se determinó que la LDL-ox por sí misma no es capaz de inducir el FT, aunque sí aumentar su expresión en presencia de LPS (94). Un mecanismo propuesto sería que los monocitos expuestos a la LDL-ox en la lesión de la íntima de los vasos, en presencia de algún estímulo (LPS u otro) expresarían FT, lo que provocaría el estado de hipercoagulabilidad del proceso aterosclerótico.

3.2.5.- Otras funciones del FT.

Aparte de las expuestas anteriormente, el FT estaría involucrado en otros procesos.

De entre ellos, la coagulación intravascular diseminada (CID) sea la patología en la cual los estudios mejor definen el rol del FT (95). Así, la coagulopatía del anterior proceso se ha logrado prevenir mediante Ac anti FT y anti F VII/VIIa o inhibidor de la vía del FT (95, 96). Parece ser que serían las células del sistema mononuclear fagocítico las que expresarían sustancias promotoras de la coagulación, además de otras, como citocinas que inducirían un estado protrombótico (97).

Existen diferentes publicaciones que avalan que el FT es fundamental en el proceso de formación y crecimiento de tumores sólidos por un proceso distinto al de la activación del sistema de la coagulación por el FT, controlando el balance de los procesos de angiogénesis y antiangiogénesis de las células tumorales (98, 99).

Varios trabajos realizados en embriones FT -/- homocigotos demostraron que el embarazo no pudo ser llevado a término, lo que soporta el papel del FT en el desarrollo embrionario, ya sea por mecanismos asociados a la hemostasis (hemorragia de los vasos sanguíneos embrionarios y extraembrionarios) o por un papel del FT en el desarrollo de los vasos sanguíneos (diferencias de la letalidad de estos embriones con neonatos deficientes de fibrinógeno) (100, 101).

Debido a la similitud estructural con receptores de citocinas se llevaron a cabo estudios que a la postre soportan la función como verdadero receptor del FT (74).

I.4.- LDL-ox.

4.1.- CONCEPTO.

Se ha establecido que cuando la concentración plasmática de colesterol supera los 150 mg/dl, el riesgo de complicaciones de la aterosclerosis se incrementa de forma continua (102). Por otro lado, estudios de prevención primaria como secundario, incluyendo trabajos angiográficos, demuestran que el proceso de aterosclerosis se aminora si se disminuyen las cifras de colesterol plasmático (103).

Sin embargo, existe gran variabilidad en la expresión clínica de la enfermedad ateroembólica dado un nivel de colesterol, diversidad que puede reflejar la fisiopatología compleja y multifactorial de dicha enfermedad.

La estría grasa está considerada como la primera lesión precursora del proceso de aterosclerosis, por lo que la mayoría de la investigación se ha centrado en el proceso de formación de dicha lesión y en el mecanismo por el que los monocitos (principal componente celular de la estría grasa) acumulan colesterol (104).

Golstein et al (105) fueron los primeros en mostrar que la acetilación de

la lipoproteína de baja densidad (LDL) aumenta la captación macrofágica de ésta a través de un nuevo receptor que denominaron “acetil LDL”. Posteriormente se objetivó que otras modificaciones oxidativas de la LDL (LDL-ox) también eran reconocidas por este receptor (106, 107). Mediante cultivos de células endoteliales o musculares lisas se comprobó, que la LDL era oxidada y ésta ocasionaba por un lado, la captación más rápida por parte de los macrófagos y, por otro, era citotóxica para las anteriores células (108).

El incremento en la velocidad de captación de la LDL por los macrófagos, también se consigue mediante otras modificaciones como químicas, formación de autoagregados o complejos con otras moléculas e inmunocomplejos.

4.2.- FORMACION DE LA LDL-ox.

Se ha determinado que la oxidación de la LDL es necesaria para la captación del colesterol por parte del macrófago y su acumulación celular (103). La molécula de LDL está compuesta por una proteína de alto peso molecular (apolipoproteína B), lípidos tanto neutros como polares y antioxidantes (fundamentalmente vitamina E y β -caroteno) .

Aunque se desconoce el proceso in vivo, por estudios in vitro, parece ser

que el proceso oxidativo comenzaría por los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la superficie de la molécula de la LDL. Dicho proceso se extendería a los lípidos del core, afectando a la molécula de colesterol, fosfolípidos, alterando y degradando la apolipoproteína B (apo B) (109). La consecuencia sería la formación de esteroides oxidados, ácidos grasos oxidados y compuestos de éstos con fosfolípidos y proteínas. Se cree que éstos últimos serían los responsables de la creación de epitopos en la apo B, que son los que reconocerían los receptores macrofágicos (110).

4.3.- LUGAR DE MODIFICACION DE LA LDL.

Se asume que la oxidación comenzaría en lugares protegidos de los antioxidantes del plasma, como la íntima arterial. A nivel plasmático, debido a la acción de las sustancias antioxidantes, la LDL se oxida en mínimas cantidades que son retiradas del plasma por las células sinusoidales hepáticas (111).

4.4.- LDL-ox Y ATEROGENESIS.

Con la modificación oxidativa la LDL adquiriría una serie de propiedades que la sustancia nativa no posee y que podríamos clasificar en tres

tipos: incremento de la captación de colesterol por los macrófagos, provocación de respuesta inmune y alteraciones a nivel de la pared arterial y de la coagulación.

4.4.1.- Incremento de la captación de colesterol por los macrófagos.

Las primeras observaciones sobre la LDL-ox comprobaron que ésta era captada de forma aumentada por los macrófagos. Dicho incremento se debe en parte a la incapacidad para degradar la LDL-ox tan rápido como la forma nativa, se cree que debido a alteraciones en enzimas intracelulares producidas por los productos oxidados (112).

4.4.2.- Provocación de respuesta inmune.

Numerosos estudios corroboran la presencia de autoanticuerpos frente a la LDL-ox (Ac anti LDL-ox) tanto en plasma de humanos como animales (113-115), así como la correlación de altos niveles de dichos Ac con la aterosclerosis (116-118). Asimismo, estos Ac reconocen epitopos de la LDL-ox (119) y están presentes dentro de lesiones ateroscleróticas (120).

La LDL al ser mínimamente oxidada es quimiotáctica para los macrófagos, con lo que se formaría un círculo vicioso atrayendo más monocitos que se transformarían en macrófagos con lo que se oxidaría y se acumularía más LDL (102). Este proceso debería, en principio ser beneficioso, pues la función de los macrófagos sería la retirada de productos tóxicos y reparación del daño tisular,

pero la LDL-ox inhibe la motilidad de los macrófagos, con lo que quedarían atrapados (102).

Durante el proceso de oxidación se formarían una serie de productos polares (incluyendo esteroides) que mediarían la citotoxicidad celular evidenciada de la LDL-ox (121).

La LDL-ox provocaría cambios en las células de la pared arterial lo que produciría alteración en la habilidad de éstas para secretar factores quimiotácticos (ej. Proteína I quimiotáctica de monocitos) (122), de crecimiento (como factor estimulador de colonias de macrófagos, granulocito-macrofágicas y granulocíticas) (123) y citocinas (como interleucina I), todos ellos fundamentales en el proceso de aterosclerosis.

4.4.3.- Alteraciones de la coagulación y de las propiedades de la pared arterial.

Diferentes estudios han demostrado que la LDL-ox provocaría estimulación de la agregación plaquetaria (124) y una activación de las vías de la coagulación mediante un incremento de la actividad de la tromboplastina tisular (92) y estimulación de la expresión y secreción del FT por monocitos o células endoteliales (125).

La LDL-ox produciría disfunción endotelial manifestándose por una

alteración de la vasodilatación (126), disminución de la síntesis y liberación de óxido nítrico (127) y niveles elevados de endotelina (128)

II.- HIPOTESIS DE TRABAJO.

Como se ha descrito, el SAF es una enfermedad caracterizada por fenómenos tromboticos, entre otros eventos clínicos, y por la presencia de AAF.

Aunque producto de gran investigación, sobre todo en la última década, el o los mecanismos responsables del estado protrombotico de este síndrome permanece sin dilucidar. En este sentido se han involucrado diferentes mecanismos como son alteraciones de la vía de la proteína C o S, de la fibrinólisis, inhibición de la prostaciclina o alteraciones del endotelio sin que ninguno de ellos logre explicar convenientemente el proceso en su conjunto. El estudio del FT, considerado, hoy en día como el mayor iniciador de la coagulación, en pacientes con SAF, podría explicar el porqué de dicha trombofilia.

Por otro lado, la LDL-ox está considerada como una sustancia

fundamental en el inicio y desarrollo del proceso de aterosclerosis, encontrándose partículas de dicha molécula en placas de ateroma en fase temprana así como favoreciendo la captación macrofágica de LDL y favoreciendo la transformación de estas últimas células en espumosas. Por otro lado, la LDL-ox es inmunógena, provocando la formación de Ac anti LDL-ox, que aparte de ser un marcador de progresión de aterosclerosis y encontrarse en enfermedades inflamatorias, se han aislado en sujetos con LES con y sin SAF. Además, se ha sugerido una reactividad cruzada entre los aCL y los Ac anti LDL-ox.

Hemos diseñado el presente trabajo con el objeto de estudiar el efecto del suero de pacientes con SAF primario en la expresión de FT en monocitos así como la presencia de Ac anti LDL-ox en dichos pacientes. Se intentarán correlacionar estos parámetros con los Ac característicos de ésta enfermedad y se buscará su relación con los episodios trombóticos.

III.- OBJETIVOS.

Se incluyen únicamente un grupo homogéneo de pacientes diagnosticados de SAF primario, caracterizados por presentar al menos un episodio trombótico, ya sea arterial o venoso y por la presencia de aCL IgG.

A todos ellos se realizan las siguientes determinaciones:

- 1.- Ac anti β 2-GPI
- 2.- Ac anti LDL-ox
- 3.- Expresión de FT en monocitos de sangre periférica.

IV.- PACIENTES Y METODOS.

IV.1.- PACIENTES.

Se estudian 35 pacientes, procedentes del Hospital Xeral de Vigo y Vall d'Hebrón de Barcelona, que cumplían criterios diagnósticos de síndrome antifosfolípido primario (129), en base a presentar un episodio trombótico y aCL IgG positivos en al menos dos ocasiones. A todos los pacientes se realizó historia clínica y examen físico descartando la presencia de criterios clínicos de exclusión (1), así como anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti DNA nativo.

1.1.- CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE TROMBOSIS.

Los siguientes procedimientos se realizaron para el diagnóstico de los eventos trombóticos:

Venografía para la trombosis venosa profunda (TVP) .

Gammagrafía pulmonar o arteriografía para el tromboembolismo pulmonar.

Arteriografía para la trombosis arterial, excepto en el territorio cerebral o miocárdico.

Tomografía axial computerizada para el accidente cerebrovascular.

El infarto agudo de miocardio se diagnosticó en base a clínica compatible, elevación de CPK y trastornos electrocardiográficos característicos .

1.2.- GRUPO CONTROL.

Se estudio un grupo de personas sin patología conocida procedentes de una agencia gubernamental. A todos se les explicó la naturaleza del estudio, prestándose voluntariamente.

IV.2.- METODOS.

2.1.- DETERMINACIONES GENERALES.

Todas las extracciones se realizaron antes de las 9 am en ayunas. Para la obtención de suero, la sangre extraída se centrifugó durante 15 minutos a 600 g en una centrífuga de rotores horizontales.

El hemograma, estudio de coagulación y parámetros bioquímicos se realizaron en los laboratorios del hospital de procedencia.

2.2.- ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA.

Los aCL fueron medidos utilizando un ELISA standarizado según está descrito (130).

2.3.- ANTICOAGULANTE LUPICO.

La presencia de AL se determinó según está descrito en plasma pobre en plaquetas (número de plaquetas menor de 10×10^9) mediante el tiempo parcial de tromboplastina activada, tiempo de coagulación de kaolín y tiempo de veneno de víbora de Russell. Únicamente se pudo confirmar su presencia en aquellos pacientes que no estuvieran anticoagulados en el momento del estudio.

2.4.- ANTICUERPOS ANTI BETA 2 GLICOPROTEINA I.

Los Ac anti β 2-GPI fueron detectados por ELISA utilizando β 2-GPI humana como antígeno y placas de ELISA irradiadas según está descrito (131). Resumiendo, microplacas irradiadas (Sumilon Bakelite tipo C, Tokio, Japón) se revistieron con $50 \mu\text{l}$ de β 2-GPI purificada humana a una concentración de $4 \mu\text{g/ml}$ en PBS y se incubaron durante una noche a 4°C . Posteriormente, los pocillos se bloquearon con gelatina al 3% durante una hora a 37°C . Después de tres lavados con PBS-Tween, se añadieron por duplicado $50 \mu\text{l}$ de suero diluido en PBS que contenía 1% de BSA al 1:50. Las placas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente, añadiéndose Ig G de cabra antihumana conjugada con fosfatasa alcalina y sustrato.

2.5.- ANTICUERPOS ANTI LDL-ox.

El aislamiento de LDL, su modificación y la detección de anticuerpos anti LDL-ox fueron realizadas según está descrito (132).

La LDL fue aislada de plasma procedente de adultos sanos por ultracentrifugación de gradiente de densidad. Por hidrólisis ácida de malonaldehído bis dimethylacetal se obtuvo malonaldehído (MDA).

Los anticuerpos anti LDL-ox fueron detectados por ELISA. Las microplacas (Immulon 4) (Dynatech laboratories Inc.) fueron revestidas con MDA-LDL a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS que contenía 2 mM de EDTA (BDH Chemicals Ltd) y 20 μM de hidroxitolueno butilado (Sigma Chemical Co.) e incubadas a 37° C durante 2 horas y posteriormente a 4° C toda la noche. Las placas fueron lavadas con PBS-Tween (Sigma) y los pocillos bloqueados con 150 μl de gelatina al 0.5% (BDH) durante 1 hora a 37° C. Después de 4 lavados, se añadió por duplicado 50 μl de suero diluido con PBS-Tween que contiene 1% de albúmina sérica bovina (BSA) al 1:100. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente y lavadas cuatro veces. Se añadieron 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de la dilución apropiada de IgG antihumana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) en PBS-Tween con 1% de BSA y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de cuatro lavados, se añadieron 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de solución de 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato disódico (Sigma) en buffer dietanolamina 1M, pH 9.8. La densidad óptica a 405 nm (OD405) se midió

mediante un aparato Titretex Multiskan MC (Flow laboratories). Los resultados se expresan como OD405 y la ligazón a la LDL-ox se calcula sustrayendo la OD405 obtenida del pocillo revestido de LDL de aquella del pocillo revestido de MDA-LDL.

2.6.- EXPRESION DE ANTIGENO DE FACTOR TISULAR EN MONOCITOS.

2.6.1.- Obtención de células mononucleares de sangre periférica.

Se extrajo sangre de donantes en tubos de heparina de litio. Esta fue centrifugada sobre un gradiente de Ficoll- Paque a 400 g durante 30 minutos (min). Se recogió la capa de células mononucleares resultante y se lavó con PBS (Phosphate Buffer red Saline) por centrifugación a 400 g durante 10 min., tres veces. Las células finalmente obtenidas, se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 a una concentración final de 10^7 células por mL.

2.6.2.- Incubacion con sueros problema.

Se mezclaron 100 microlitros (μL) de la suspensión de las células obtenidas anteriormente (que corresponde a una concentración de 10^6 células por mL) con 40 μL de suero procedente de los distintos grupos estudio (controles,

pacientes con síndrome antifosfolípido primario y sujetos con infarto de miocardio). Dicha mezcla se incubó durante seis horas en estufa de cultivo a 37° C con 95% de humedad y 5% de CO₂.

Tras la incubación, se lavaron los tubos con la mezcla de células mononucleares y suero de los distintos grupos con PBS por centrifugación a 400 g durante 10 min., dos veces.

2.6.3.- Marcaje con anticuerpo monoclonal anti factor tisular.

Cada uno de los tubos con células obtenidos tras la última sesión se marcaron con 10 μ L de anticuerpo monoclonal antifactor tisular marcado con isocianato de fluoresceína (FITC). Posteriormente, se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente y en oscuridad.

Como control de fluorescencia negativa se utilizó un monoclonal de ratón inespecífico marcado con FITC (laboratorios Becton Dickinson).

Tras la incubación, se añadió un mL de PBS a cada tubo.

2.6.4.- Lectura de monocitos fluorescentes positivos para factor tisular por citometria de flujo.

Se marcó las células mononucleares de un tubo control con anticuerpos monoclonales anti CD14 (marcado con ficoeritrina) y anti CD45 (marcado con

FITC). Posteriormente, se determinó una ventana positiva para CD14 y CD45 (correspondiente a monocitos).

A continuación, se procedió al paso por el citómetro de flujo de los distintos tubos que contenían los distintos sueros problema tras la última modificación descrita en el apartado 3.

Para cada muestra se contaron un total de 1000 monocitos y se dio como porcentaje de monocitos positivos para factor tisular lo que sobrepasaran en fluorescencia a la obtenida con el monoclonal de ratón inespecífico.

2.7.- ANA.

Se determinaron mediante inmunofluorescencia indirecta sobre células HEP-2 (Anafluo®; DiaSorin Inc, Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.), siguiendo la técnica descrita por la casa suministradora.

2.8.- anti-DNA.

Se determinaron mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando organismos *Crithidia luciliae* (nDNA Fluoro-Kit™; DiaSorin Inc, Stillwater, MN

55082-0285 U.S.A.), siguiendo la técnica descrita por la casa suministradora.

IV.3.- ESTUDIO ESTADISTICO.

Los datos utilizando el programa estadístico SPSS 8.0. Las variables cualitativas fueron evaluadas mediante la prueba de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher según estuviera indicado. Los datos cuantitativos se manejaron utilizando la t de student o el test de Mann-Whitney según la distribución fuera normal o no.

Para el estudio de correlaciones se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman.

Mediante un estudio de regresión logística uni y multivariante (inclusión $p < 0.10$ y exclusión $p > 0.15$) se evaluó el riesgo de desarrollar trombosis, catalogado mediante el odds ratio con intervalo de confianza 95% (IC 95%). En las variables cualitativas el riesgo se evaluó en base a la presencia o ausencia del factor, mientras que en las cuantitativas se calculó para incrementos en cinco puntos de las unidades de referencia.

V.- RESULTADOS.

Se presentan en primer lugar las características clínicas y factores predisponentes de enfermedad trombotica. Posteriormente se expondrán los valores de los diferentes parámetros objeto de este estudio. Finalmente se evaluarán, mediante un estudio uni y multivariante, dichos parámetros como factores de riesgo para enfermedad trombotica en los pacientes con SAFP.

V.1.- DATOS GENERALES.

1.1.- EDAD Y SEXO DE LOS PACIENTES Y CONTROLES.

La edad media de los pacientes fue de 39 ± 13 años y la del grupo control de 39 ± 11 años ($t = 0.03$, $p = 0.97$). 23 pacientes (66%) pertenecieron al sexo femenino, no existiendo diferencias con respecto al grupo control ($p = 0.5$).

1.2. ANTECEDENTES PERSONALES DE INTERES.

Los antecedentes de tabaquismo, hipertensión arterial (HTA), obesidad, diabetes Mellitus y toma de anticonceptivos orales (ACO) fueron considerados como variables y se catalogaron como presencia o ausencia del factor. Los resultados se exponen en la tabla 1.

Entre los pacientes, siete eran fumadores, seis obesos y en siete se objetivó HTA siendo las diferencias con respecto al grupo control para estas variables significativas.

Tabla 1. Resultados obtenidos de las variables tabaco, HTA, obesidad, diabetes y toma de anticonceptivos orales.

	Controles		Pacientes		χ^2	p
	N° (%)		N° (%)			
	Si	No	Si	no		
Tabaquismo	0(0)	40(100)	7(20)	28 (80)	8,82	0,003
HTA*	0 (0)	40 (100)	7 (20)	28(80)	8,82	0,003
Obesidad	0(0)	40 (80)	6 (17,1)	29 (82,9)	7,45	0,006
Diabetes	0 (0)	40 (100)	1 (2,9)	34 (97,1)	1,16	0,28
ACO⁺	0 (0)	40 (100)	1 (2,9)	34 (97,1)	1,16	0,28

*HTA: hipertensión arterial

⁺ACO: toma de anticonceptivos orales

V.2.- CLINICA.

2.1.- EVENTOS TROMBOTICOS.

Ningun control presentó trombosis.

Del conjunto de pacientes, 20 presentaron trombosis únicamente venosa, trece en territorio arterial y en dos casos a nivel arterio-venoso.

2.1.1.- TROMBOSIS UNICA.

Un total de 26 pacientes presentaron un único episodio trombótico, distribuyéndose de la siguiente manera : 17 fueron venosos y nueve arteriales.

Con respecto a las trombosis venosas, la afectación ocurrió en extremidades inferiores en 14 ocasiones (diez derechas, tres izquierdas y una bilateral) evidenciándose concomitantemente tromboembolismo pulmonar (TEP) en cinco pacientes. Las tres restantes afectaron a territorio pulmonar, retiniano y extremidad superior izquierda en una ocasión respectivamente.

A nivel arterial se constataron cinco pacientes con accidente cerebrovascular (ACV), dos infartos agudos de miocardio (IAM), una trombosis

de arteria femoral y otra de carótida.

2.1.2.- TROMBOSIS DE REPETICION

En nueve pacientes el fenómeno trombótico recidibó, de los cuales en siete afectó al mismo territorio (venoso o arterial) y en dos a diferente.

Entre los tres pacientes con afectación venosa pura, en el primer episodio dos presentaron afectación femoro-poplítea, objetivándose concomitantemente TEP en ambos, mientras que el tercer paciente solamente se diagnosticó TEP. En los tres casos los episodios secundarios únicamente afectaron al territorio pulmonar.

En los casos con afectación única arterial, la trombosis inicial se detectó en tres casos en forma de ACV y en uno a nivel femoral. Los episodios posteriores consistieron en ACV e IAM en tres y un paciente respectivamente.

2.2.- ABORTOS DE REPETICION.

De las 23 pacientes, en tres se evidenciaron abortos de repetición (al menos tres episodios). Dichas pérdidas ocurrieron en el primer y segundo trimestre del embarazo. Dos pacientes pertenecen al grupo de trombosis arterial y

una al de trombosis venosa.

2.3.- OTROS EVENTOS.

Se encontró Livedo reticularis en cinco pacientes, de los cuales tres pertenecieron al grupo de trombosis arterial y uno al venoso. Asimismo, se objetivó fenómeno de Raynaud en un paciente perteneciente al grupo de trombosis venosa.

V.3.- DATOS DE LABORATORIO.

3.1.- ANA Y anti-DNA.

En 20 ocasiones se detectaron ANA positivo, siendo en todos los casos anti-DNA negativo. Once pacientes pertenecieron al grupo de trombosis venosa y nueve al de arterial.

3.2.- TROMBOPENIA.

Unicamente un paciente presentó trombopenia, perteneciendo al grupo de trombosis venosa.

3.3.- ANTICOAGULANTE LUPICO.

En ninguno de los controles se evidenció TTPa alargado. Con respecto a los pacientes, 17 fueron positivos para anticoagulante lúpico. De estos últimos, nueve pertenecieron al grupo de trombosis venosa, siete al de arterial y uno al

mixto.

3.4.- LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD.

Las medias y errores típicos fueron de 103 ± 5 UI y de 115 ± 6 UI en los controles y casos respectivamente (diferencia no significativa) (figura 1).

Asimismo, en el conjunto de trombosis venosa y arterial fueron de 116 ± 6 UI y 116 ± 12 UI (p no significativa) (figura 2).

Figura 1: Valores correspondientes a la LDL entre casos y controles.

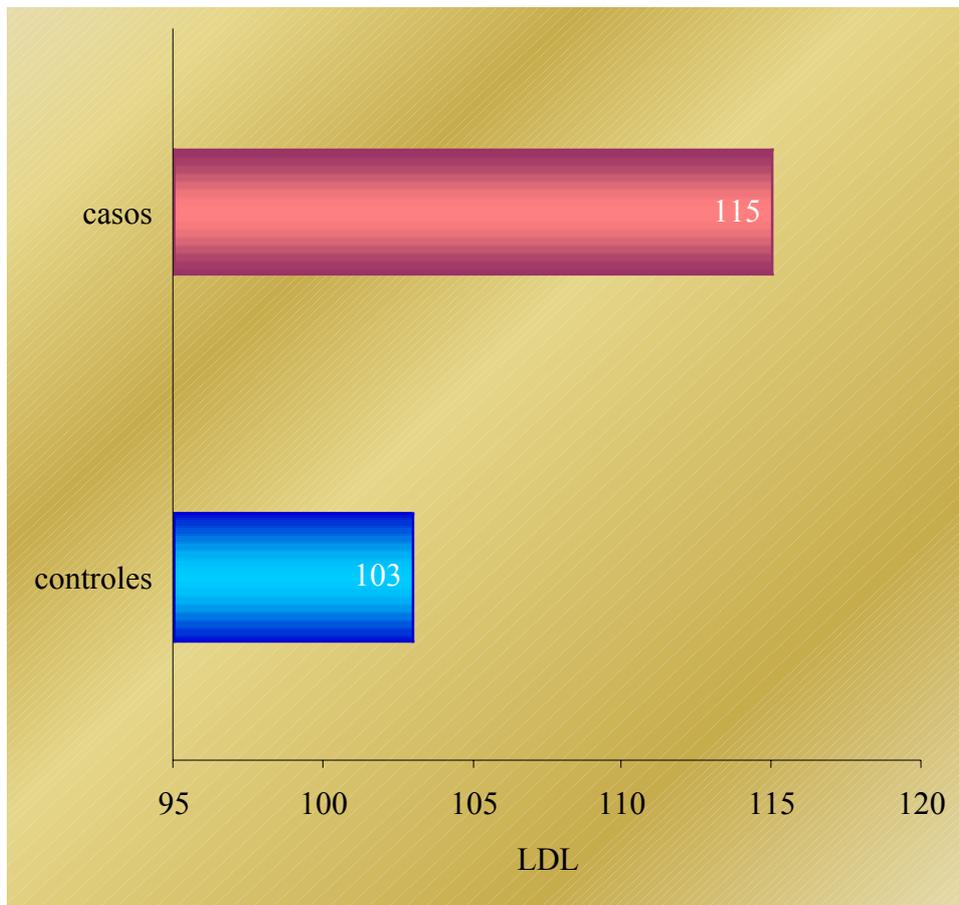
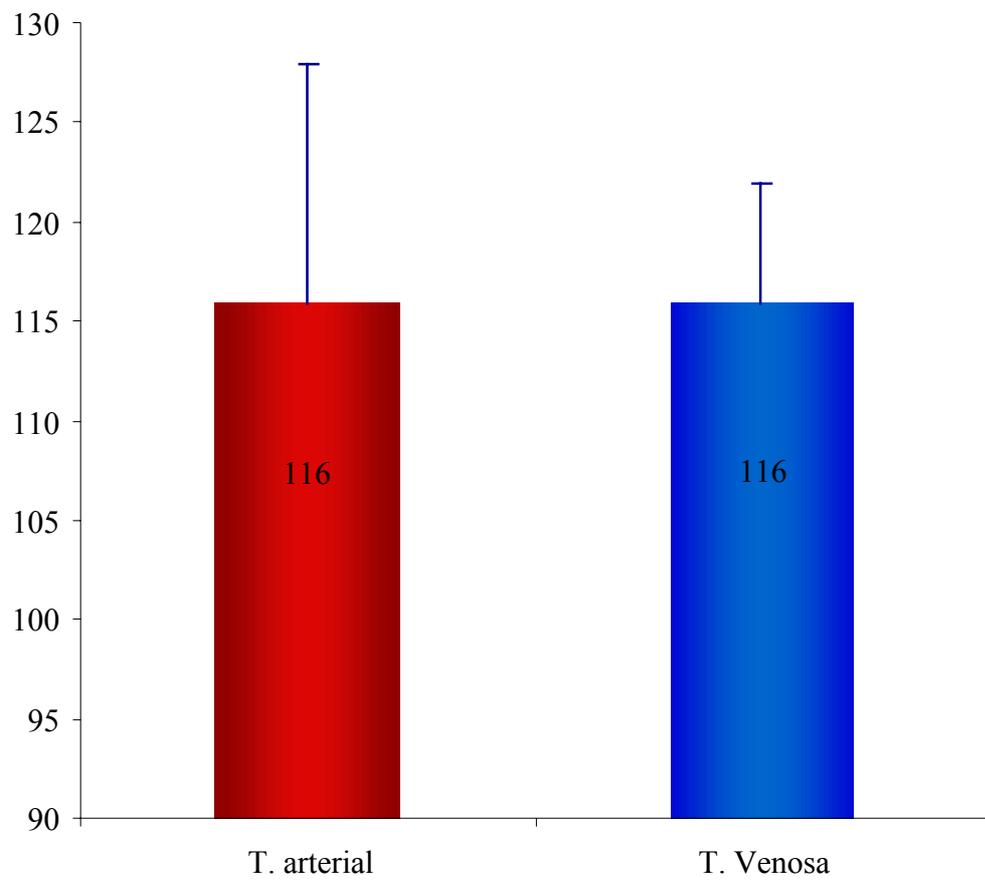


Figura 2: Valores de LDL entre pacientes con trombosis arterial y venosa.



V.4.- PARAMETROS OBJETO DE ESTUDIO.

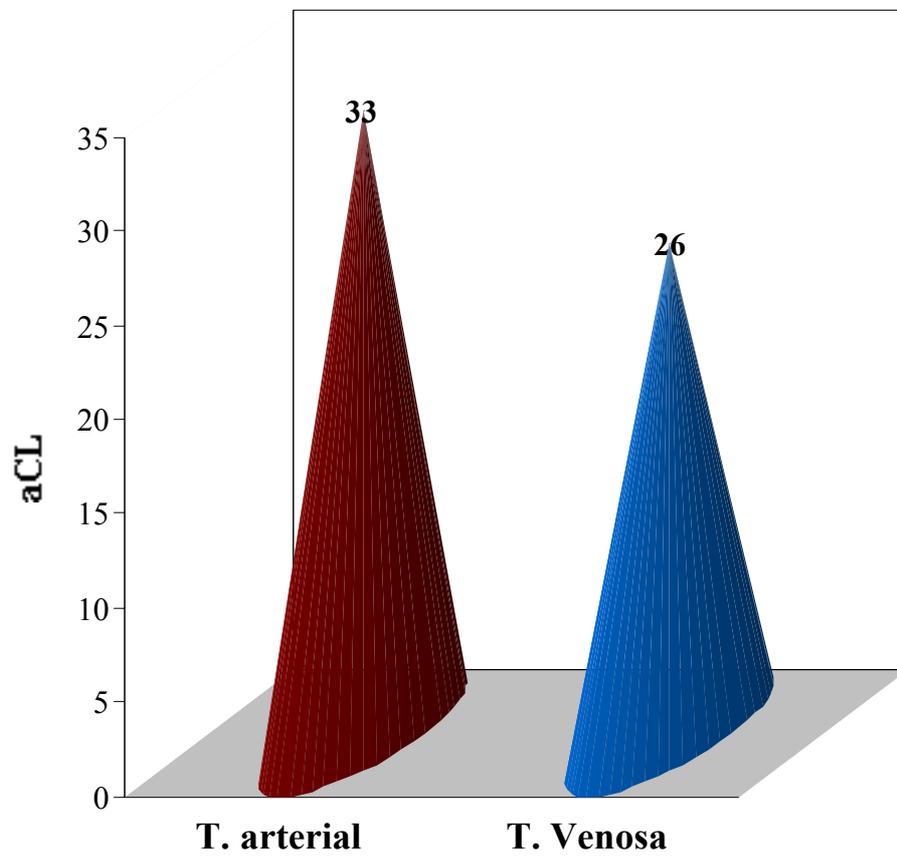
4.1.- ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA TIPO Ig G.

Con respecto a los controles, en un caso se objetivó positividad a títulos bajos (20 GPL).

Debido a los criterios de selección, todos los pacientes fueron positivos para aCL Ig G obteniéndose una mediana de 27 GPL con una amplitud intercuartil de 35 (mínimo de 15 GPL y máximo de 135 GPL).

En el grupo de pacientes con trombosis venosa la mediana y amplitud fueron las siguientes: 26 GPL y 36 GPL (mínimo 15 y máximo 135), mientras que en el grupo de trombosis arterial los valores fueron de 33 GPL y 30 GPL (mínimo 15 y máximo 135) respectivamente. La diferencia entre ambos grupos no fue significativa ($p= 0.77$) (figura 3).

Figura 3: Valores (mediana) de aCL entre pacientes con trombosis arterial y venosa.



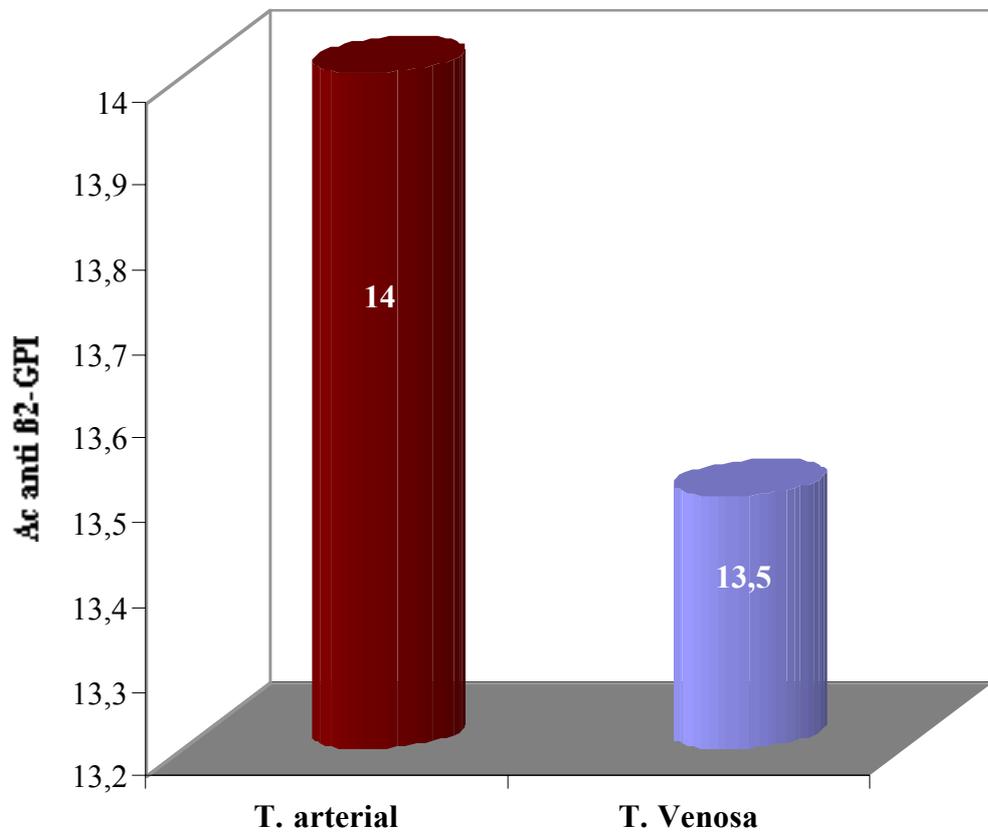
4.2.- ANTICUERPOS ANTI BETA-2-GLICOPROTEÍNA.

Un control fue positivo con un título de 15.

En el grupo de pacientes, el 88% presentaron valores positivos, obteniéndose una mediana de 14 (amplitud 14), con valores distribuidos entre 0 y 90.

Las medianas para los casos con trombosis venosa y arterial fueron de 13.5 y 14 respectivamente (amplitud de 13 y 17.5, respectivamente) ($p= 0.91$) (figura 4).

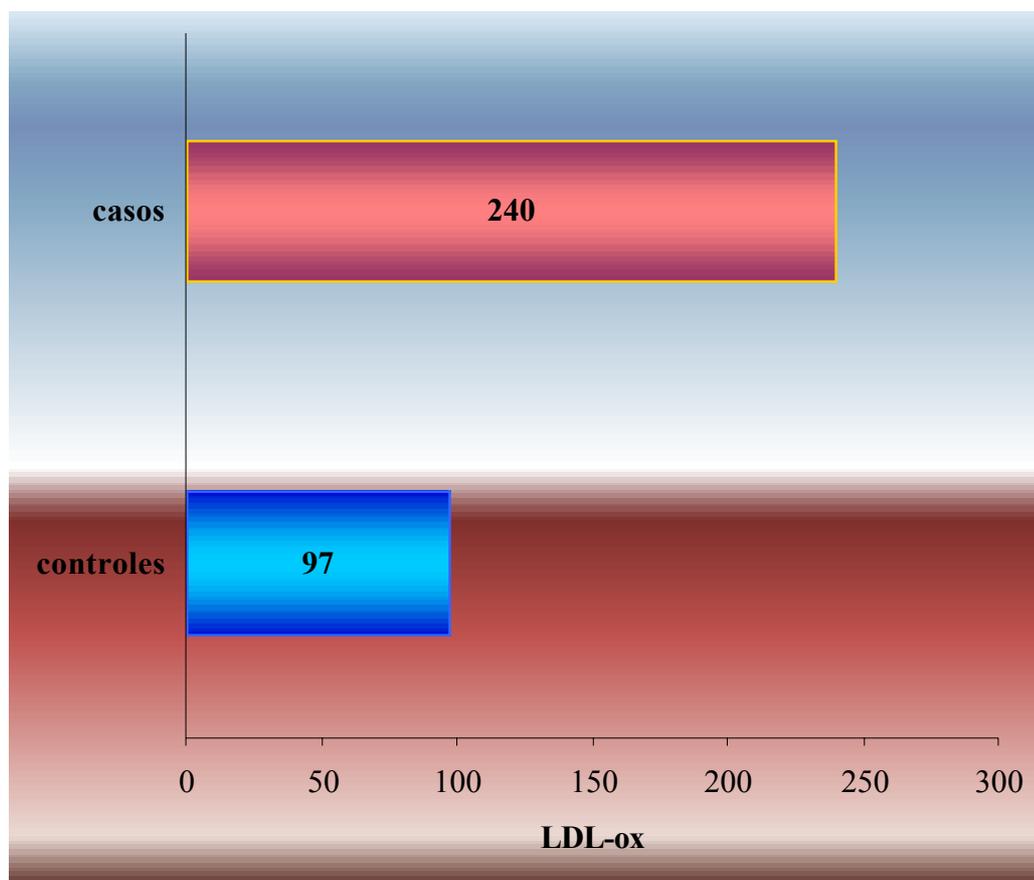
Figura 4: Valores de Ac anti β 2-GPI entre pacientes con trombosis arterial y venosa.



4.3.- ANTICUERPOS ANTI LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD OXIDADA.

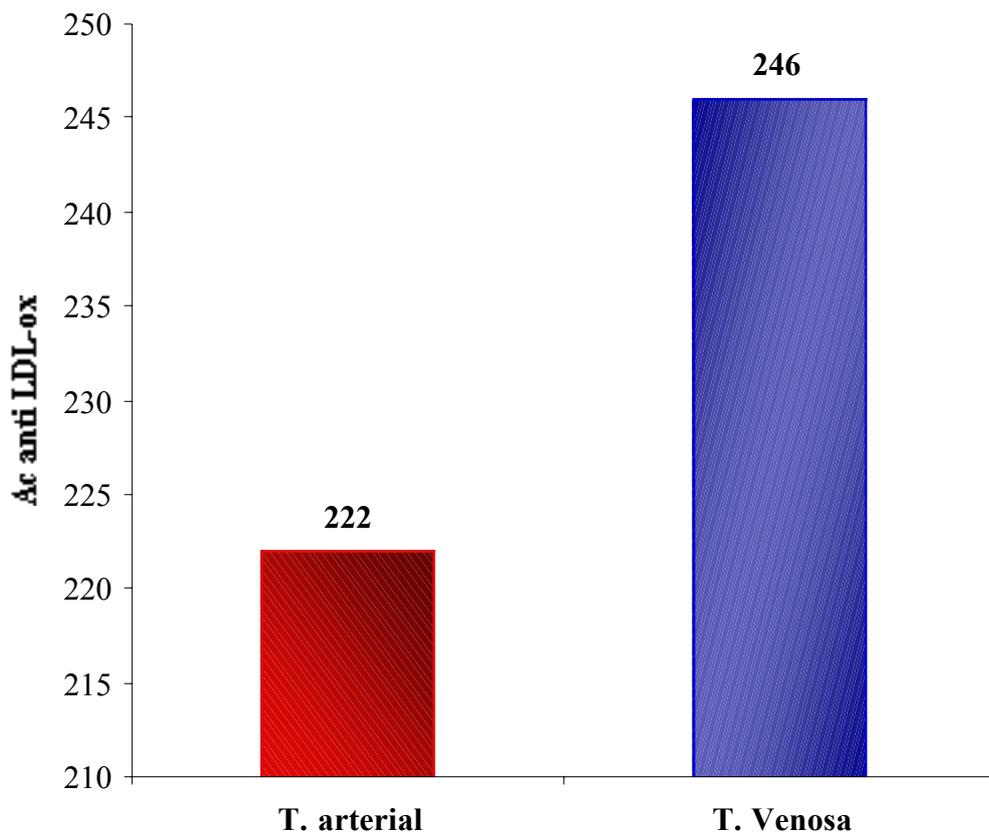
En el grupo control se obtuvo una mediana de 97 OD y una amplitud de 75 OD. En los pacientes, los resultados obtenidos fueron los siguientes: 240 y 158 OD (mediana y amplitud) (mínimo y máximo de 23 y 753 OD). La diferencia fue estadísticamente significativa ($p= 0.000$), (figura 5). Un 65.7% (23) de los pacientes fueron positivos.

Figura 5: Valores (mediana) de Ac anti LDL-ox entre casos y controles.



Nueve pacientes (60%) en el grupo de trombosis arterial y 15 (68%) en el de trombosis venosa presentaron valores positivos. Los resultados obtenidos en los grupos de trombosis venosa y arterial fueron los siguientes respectivamente (expresados en mediana y amplitud): 246 y 143 OD y 222 y 207 OD ($p= 0.29$) (figura 6).

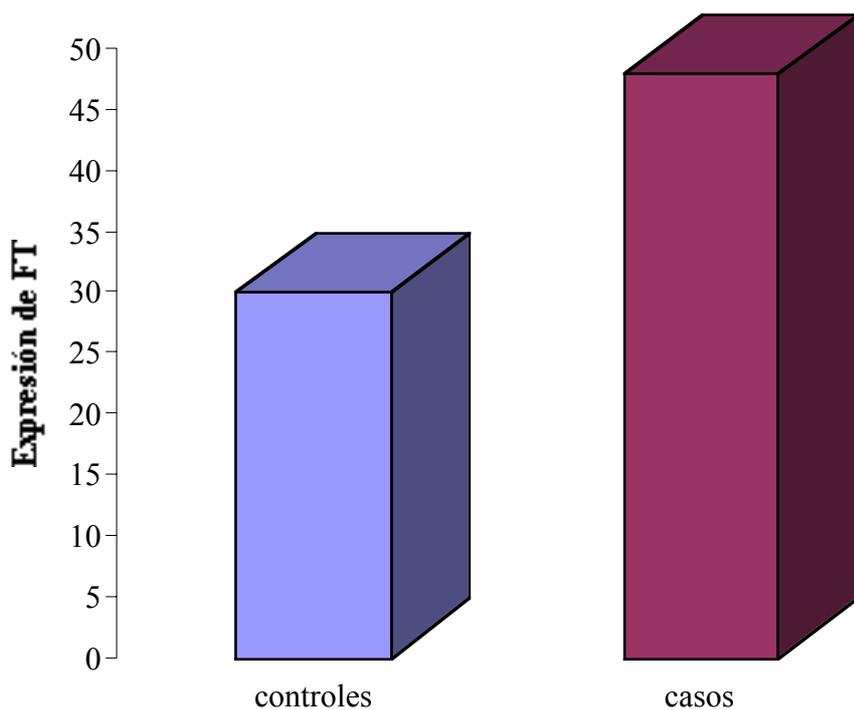
Figura 6: Valores (mediana) de Ac anti LDL-ox pacientes con trombosis arterial y venosa.



4.4.- EXPRESION DE FACTOR TISULAR.

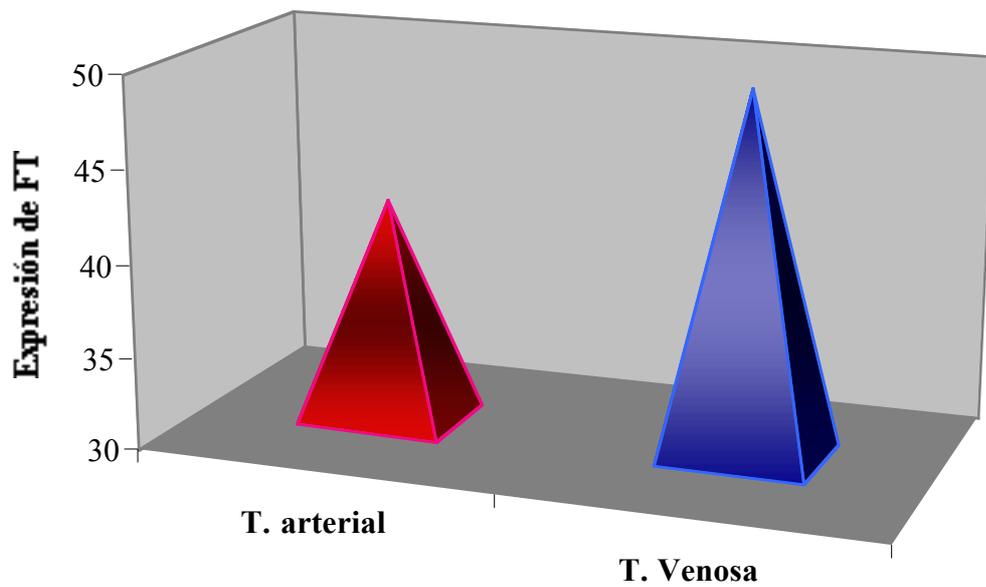
Los resultados (mediana y amplitud) fueron los siguientes con respecto al grupo control y de pacientes: 30 y 7.7 %y 48 y 20 %, siendo esta diferencia significativa ($p= 0.000$) (figura 7).

Figura 7: Valores (mediana) de expresión de FT entre casos y controles.



En el grupo de trombosis venosa los valores (mediana \pm amplitud) fueron 49.5 ± 20.7 y de 42 ± 21.5 en los eventos arteriales ($p= 0.6$) (figura 8).

Figura 8: Expresión de factor tisular entre pacientes con trombosis arterial y venosa.

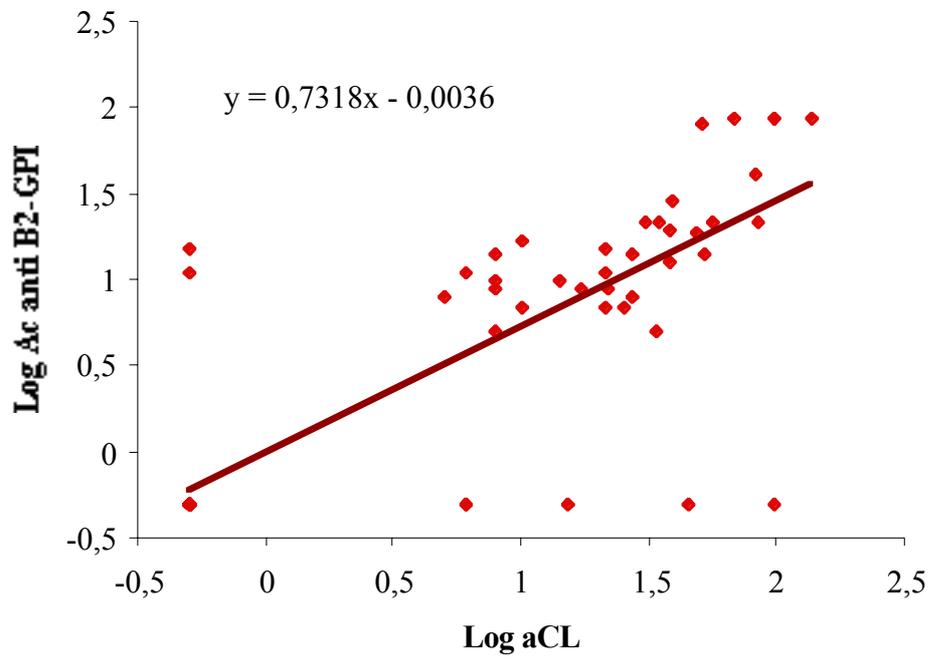


V.5.- CORRELACIONES.

Debido a la distribución no normal de todos los parámetros excepto de la LDL, se realizó una transformación logarítmica previa a la obtención de los coeficientes de correlación. Asimismo se calcularon los coeficientes de correlación no paramétricos con las variables originales obteniéndose unos coeficientes similares y no significativamente diferentes a los conseguidos después de la mencionada transformación.

La correlación fue muy buena entre los aCL y los Ac anti β 2-GPI ($r=0.825$, $p=0.000$) (figura 9).

Figura 9: Regresión entre aCL y Ac anti β 2-GPI



Los aCL se correlacionaron bien con los Ac anti LDL-ox ($r = 0.5$, $p = 0.000$) (figura 10), mientras que con la expresión de FT fue baja aunque significativa ($r = 0.4$, $p = 0.000$) (figura 11). Entre LDL y aCL la correlación fue de 0.185 ($p = 0.112$) (figura 12).

Figura 10: Regresión entre aCL y Ac anti LDLox

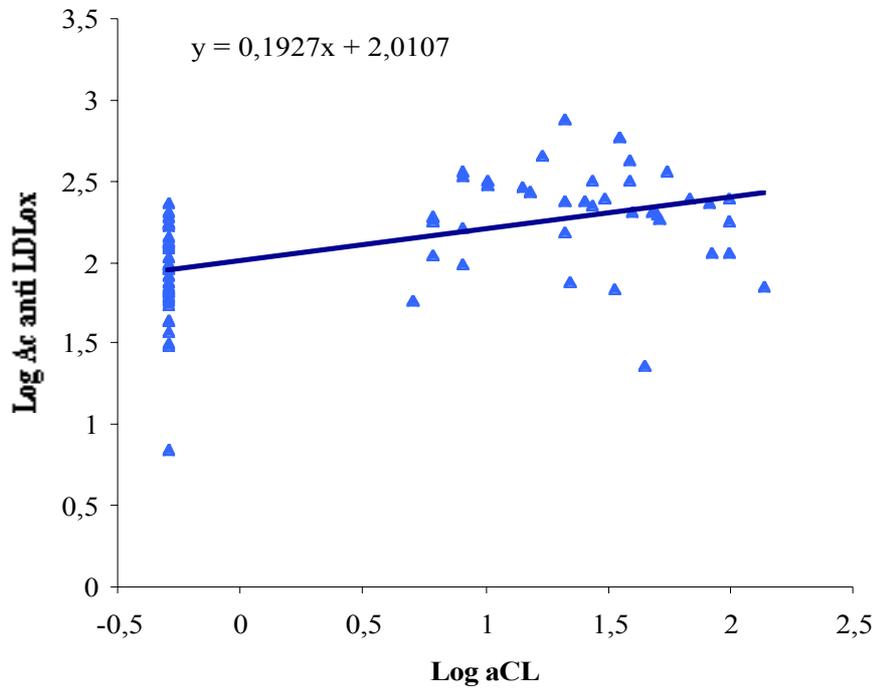


Figura 11: Regresión entre aCL y expresión de FT

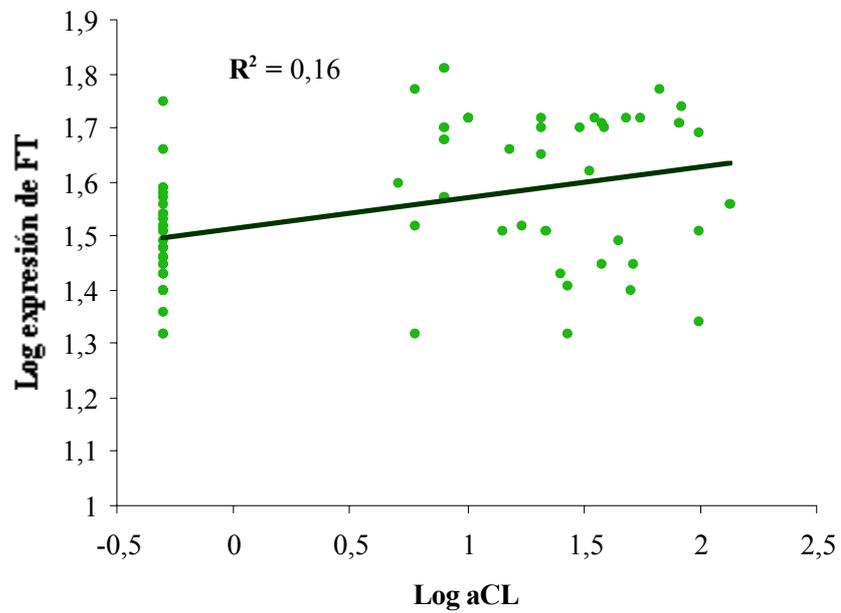
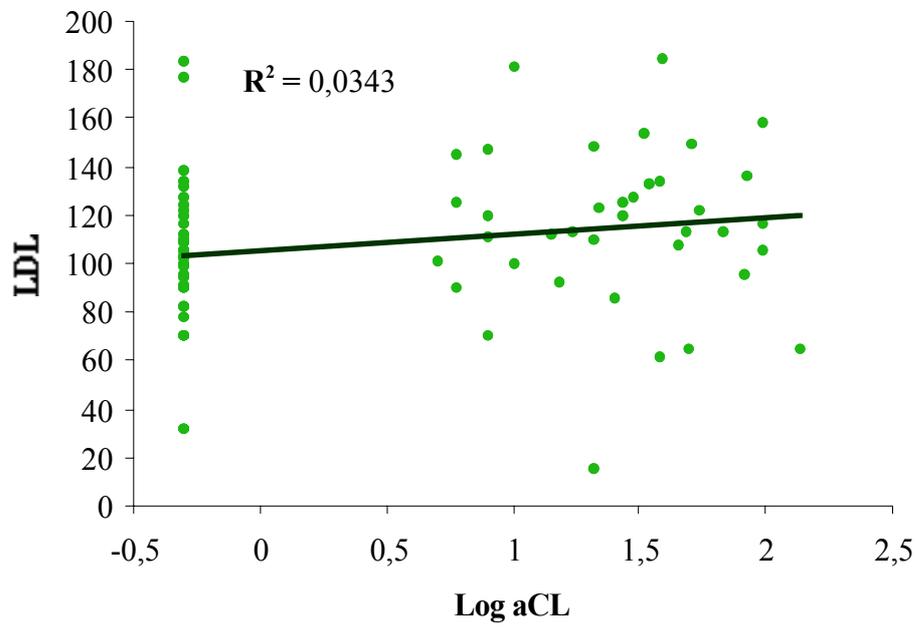


Figura 12: Regresión entre aCL y LDL



Los Ac anti β 2-GPI se correlacionaron con los anti LDL-ox y con la expresión de FT ($r= 0.524$ y 0.473 respectivamente, $p= 0.000$) (figuras 13 y 14).

Figura 13: Regresión entre Ac anti β 2-GPI y Ac anti LDL-ox

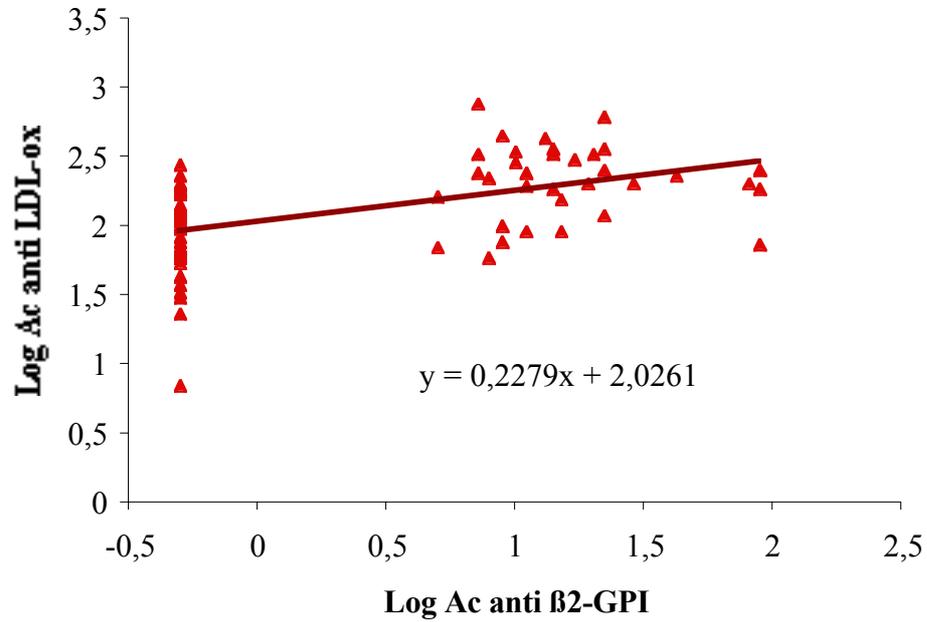
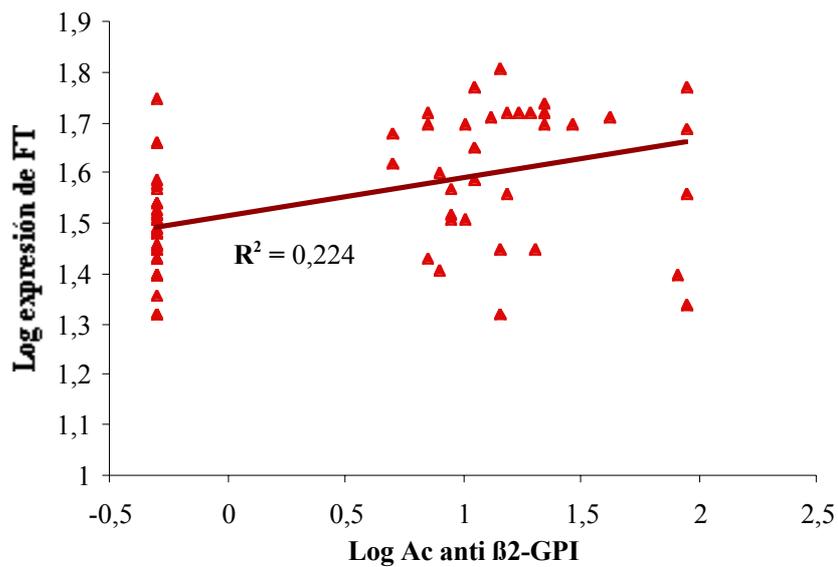
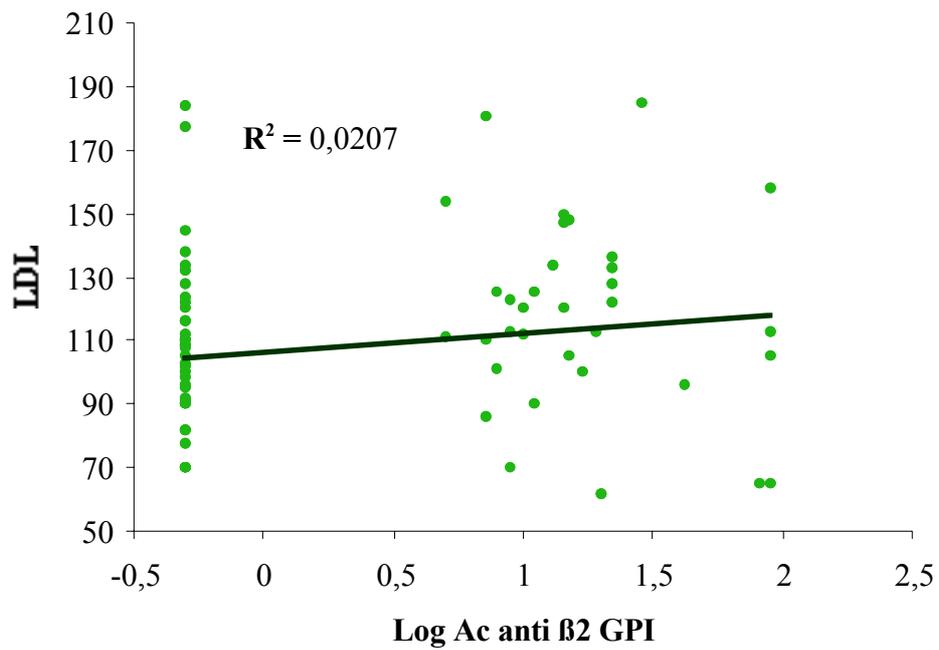


Figura 14: Regresión entre Ac anti β 2-GPI y expresión de factor tisular



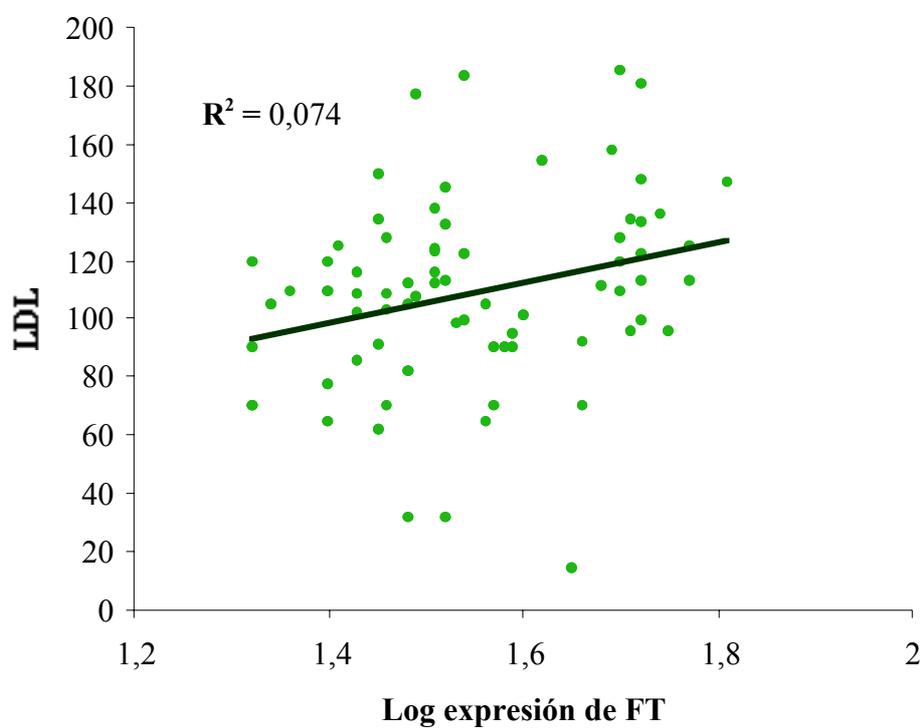
Con la LDL la correlación fue de 0.144 y no significativa (figura 15).

Figura 15: Regresión entre Ac anti β 2 GPI y LDL



La expresión de FT se correlacionó de forma significativa aunque con un coeficiente bajo con la LDL ($r = 0.273$, $p = 0.018$) (figura 16).

Figura 16: Regresión entre expresión de FT y LDL



La correlación entre los anti LDL-ox y la expresión de FT fue baja ($r = 0.351$, $p= 0.002$) (figura 17), mientras que con la LDL no alcanzó significación ($r = 0.107$, $p= 0.363$) (figura 18).

Figura 17: Regresión entre expresión de FT y Ac anti LDL-ox

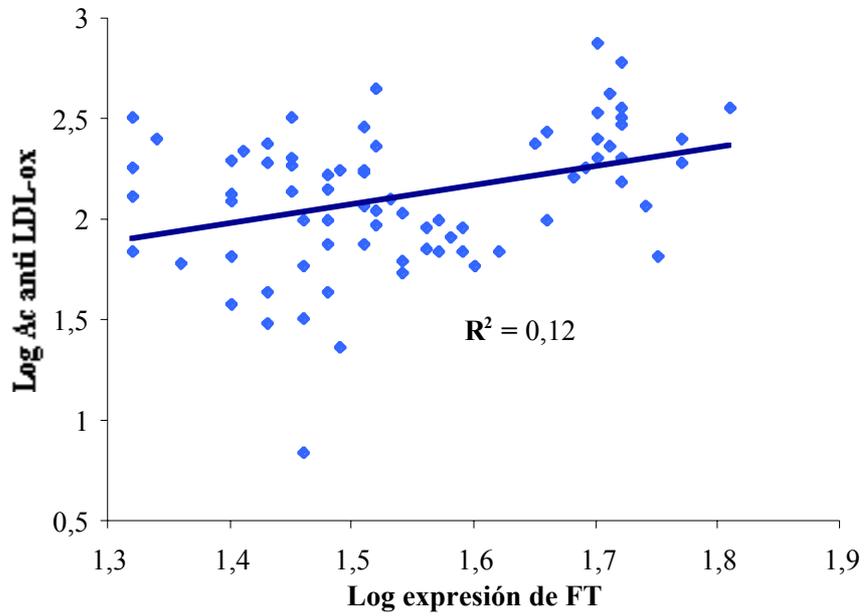
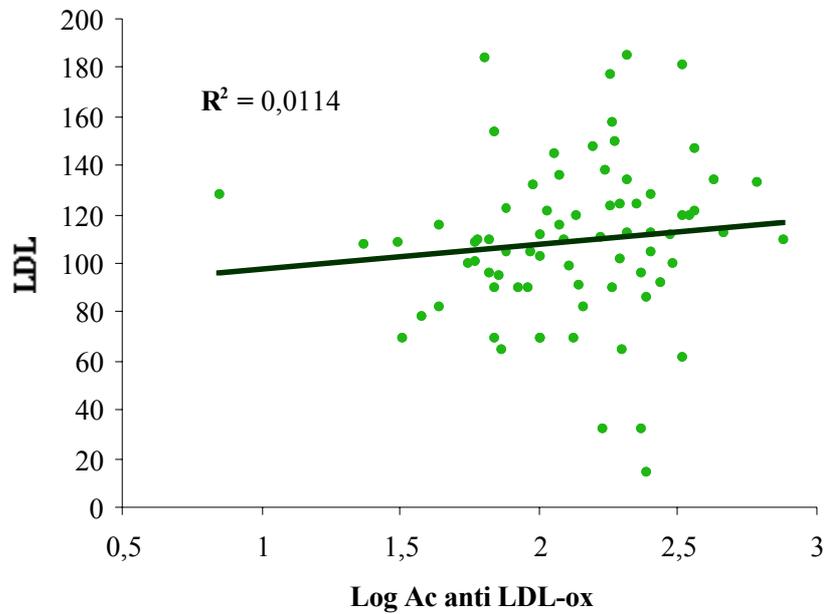


Figura 18: Regresión entre Ac anti LDL-ox y LDL



V.6.- ESTUDIO UNIVARIANTE.

En el modelo se evalúan las siguientes variables: HTA, obesidad, diabetes, toma de ACO, tabaquismo, ANA, AL, LDL, aCL, Ac anti β 2-GPI, Ac anti LDL-ox y expresión de FT.

6.1.- TROMBOSIS.

Unicamente entraron de forma significativa las siguientes variables: aCL, expresión de FT, Ac anti LDL-ox y Ac anti β 2-GPI (tabla 2).

En la validación del modelo, estuvieron clasificados correctamente, según el tipo de variable, el siguiente tanto por ciento de casos: Ac anti β 2-GPI 92%, aCL 88%, Ac anti LDL-ox 77% y expresión de FT 76%.

Para incrementos en cinco puntos en las unidades de las distintas variables, los odds ratio obtenidos fueron los siguientes: Ac anti β 2-GPI 9.4 (IC 95%: 9.18-9.57), aCL 1.9 (IC 95%: 1.8-1.97), Ac anti LDL-ox 1.09 (IC 95%: 1.08-1.1) y expresión de FT 1.8 (IC 95%: 1.63-2.02).

Tabla 2. Análisis de regresión logística univariante para la trombosis.

	Coefficiente de regresión (Error estándar)	Significación
aCL	0.196 (0.0337)	p< 0.001
Ac anti β2-GPI	0.4479 (0.0995)	p< 0.001
Ac anti LDL-ox	0.0178 (0.0042)	p< 0.001
expresión de FT	0.1206 (0.0298)	p< 0.001

6.2.- TROMBOSIS ARTERIAL.

Las variables aCL y Ac anti β 2-GPI son las que demostraron validez estadística (tabla 3), con un 83% y 81%, respectivamente, de los pacientes clasificados correctamente.

Evaluando incrementos en cinco puntos en las diferentes unidades, el odds ratio para la aCL fue de 1.135 (IC 95%: 1.12-1.15) y para los Ac anti β 2-GPI de 1.132 (IC 95%: 1.11-1.15).

Tabla 3. Análisis de regresión logística univariante para la trombosis arterial.

	Coefficiente de regresión (error estándar)	significación
aCL	0.0255 (0.0095)	p = 0.0074
Ac anti β2-GPI	0.0249 (0.0114)	p = 0.0289

6.3.- TROMBOSIS VENOSA.

Las variables aCL, Ac anti β 2-GPI, Ac anti LDL-ox y expresión de FT entraron de forma significativa en el modelo simple (tabla 4). Un 74.7%, 70.7%, 80% y 80% de los casos estuvieron bien clasificados.

Tabla 4. Análisis de regresión logística univariante para la trombosis venosa.

	Coefficiente de regresión (Error estándar)	Significación
aCL	0.029 (0.0101)	p = 0.004
Ac anti β2-GPI	0.0354 (0.0148)	p = 0.016
Ac anti LDL-ox	0.0109 (0.003)	p = 0.0003
expresión de FT	0.0843 (0.0251)	p = 0.0008

La aCL presentó un odds ratio de 1.15 (IC 95%: 1.13-1.18) para incrementos de 5 puntos en su valor, siendo el de los Ac anti β 2-GPI de 1.19 (IC 95%: 1.16-1.22), el de los Ac anti LDL-ox de 1.056 (IC 95%: 1.05-1.06) y el de la expresión de FT de 1.52 (IC 95%: 1.47-1.57).

V.7.- ESTUDIO MULTIVARIANTE.

Unicamente se evaluaron aquellos parámetros que fueron significativos en el estudio univariante.

7.1.- TROMBOSIS.

Las variables aCL y Ac anti β 2-GPI fueron las únicas con significación (tabla 5), de las cuatro evaluadas (aCL, Ac anti β 2-GPI, Ac anti LDL-ox y expresión de FT). El modelo clasificó correctamente el 95% de los casos.

Tabla 5. Análisis de regresión logística multivariante para la trombosis.

	Odds ratio (IC 95%)*	significación
aCL	1.34 (1.28-1.39)	p = 0.049
Ac anti β2- GPI	5.19 (4.97-5.42)	p = 0.043

* El valor corresponde a incremento de 5 puntos en el valor de la variable

El coeficiente de regresión para aCL fue de 0.0583 (error estándar: 0.0297), mientras que con respecto a los Ac anti β 2-GPI estos mismos parámetros fueron 0.0249 (0.022).

7.2.- TROMBOSIS ARTERIAL.

Se evaluaron los parámetros aCL y Ac anti β 2-GPI, aunque sólo la primera alcanzó significación estadística, no diferenciándose el coeficiente de regresión, error estándar y nivel de significación del modelo simple.

7.3.- TROMBOSIS VENOSA.

Cuatro parámetros (aCL, Ac anti β 2-GPI, Ac anti LDL-ox y expresión de FT) entraron en el estudio, obteniendo validación las variables aCL y anti LDL-ox (tabla 6). El modelo clasificó correctamente el 80% de los casos.

Tabla 6. Análisis de regresión logística multivariante para la trombosis venosa.

	Odds ratio (IC 95%)*	significación
aCL	1.12 (1.1-1.14)	p = 0.016
Ac anti LDL-ox	1.05 (1.057-1.045)	p = 0.011

* El valor corresponde a incremento de 5 puntos en el valor de la variable

Para los parámetros aCL y anti LDL-ox los valores del coeficiente de regresión (error estándar) fueron los siguientes: 0.0228 (0.0094) y 0.0101 (0.0031) respectivamente.

VI.- DISCUSSION.

Se ha llevado a cabo el presente trabajo con la finalidad de objetivar el papel que juega, por un lado el mayor inductor de la coagulación, vease el FT y, por otro, objetivar la presencia de Ac anti LDL-ox, sustancia considerada como inductora del proceso de aterosclerosis, en un conjunto de pacientes con síndrome antifosfolípido.

Por otro lado, se analiza la presencia de Ac anti β 2-GPI, que en los estudios realizados en los últimos años, es uno de los principales cofactores al que se unirían los aCL para ser patógenos.

Para ello se han recogido un grupo de pacientes homogéneos (caracterizados por haber presentado al menos un episodio trombótico y tener evidencia de Ac IgG anticardiolipina en suero), con el objeto de evitar en la medida de lo posible factores epidemiológicos de confusión y facilitar, con ello, el estudio estadístico.

VI.1.- MECANISMOS TROMBOTICOS DEL SAF.

A pesar de los múltiples años de investigación en el SAF, su patogenia sigue sin dilucidar. Aunque en algunos estudios no se ha logrado encontrar una asociación entre los fenómenos clínicos y los AAF (133, 134), la mayoría de los trabajos si la consiguieron objetivar (135). Asimismo, mayor evidencia del rol patogénico de los AAF la aportarían tanto los estudios realizados in vivo (136-138) como in vitro (139-141).

De los múltiples mecanismos testados, aquellos correspondientes a alteraciones inducidas a nivel de proteínas C y S, prostaciclina, antitrombina III y fibrinólisis son los mejor estudiados.

1.1.- VIA DE LA PROTEINA C.

El sistema de la proteína C en el control de la hemostasia es fundamental y por ello se ha evaluado extensamente en pacientes con SAF.

Así, por un lado, diversos trabajos documentan la presencia de Ac con actuación en la vía de la proteína C (141-144). Asimismo se ha encontrado un

incremento en la frecuencia de disminución de los niveles de proteína S libre en pacientes con LES y AAF (145), incluso objetivándose mayores niveles de los fragmentos 1 y 2 de la protrombina cuando existen niveles bajos de proteína S, lo que sugiere un estado pretrombótico (146).

Teniendo en cuenta los datos de todos estos estudios, parece existir una alteración en la activación de la proteína C junto con niveles disminuidos de proteína S. Sin embargo, los déficits congénitos de la vía de la proteína C únicamente se asocian a trombosis venosa y no arterial.

2.2.- PROSTACICLINA / TROMBOXANO.

Otro mecanismo propuesto por el cual los AAF producirían las manifestaciones clínicas sería su capacidad para alterar la formación de eicosanoides tanto derivados de células endoteliales (prostaciclina) como de plaquetas (tromboxano) (147).

Los resultados obtenidos con respecto a la prostaciclina son contradictorios (148-151), hecho que se ha puesto en relación con la metodología empleada y con la utilización de muestras heterogeneas de pacientes (147).

Diversos estudios reportan que los AAF incrementan la producción de tromboxano A2 (151-153), demostrándose un incremento en la excreción urinaria de metabolitos derivados del tromboxano con un menor incremento en la excreción de los metabolitos derivados de la prostaciclina (152, 153). Todo soporta el concepto de una pérdida del equilibrio tromboxano/prostaciclina como mecanismo predisponente de la trombosis.

2.3.- ANTITROMBINA III.

Shibata et al (154) encuentran Ac anti heparina/heparan sulfato en siete pacientes con SAF que son reactivos en el lugar de unión de la antitrombina III, por lo que señalan que los anteriores Ac podrían bloquear la activación de la antitrombina III mediada por el heparan sulfato. En consonancia con lo anterior en otro estudio demuestran niveles bajos de antitrombina III en un paciente con SAF (155).

2.4.- FIBRINOLISIS.

Otro mecanismo por el cual los AAF conducirían a episodios trombóticos sería una alteración en la destrucción del trombo.

En este sentido se han encontrado niveles elevados de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (156, 157), aunque su correlación con los AAF y los episodios trombóticos no es elevada.

Estudios en pacientes con SAF han hallado inhibición de la vía de la fibrinólisis dependiente del factor XII de la coagulación (158, 159), lo que ha generado la hipótesis de que los Ac anti β 2-GPI podrían actuar incrementando la unión de la β 2-GPI a los fosfolípidos con lo que incrementarían la inhibición de la activación del factor XII y prekaliceína que fisiológicamente realiza la β 2-GPI (23).

VI. 2.- LDL-ox Y SAF.

2.1.- LDL-ox EN EL SAF.

Durante el tiempo de realización del presente trabajo, escasas publicaciones han evaluado la presencia de Ac anti LDL-ox en el SAF.

Amengual et al (132) estudian la presencia de los mencionados Ac en 107 pacientes con SAF (64 primarios y 43 secundarios), encontrando títulos positivos en un 22% de los casos y en un 6% de los controles (p significativa). Los pacientes con trombosis arterial presentaron niveles significativamente mayores de Ac anti LDL-ox que aquellos sin dicha trombosis. La correlación de los anteriores Ac fue prácticamente nula con los aCL e inexistente con los Ac anti β 2-GPI.

Cuadrado et al (160) evalúan en 125 pacientes diagnosticados de SAF (58 primarios y 67 secundarios a lupus eritematoso sistémico) el riesgo de diferentes eventos clínicos relacionados con el síndrome en presencia de aCL, Ac anti β 2-GPI y Ac anti LDL-ox. Mediante un análisis de regresión logística, en el estudio univariante, encuentran que aquellos pacientes positivos para Ac anti β 2-GPI presentan mayor riesgo de trombosis recurrente y terminación prematura de embarazo, mientras que la positividad para Ac anti LDL-ox incrementa el

riesgo de trombosis arterial y lo disminuye para la presencia de trombopenia. En el estudio multivariante la asociación de la primera variable con terminación prematura de embarazo y de la segunda con trombopenia desaparecen.

Tinahones et al (161) en un trabajo dedicado para evaluar la presencia de reacción cruzada entre Ac anti LDL-ox y Ac anti β 2-GPI, relatan que un 26% de los pacientes evaluados con SAF secundario presentan Ac anti LDL-ox positivos, mientras que en aquellos con SAF primario un 29,7% son positivos.

Ningún otro estudio evalúa específicamente la presencia de Ac anti LDL-ox en el SAF ya sea primario o secundario.

En el presente trabajo se encuentra una prevalencia muy superior a la de los anteriores trabajos (65,7%) con valores similares a los hallados en el lupus eritematoso sistémico (162). Los valores obtenidos en el grupo de pacientes fueron significativamente mayores que en los controles, confirmando los datos de la literatura.

2.2.- SIGNIFICADO DE LA ELEVACION DE ANTICUERPOS

ANTI-LDL-ox.

La aterosclerosis se considera hoy día como un proceso inflamatorio en el cual la acumulación de células espumosas, la mayoría de las cuales provienen de monocitos circulantes, formaría la estría grasa (lesión inicial en el proceso de aterogénesis) (102, 103, 111).

Como se ha relatado en la introducción del presente trabajo, diversas propiedades de la LDL-ox hacen que ésta sea considerada fundamental en el proceso de aterogénesis: a/ Es quimiotáctica para los monocitos, b/ Estimula el crecimiento y diferenciación de los monocitos en macrófagos, c/ Incrementa su captación por los macrófagos, d/ Es inmunogénica, e/ Se ha comprobado que los Ac anti LDL-ox son un predictor independiente de progresión de aterosclerosis (102, 111, 116).

Por otro lado, varios trabajos documentan que la asociación de Ac anti LDL-ox con la trombosis (114, 118) evento fundamental en el SAF.

Desde un punto de vista inmunológico, la aterosclerosis y el SAF presentan múltiples aspectos comunes:

1.- Numerosos trabajos han documentado la presencia conjunta de aCL y Ac anti LDL-ox en diferentes patologías.

Así, los Ac anti LDL-ox están asociados a cardiopatía isquémica (118, 163) y a la aterosclerosis (116, 120). Del mismo modo, tanto en el infarto de miocardio (164) como en el accidente cerebrovascular (165) se ha comprobado que los aCL son factores de riesgo independientes.

Por otra parte, en pacientes con lupus eritematoso sistémico se ha comprobado que la mortalidad por cardiopatía isquémica es nueve veces mayor que la esperada (166), asociándose la presencia de aCL a infarto de miocardio en dichos pacientes (167, 168). Los Ac anti LDL-ox han sido testados en diferentes ocasiones en pacientes con lupus eritematoso sistémico encontrándose un incremento significativo con respecto a la población normal (162, 169). Asimismo se han encontrado elevaciones de estos últimos Ac en el SAF, aunque los resultados con respecto a su asociación con la trombosis arterial son contradictorios evidenciándose en unos ligazón (132, 160) mientras en otros no (66, 162). En el estudio univariante, el presente trabajo documenta que los Ac anti LDL-ox son factor de riesgo tanto para la trombosis en general como para la trombosis venosa, no siendo así para la arterial. En el estudio multivariante dichos Ac únicamente incrementan el riesgo de la trombosis venosa. Como se discutirá en el siguiente apartado quizá la alta correlación evidenciada entre los aCL y los Ac anti LDL-ox modifiquen los resultados alcanzados en la evaluación del riesgo mediante este modelo.

2.- Semejanzas entre la LDL-ox y la β 2-GPI.

Así como en el SAF los Ac reaccionan con epitopos antigénicos en fosfolípidos aniónicos o proteínas ligadoras de fosfolípidos plasmáticos, los Ac anti LDL-ox pueden ser considerados Ac antifosfolípido al contener la LDL una parte fosfolipídica y otra proteica (apolipoproteína B) ligadora de lípidos (111).

Por otra parte, del mismo modo que el proceso oxidativo de la LDL es el que hace que ésta sea inmunogénica (110), los aCL únicamente se ligarían a cardiolipina oxidada o susceptible de ser oxidada (170). En este sentido Vaarala et al (169) en un estudio de pacientes con lupus eritematoso sistémico reportan reactividad cruzada entre Ac anti LDL-ox y aCL, echo que comprueban posteriormente indicando la posibilidad de que la parte lipídica del complejo antigénico sea la responsable de dicha reacción (171). Mayor evidencia en este último aspecto aportan Hashimoto et al (172) y Mironova et al (173) utilizando, respectivamente, Ac Ig G anti LDL-ox aislados de humanos y Ac monoclonales aislados de un modelo de ratón con SAF en base a su unión con la cardiolipina. Tinahones et al (161) no encuentran reacción cruzada entre Ac anti LDL-ox y β 2-GPI en pacientes con SAF, aunque la incidencia de dichos Ac difieren con las encontradas en la mayoría de los estudios así como la no evidencia de correlación entre ellos.

En el presente estudio se evidencia una elevada correlación significativa entre los Ac anti LDL-ox tanto con los aCL ($r= 0.5$) como con los Ac anti β 2-GPI

($r= 0.524$), lo que estaría en consonancia con los hallazgos evidenciados en pacientes con lupus eritematoso sistémico aunque no con los hallados en el humanos con SAF (en estos últimos no se relata si las correlaciones se realizaron mediante métodos no paramétricos y, quizás sea esta la causa de no encontrar correlación). Nuestros hallazgos también estarían en consonancia con los hallazgos de Vaarala et al (171) en el sentido de que encuentran dos poblaciones diferentes de Ac en el mismo suero que, en principio tendrían diferentes funciones biológicas y asociaciones clínicas.

Por último, tal como se ha mencionado en otros apartados, existirían similitudes con respecto a la asociación entre aCL y Ac anti LDL-ox y alteraciones de la vía de la coagulación (1, 4, 94, 174).

3.- Aterosclerosis y aCL.

La β 2-GPI, componente principal antigénico en el SAF, es una proteína plasmática con propiedades anticoagulantes (33), que también es denominada apolipoproteína H por su alta unión en la circulación sanguínea a quilomicrones, lipoproteína de muy baja densidad y de alta densidad (175).

Recientes investigaciones (176) demuestran que la β 2-GPI se ligaría a las lipoproteínas plasmáticas circulantes una vez que están oxidadas, que dicha unión disminuiría la captación macrofágica de la LDL-ox (efecto antiaterogénico) pero en presencia de aCL aumentaría dicha captación. En el mismo sentido se ha

demostrado que la β 2-GPI se expresa abundantemente en placas de ateroma (177), así como que la inmunización de ratones con déficit para el receptor de LDL con β 2-GPI provocaría aterosclerosis precoz (178).

4.- Provocación de SAF por la LDL-ox.

La aterosclerosis y la trombosis son dos procesos íntimamente ligados (85). La LDL-ox, principal componente inmunógeno en el proceso de aterosclerosis, se ha correlacionado con eventos trombóticos tanto como factor de riesgo como inductor de factor tisular (125).

George et al (179) describen, recientemente, que la LDL-ox agrava el SAF inducido en ratón, objetivando una menor cuenta plaquetaria, mayor prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada y mayores rangos de reabsorción fetal.

En este sentido se ha especulado que ya sea por la reactividad cruzada entre los aCL y la LDL-ox (lo que condicionaría la formación de un complejo similar al aCL-fosfolípido) o por alteración de la estructura de la β 2-GPI por la LDL-ox (con la consiguiente exposición de un epítipo crítico que incrementaría su unión a los aCL), la LDL-ox agravaría los fenómenos clínicos del SAF.

VI.3.- SAF Y FACTOR TISULAR.

3.1.- FT EN EL SAF.

Atsumi et al (180) fueron los primeros en demostrar que 37 pacientes con SAF presentaban valores significativamente mayores de FT soluble plasmático que 24 controles. En dicho estudio no encuentran diferencias entre los subgrupos con trombosis arterial, venosa y pérdidas fetales.

Previamente Branch y Rodgers (140) demuestran un incremento en la expresión de la actividad de FT en células endoteliales de vena umbilical humana, sugiriendo que dicha inducción podría residir en la fracción α_2 -globulínica. El estudio estadístico de éste trabajo podría no ser válido al utilizar métodos paramétricos y comparar únicamente once pacientes frente a siete controles.

Otros estudios (181, 182) demuestran incremento de la expresión de FT y de la actividad procoagulante de FT en pacientes con aCL y trombosis en comparación con aCL sin trombosis, trombosis sin aCL y sujetos sanos. En el segundo trabajo (182) se evalúa la cantidad de FT en lisados celulares y sus niveles plasmáticos encontrando iguales resultados.

Utilizando aCL monoclonales, varias publicaciones (183, 184) evalúan

su efecto en la expresión de FT en monocitos encontrando un incremento de dicha expresión.

En el presente trabajo se demuestra un incremento en la expresión de FT en pacientes con SAFP (caracterizados por la presencia de IgG aCL y trombosis) con respecto al grupo control. Al comparar pacientes con trombosis arterial frente a venosa los valores son mayores, aunque no significativos, en el primer grupo.

3.2.- MECANISMOS DE INCREMENTO DEL FT.

En múltiples enfermedades caracterizadas por fenómenos trombóticos como parte de su patogenia se ha comprobado un incremento del FT plasmático (185, 186). Debido a que el FT, en condiciones normales, únicamente se objetiva en células inaccesibles al torrente circulatorio, dicho incremento se podría deber a dos causas: daño celular que ocasione su liberación o exposición en la superficie celular mediante el estímulo adecuado.

El hecho de que en el presente trabajo, así como otros autores (140, 180-184), se encuentre un incremento de la expresión de FT en monocitos en pacientes con SAFL comparado con controles indican que la manera más probable de actuación de los aCL se realice vía estimulación celular.

El o los mecanismos mediante los cuales los aCL son capaces de inducir la actividad procoagulante dependiente de FT es desconocido, aunque se han implicado varios mecanismos.

Por un lado, de manera similar al mecanismo de la trombosis/trombopenia inducida por la heparina (TIH), se ha propuesto que tras un daño inicial, los fosfolípidos aniónicos de diversas células (plaquetas, endoteliales, monocitos, etc) quedarían expuestos; posteriormente se produciría la unión de proteínas con afinidad por dichos fosfolípidos (como β 2-GPI o protrombina) y, si existen anticuerpos frente a las mencionadas proteínas, se concentrarían en la superficie celular, ligándose al Fc_{RII}, activando las células y provocando liberación de sustancias protrombóticas (187).

El anterior mecanismo fue propuesto en base a las múltiples semejanzas encontradas en diversas investigaciones. Así, al igual que en la TIH el determinante antigénico sería el complejo formado por el Factor 4 plaquetario y la heparina, en el SAF existe suficiente evidencia de que proteínas con alta afinidad por fosfolípidos (como β 2-GPI o protrombina) desempeñarían el papel antigénico (24, 25, 188). Por otro lado se ha demostrado un incremento de depósitos de β 2-GPI in vivo (189, 190) y que la actuación de los aCL es dependiente de la β 2-GPI (191). Por último, los aCL son capaces de producir activación de diversos grupos celulares como monocitos, células endoteliales, plaquetas y neutrofilos, encontrando en algunas ocasiones que dicha activación es dependiente de la unión al receptor Fc_{RII} (192, 193), así como la predominancia de la subclase

IgG2 en pacientes con SAF (194, 195).

El hecho de que Ac monoclonales IgM humanos produzcan efectos semejantes a los que ocasionan Ac policlonales descarta la posibilidad de que el mecanismo de los fenómenos trombóticos dependientes del FT en el SAFL sean mediados exclusivamente vía receptor Fc_RII (196). En este sentido se ha propuesto que la unión de aCL a fosfolípidos o proteínas causaría activación del complemento lo que produciría expresión de moléculas de adhesión (197).

Otros hallazgos en contra de la mencionada teoría serían el polimorfismo encontrado en el Fc_RIIA H/R131 (198), ya que el alelo H131 es el único receptor que ha probado reconocer eficientemente a la IgG2 (199, 200), así como la activación directa celular sin daño previo (182, 184, 201).

Otro mecanismo invocado sería que la unión de aCL a fosfolípidos induce directamente una activación celular que provocaría la secreción de citocinas, manteniendo el efecto activador de forma autocrina (196).

VII.- CONCLUSIONES.

1.- El factor tisular (FT) se encuentra elevado en pacientes con síndrome antifosfolípido primario (SAFP) caracterizados clínicamente por trombosis, lo que conlleva diversas implicaciones:

A/ El suero de los pacientes afectados de SAFP produce una estimulación directa celular que induciría la mencionada expresión.

B/ El incremento del FT sería la o una de las vías por las cuales se produciría la trombosis.

C/ Este último hecho podría tener implicaciones terapéuticas.

2.- En el presente estudio se encuentran niveles elevados de anticuerpos anti LDL-ox en nuestro grupo de pacientes. El hecho de encontrar una correlación intermedia con los anticuerpos anticardiolipina induce a pensar en la existencia de dos subpoblaciones de los primeros anticuerpos:

A/ Por un lado aquellos con epitopos comunes con los aCL que estarían relacionados con los fenómenos trombóticos venosos, como se demuestra en el estudio de regresión.

B/ por otro los que no presentan reacción cruzada, más relacionados con la aterosclerosis.

3.- La elevada prevalencia de Ac anti β 2-GPI y su alta correlación con los aCL corrobora los hallazgos de otros autores en el sentido de que son los primeros los verdaderamente implicados en la patogenia de la trombosis.

4.- La correlación existente entre la expresión de FT y Ac anti LDL-ox induce a pensar en una estimulación de éstos últimos Ac sobre la producción del FT.

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

1. Hughes GR. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993;342(8867):341-4.
2. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Font J, Cervera R, Lopez-Soto A, et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European Multicenter Study of 114 patients. *Am J Med* 1994;96(1):3-9.
3. Sammaritano LR, Gharavi AE, Lockshin MD. Antiphospholipid antibody syndrome: immunologic and clinical aspects. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20(2):81-96.
4. Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7(5):389-94.
5. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941;48:484-6.
6. Nelson RA, Mayer MM. Immobilization of treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *J Exp Med* 1949;89:369.
7. Moore JE. Biologically false-positive serologic test for syphilis. *JAMA* 1952;150:467-73.

8. Moore JE, Lutz WB. The natural history of systemic lupus erythematosus: an approach to its study through chronic biologic false-positive reactors. *J Chron Dis* 1955;1:297-316.
9. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2(8361):1211-4.
10. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985;62(3):738-45.
11. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952;31:621-2.
12. Frick PG. Acquired circulating anticoagulants in systemic "collagen disease". *Blood* 1955;10:691-706.
13. Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemostas Thromb* 1972;1:75-95.

14. Margolius AJ, Jackson DP, Ratnoff OD. Circulating anticoagulants: a study of 40 cases and a review of the literature. *medicine* 1961;40:145-202.
15. Bowie EJW, Thompson JHJ, Pascuzzi CA, Owen CAJ. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med* 1963;62:416-30.
16. Lechner K. Acquired inhibitors in nonhemophilic patients. *Haemostasis* 1974;3:65-93.
17. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant [editorial]. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287(6399):1088-9.
18. Hughes GR. The anticardiolipin syndrome [editorial]. *Clin Exp Rheumatol* 1985;3(4):285-6.
19. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985;11(3):591-609.
20. Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol* 1987;26(5):324-6.

21. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, et al. The “primary” antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989;68(6):366-74.
22. Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other “antiphospholipid” autoantibodies [see comments]. *Blood* 1994;84(9):2854-67.
23. Roubey RA. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39(9):1444-54.
24. 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 U S A* 1990;87(11):4120-4.
25. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335(8705):1544-7.
26. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990;336:177-8.

27. Hunt J, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994;152(2):653-9.
28. Kertesz Z, Yu BB, Steinkasserer A, Haupt H, Benham A, Sim RB. Characterization of binding of human beta 2-glycoprotein I to cardiolipin. *Biochem J* 1995;310(Pt 1):315-21.
29. Schultz DR. Antiphospholipid antibodies: basic immunology and assays. *Semin Arthritis Rheum* 1997;26(5):724-39.
30. Lozier J, Takahashi N, Putnam F. Complete amino acid sequence of human plasma β 2-glycoprotein I. *Proc Natl acad Sci U S A* 1984;81:3640-4.
31. Steinkasserer A, Estaller C, Weiss EH, Sim RB, Day AJ. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I. *Biochem J* 1991;277(Pt 2):387-91.
32. Reid KBM, Day AJ. Structure-function relationships of the complement components. *Immunol Today* 1989;10:177-80.
33. Schousboe I. beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985;66(5):1086-91.

34. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. β 2-glycoprotein I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis* 1987;63:109-14.
35. Nimpf J, Bevers EM, Bomans PHH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β 2-glycoprotein I. *Biochim Biophys Acta* 1986;884:142-9.
36. 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(2):342-5.
37. Bancsi LF, van der Linden IK, Bertina RM. Beta 2-glycoprotein I deficiency and the risk of thrombosis. *Thromb Haemost* 1992;67(6):649-53.
38. 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(2):457-62.
39. 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(2):954-60.

40. Pengo V, Biasiolo A, Fior MG. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when beta 2-glycoprotein I is bound to a suitable surface. *Thromb Haemost* 1995;73(1):29-34.
41. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcon-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- beta 2-glycoprotein-I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995;22(10):1899-906.
42. McNally T, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. The use of an anti-beta 2-glycoprotein-I assay for discrimination between anticardiolipin antibodies associated with infection and increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 1995;91(2):471-3.
43. Viard JP, Amoura Z, Bach JF. Association of anti-beta 2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992;93(2):181-6.
44. El-Kadi HS, Keil LB, DeBari VA. Analytical and clinical relationships between human IgG autoantibodies to beta 2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies. *J Rheumatol* 1995;22(12):2233-7.

45. Gharavi AE, Sammaritano LR, Bovastro JL, Jr., Wilson WA. Specificities and characteristics of beta 2 glycoprotein I-induced antiphospholipid antibodies. *J Lab Clin Med* 1995;125(6):775-8.
46. Roubey RA, Pratt CW, Buyon JP, Winfield JB. Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon beta 2-glycoprotein I. *J Clin Invest* 1992;90(3):1100-4.
47. Oosting JD, Derksen RH, 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(5):499-502.
48. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticoagulant activity of beta 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992;68(3):297-300.
49. Loeliger A. Prothrombin as co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus? *Thromb Diath Haemorrh* 1959;3:237-56.
50. Rapaport SI, Ames SB, Duval DJ. A plasma coagulation defect in systemic lupus erythematosus arising from hypoprothrombinemia combined with antiprothrombinase activity. *Blood* 1960;15:212.

51. Bajaj SP, Rapaport SI, Fierer DS, Herbst KD, Schwartz DB. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983;61:684-92.
52. Edson JR, Vogt JM, Hasegawa DK. Abnormal prothrombin crossed-immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood* 1984;64:807-16.
53. Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988;72(2):512-9.
54. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost* 1996;75(5):721-4.
55. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti- prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997;77(3):486-91.
56. Galli M, Barbui T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 1999;93(7):2149-57.

57. Horbach DA, van Oort E, Donders RC, Derksen RH, de Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipid antibodies [see comments]. *Thromb Haemost* 1996;76(6):916-24.
58. 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* 1996;75(3):456-9.
59. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993;81(10):2618-25.
60. Parke AL, Weinstein RE, Bona RD, Maier DB, Walker FJ. The thrombotic diathesis associated with the presence of phospholipid antibodies maybe due to low levels of free protein S. *Am J Med* 1992;93:49-56.

61. Ruiz-Arguelles A, Vazquez-Prado J, Deleze M, Perez-Romano B, Drenkard C, Alarcon-Segovia D, et al. Presence of serum antibodies to coagulation protein C in patients with systemic lupus erythematosus is not associated with antigenic or functional protein C deficiencies. *Am J Hematol* 1993;44(1):58-9.
62. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Gotoh M, Tsukamoto M. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. *Am J Hematol* 1994;47(1):56-8.
63. Satoh A, Suzuki K, Takayama E, Kojima K, Hidaka T, Kawakami M, et al. Detection of anti-annexin IV and V antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999;26(8):1715-20.
64. Staub HL, Harris EN, Khamashta MA, Savidge G, Chahade WH, Hughes GR. Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis. *Ann Rheum Dis* 1989;48(2):166-9.
65. Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen- PE complex. *Blood* 1995;86(8):3083-9.

66. Aho K, Vaarala O, Tenkanen L, Julkunen H, Jouhikainen T, Alfthan G, et al. Antibodies binding to anionic phospholipids but not to oxidized low-density lipoprotein are associated with thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14(5):499-506.
67. Branch DW, Rote NS, Dostal DA, Scott JR. Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;42(1):63-75.
68. Yodfat O, Blank M, Krause I, Shoenfeld Y. The pathogenic role of anti-phosphatidylserine antibodies: active immunization with the antibodies leads to the induction of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78(1):14-20.
69. Rock G, Chauhan K, Jamieson GA, Tandon NN. Anti-CD36 antibodies in patients with lupus anticoagulant and thrombotic complications. *Br J Haematol* 1994;88(4):878-80.
70. Vermynen J, Arnout J. Is the antiphospholipid syndrome caused by antibodies directed against physiologically relevant phospholipid-protein complexes? [editorial]. *J Lab Clin Med* 1992;120(1):10-2.
71. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor

superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87(18):6934-8.

72. Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *Faseb J* 1994;8(6):385-90.

73. Osterud B. Tissue factor: a complex biological role. *Thromb Haemost* 1997;78(1):755-8.

74. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991;66(1):67-79.

75. Semeraro N, Colucci M. Tissue factor in health and disease. *Thromb Haemost* 1997;78(1):759-64.

76. Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 1990;59(2):421-37.

77. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989;134(5):1087-97.

78. Morrissey JH, Neuenschwander PF, Huang Q, McCallum CD, Su B, Johnson AE. Factor VIIa-tissue factor: functional importance of protein-

membrane interactions. *Thromb Haemost* 1997;78(1):112-6.

79. Banner DW. The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb Haemost* 1997;78(1):512-5.
80. Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* 1995;86:1794-801.
81. Rapaport SI, Rao LVM. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1111-21.
82. Osterud B. Cellular interactions in tissue factor expression by blood monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6 Suppl 1:S20-5.
83. Halvorsen H, Olsen JO, Osterud B. Granulocytes enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets. *J Leukoc Biol* 1993;54(4):275-82.
84. Blakowski SA, Zacharski LR, Beck JR. Postoperative elevation of human peripheral blood monocyte tissue factor coagulant activity. *J Lab Clin Med* 1986;108(2):117-20.
85. Fuster V, Badimon J, Chesebro JH, Fallon JT. Plaque rupture, thrombosis, and therapeutic implications. *Haemostasis* 1996;26 Suppl 4:269-84.

86. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2839-43.
87. Kato K, Elsayed YA, Namoto M, Nakagawa K, Sueishi K. Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res* 1996;82(4):335-47.
88. Semeraro N, Montemurro P, Giordano D, Pasquetto N, Curci E, Triggiani R, et al. Increased macrophage procoagulant activity but normal endothelial thrombomodulin in rabbits fed an atherogenic diet. *Haemostasis* 1990;20(1):54-61.
89. Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Feliciello A, Esposito N, et al. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med* 1996;2(1):35-40.
90. Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, Guha A, Sharma SK, Ambrose JA, et al. Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation* 1996;94(6):1226-32.
91. Osterud B. A global view on the role of monocytes and platelets in atherogenesis. *Thromb Res* 1997;81:1-22.

92. Schuff-Werner P, Claus G, Armstrong VW, Kostering H, Seidel D. Enhanced procoagulatory activity (PCA) of human monocytes/macrophages after in vitro stimulation with chemically modified LDL. *Atherosclerosis* 1989;78(2-3):109-12.
93. Weis JR, Pitas RE, Wilson BD, Rodgers GM. Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation. *Faseb J* 1991;5(10):2459-65.
94. Brand K, Banka CL, Mackman N, Terkeltaub RA, Fan ST, Curtiss LK. Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler Thromb* 1994;14(5):790-7.
95. Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Jama* 1993;270(8):975-9.
96. Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wun TC, Taylor FB, Jr., Hinshaw LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest* 1993;91(6):2850-6.
97. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996;81(1):1-41.

98. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr R, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994;94(3):1320-7.
99. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996;2(2):209-15.
100. Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(13):6258-63.
101. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996;383(6595):73-5.
102. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
103. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;88(6):1785-92.

104. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89(5):2462-78.
105. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(1):333-7.
106. Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(4):2214-8.
107. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(10):6499-503.

108. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(12):3883-7.
109. Steinbrecher UP, Zhang HF, Lougheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1990;9(2):155-68.
110. Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, et al. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest* 1996;98(3):800-14.
111. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344(8925):793-5.
112. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989;264(5):2599-604.
113. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(4):1372-6.

114. Parums DV, Brown DL, Mitchinson MJ. Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114(4):383-7.
115. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994;14(4):605-16.
116. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992;339(8798):883-7.
117. Virella G, Virella I, Leman RB, Pryor MB, Lopes-Virella MF. Anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res* 1993;23(2):95-101.
118. Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L, Alfthan G, Ehnholm C, et al. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1994;154(22):2605-9.

119. Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10(3):336-49.
120. Yla Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994;14(1):32-40.
121. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984;4(4):357-64.
122. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(13):5134-8.
123. Liao F, Berliner JA, Mehrabian M, Navab M, Demer LL, Lusis AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice [published erratum appears in *J Clin Invest* 1991 Aug;88(2):721]. *J Clin Invest* 1991;87(6):2253-7.

124. Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein affect platelet aggregation in vitro. *Thromb Res* 1989;53(6):561-7.
125. Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138(3):601-7.
126. Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF, Reagan K, Lu DY, Rackley CE. Effects of high-density lipoprotein on acetylcholine-induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol* 1991;68(15):1425-30.
127. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, et al. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995;95(4):1747-55.
128. Wenzel RR, Duthiers N, Noll G, Bucher J, Kaufmann U, Luscher TF. Endothelin and calcium antagonists in the skin microcirculation of patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996;94(3):316-22.
129. Harris EN. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990;74(1):1-9.
130. Harris EN, Gharavi AE, Patel BN, Hughes GRV. Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987;68:215- 22.

131. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Koike T, Hughes GR. Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1996;35(12):1239-43.
132. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Tinahones F, Hughes GR. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1997;36(9):964-8.
133. Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, et al. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995;86(10):3685-91.
134. Harris EN, Spinnato JA. Should anticardiolipin tests be performed in otherwise healthy pregnant women? *Am J Obstet Gynecol* 1991;165(5 Pt 1):1272-7.
135. Esmon NL, Smirnov MD, Esmon CT. Thrombogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997;78(1):79-82.
136. Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, Creighton KA, Abbott TM, Hammond EH, et al. Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163(1 Pt 1):210-6.

137. Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction of anti-phospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(8):3069-73.
138. Pierangeli SS, Barker JH, Stikovac D, Ackerman D, Anderson G, Barquinero J, et al. Effect of human IgG antiphospholipid antibodies on an in vivo thrombosis model in mice. *Thromb Haemost* 1994;71(5):670-4.
139. Reverter JC, Tassies D, Escolar G, Font J, Lopez Soto A, Ingelmo M, et al. Effect of plasma from patients with primary antiphospholipid syndrome on platelet function in a collagen rich perfusion system. *Thromb Haemost* 1995;73(1):132-7.
140. Branch DW, Rodgers GM. Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of thrombosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168(1 Pt 1):206-10.
141. Malia RG, Kitchen S, Greaves M, Preston FE. Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies [see comments]. *Br J Haematol* 1990;76(1):101-7.

142. Cariou R, Tobelem G, Bellucci S, Soria J, Soria C, Maclouf J, et al. Effect of lupus anticoagulant on antithrombogenic properties of endothelial cells—inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb Haemost* 1988;60(1):54-8.
143. Marciniak E, Romond EH. Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. *Blood* 1989;74(7):2426-32.
144. Amer L, Kisiel W, Searles RP, Williams RC, Jr. Impairment of the protein C anticoagulant pathway in a patient with systemic lupus erythematosus, anticardiolipin antibodies and thrombosis. *Thromb Res* 1990;57(2):247-58.
145. Tomas JF, Alberca I, Taberner MD, Cordero M, Del Pino-Montes J, Vicente V. Natural anticoagulant proteins and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998;25(1):57-62.
146. Ginsberg JS, Demers C, Brill-Edwards P, Bona R, Johnston M, Wong A, et al. Acquired free protein S deficiency is associated with antiphospholipid antibodies and increased thrombin generation in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1995;98(4):379-83.
147. Carreras LO, Maclouf J. Antiphospholipid antibodies and eicosanoids.

Lupus 1994;3(4):271-3.

148. Carreras LO, Vermeylen J. "lupus" anticoagulant and thrombosis. Possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Haemost* 1982;48:38-40.

149. Schorer AE, Duane PG, Woods VL, Niewoehner DE. Some antiphospholipid antibodies inhibit phospholipase A2 activity. *J Lab Clin Med* 1992;120(1):67-77.

150. Walker TS, Triplett DA, Javed N, Musgrave K. Evaluation of lupus anticoagulants: antiphospholipid antibodies, endothelium associated immunoglobulin, endothelial prostacyclin secretion, and antigenic protein S levels. *Thromb Res* 1988;51(3):267-81.

151. Hasselaar P, Derksen RH, Blokzijl L, de Groot PG. Thrombosis associated with antiphospholipid antibodies cannot be explained by effects on endothelial and platelet prostanoid synthesis. *Thromb Haemost* 1988;59(1):80-5.

152. Lellouche F, Martinuzzo M, Said P, Maclouf J, Carreras LO. Imbalance of thromboxane/prostacyclin biosynthesis in patients with lupus anticoagulant. *Blood* 1991;78(11):2894-9.

153. Martinuzzo ME, Maclouf J, Carreras LO, Levy-Toledano S. Antiphospholipid antibodies enhance thrombin-induced platelet activation and

thromboxane formation. *Thromb Haemost* 1993;70(4):667-71.

154. Shibata S, Harpel PC, Gharavi A, Rand J, Fillit H. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III-thrombin complexes. *Blood* 1994;83(9):2532-40.
155. Cosgriff PM, Martin BA. Low functional and high antigenic antithrombin III level in a patient with the lupus anticoagulant and recurrent thrombosis. *Arthritis Rheum* 1981;24:94-6.
156. Tsakiris DA, Marbet GA, Makris PE, Settas L, Duckert F. Impaired fibrinolysis as an essential contribution to thrombosis in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1989;61(2):175-7.
157. Jurado M, Paramo JA, Gutierrez-Pimentel M, Rocha E. Fibrinolytic potential and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and other connective tissue disorders. *Thromb Haemost* 1992;68(5):516-20.
158. Sanfelippo MJ, Drayna CJ. Prekallikrein inhibition associated with the lupus anticoagulant: a mechanism of thrombosis. *Am J Clin Pathol* 1982;77:275-9.
159. Killen AA, Meyer KC, Vogt JM, Edson JR. Kallikrein inhibition and C1-esterase inhibitor levels in patients with lupus inhibitor. *Am J Clin Pathol* 1987;88:223-8.

160. Cuadrado MJ, Tinahones F, Camps MT, de Ramon E, Gomez-Zumaquero JM, Mujic F, et al. Antiphospholipid, anti-beta 2-glycoprotein-I and anti-oxidized-low- density-lipoprotein antibodies in antiphospholipid syndrome. *Qjm* 1998;91(9):619-26.
161. Tinahones FJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA, Mujic F, Gomez-Zumaquero JM, Collantes E, et al. Lack of cross-reaction between antibodies to beta2-glycoprotein-I and oxidized low-density lipoprotein in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1998;37(7):746-9.
162. Romero FI, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Tinahones FJ, Hughes GR. Arterial disease in lupus and secondary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies but not with antibodies against oxidized low-density lipoprotein. *Br J Rheumatol* 1998;37(8):883-8.
163. Lehtimaki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkila M, Jaakkola O, Jokela H, et al. Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(1):23-7.
164. Vaarala O, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L, Puurunen M, Aho K, et al. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995;91(1):23-7.

165. Group TAAaSsA. Anticardiolipin antibodies are an independent risk factor for first ischemic stroke. The Antiphospholipid Antibodies in Stroke Study (APASS) Group. *Neurology* 1993;43(10):2069-73.
166. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)* 1989;68(3):141-50.
167. Asherson RA, Mackay IR, Harris EN. Myocardial infarction in a young man with systemic lupus erythematosus, deep vein thrombosis, and antibodies to phospholipid. *Br Heart J* 1986;56(2):190-3.
168. Vaarala O. Antiphospholipid antibodies and myocardial infarction. *Lupus* 1998;7(Suppl 2):S132-4.
169. Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993;341(8850):923-5.
170. Horkko S, Miller E, Dudl E, Reaven P, Curtiss LK, Zvaifler NJ, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1996;98(3):815-25.

171. Vaarala O, Puurunen M, Lukka M, Alfthan G, Leirisalo Repo M, Aho K, et al. Affinity-purified cardiolipin-binding antibodies show heterogeneity in their binding to oxidized low-density lipoprotein. *Clin Exp Immunol* 1996;104(2):269-74.
172. Hashimoto Y, Kawamura M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yoshida S, et al. Anticardiolipin antibodies in NZW x BXSB F1 mice. A model of antiphospholipid syndrome. *J Immunol* 1992;149(3):1063-8.
173. Mironova M, Virella G, Lopes-Virella MF. Isolation and characterization of human antioxidized LDL autoantibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(2):222-9.
174. Wilson BD, Pitas RE, Rodgers GM. Regulation of endothelial cell protein C activation by native and oxidized low density lipoprotein. *Semin Thromb Hemost* 1992;18(1):11-7.
175. Polz E, Kostner GM. The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions. *FEBS Lett* 1979;102(1):183-6.

176. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* 1997;107(3):569-73.
177. George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Levy Y, Schneiderman J, et al. Immunolocalization of beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression. *Circulation* 1999;99(17):2227-30.
178. George J, Afek A, Gilburd B, Blank M, Levy Y, Aron-Maor A, et al. Induction of early atherosclerosis in LDL-receptor-deficient mice immunized with beta2-glycoprotein I. *Circulation* 1998;98(11):1108-15.
179. George J, Blank M, Hojnik M, Bar-Meir E, Koike T, Matsuura E, et al. Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) but not LDL aggravates the manifestations of experimental antiphospholipid syndrome (APS). *Clin Exp Immunol* 1997;108(2):227-33.
180. Atsumi T, Khamashta MA, Amengual O, Hughes GR. Up-regulated tissue factor expression in antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1997;77(1):222-3.

181. Reverter JC, Tassies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, et al. Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein s. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(11):1319-26.
182. Cuadrado MJ, Lopez-Pedraza C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum* 1997;40(5):834-41.
183. Reverter JC, Tassies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum* 1998;41(8):1420-7.
184. Kornberg A, Blank M, Kaufman S, Shoenfeld Y. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti- cardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994;153(3):1328-32.
185. Takahashi H, Sato N, Shibata A. Plasma tissue factor pathway inhibitor in disseminated intravascular coagulation: comparison of its behavior with plasma tissue factor. *Thromb Res* 1995;80(4):339-48.

186. Koyama T, Nishida K, Ohdama S, Sawada M, Murakami N, Hirosawa S, et al. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994;87(2):343-7.
187. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996;75(4):536-41.
188. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991;66(6):629-32.
189. Chamley LW, Pattison NS, McKay EJ. Elution of anticardiolipin antibodies and their cofactor beta 2- glycoprotein 1 from the placentae of patients with a poor obstetric history. *J Reprod Immunol* 1993;25(3):209-20.
190. Nomura S, Yanabu M, Miyake T, Miyazaki Y, Kido H, Kagawa H, et al. Relationship of microparticles with beta 2-glycoprotein I and P-selectin positivity to anticardiolipin antibodies in immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 1995;70(1):25-30.
191. Shi W, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus

anticoagulants. *Blood* 1993;81(5):1255-62.

192. Arvieux J, Roussel B, Pouzol P, Colomb MG. Platelet activating properties of murine monoclonal antibodies to beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1993;70(2):336-41.

193. Arvieux J, Jacob MC, Roussel B, Bensa JC, Colomb MG. Neutrophil activation by anti-beta 2 glycoprotein I monoclonal antibodies via Fc gamma receptor II. *J Leukoc Biol* 1995;57(3):387-94.

194. Gharavi AE, Harris EN, Lockshin MD, Hughes GR, Elkon KB. IgG subclass and light chain distribution of anticardiolipin and anti- DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1988;47(4):286-90.

195. Loizou S, Cofiner C, Weetman AP, Walport MJ. Immunoglobulin class and IgG subclass distribution of anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and associated disorders. *Clin Exp Immunol* 1992;90(3):434-9.

196. Del Papa N, Guidali L, Sala A, Buccellati C, Khamashta MA, Ichikawa K, et al. Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Human polyclonal and monoclonal anti-beta 2-glycoprotein I antibodies react in vitro with endothelial cells through adherent beta 2-glycoprotein I and induce endothelial activation. *Arthritis Rheum* 1997;40(3):551-61.

197. Vermynen J, Hoylaerts MF, Arnout J. Antibody-mediated thrombosis. *Thromb Haemost* 1997;78(1):420-6.
198. Atsumi T, Caliz R, Amengual O, Khamashta MA, Hughes GR. Fc gamma receptor IIA H/R131 polymorphism in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1998;79(5):924-7.
199. Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 1994;57:1-127.
200. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest* 1996;97(5):1348-54.
201. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998;79(2):276-81.