

Anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I y niveles plasmáticos de la proteína de unión a C4b

Adamczuk Y, Forastiero R,
Martinuzzo M, Carreras LO.



ARTICULO
ORIGINAL

Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas. Instituto de
Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Fundación Favalaro.
Buenos Aires, Argentina.

HEMATOLOGIA, Vol. 2 N° 2: 51-57
Mayo - Agosto

SUMMARY

Autoantibodies directed to β_2 glycoprotein I ($\alpha\beta_2$ GPI) are frequently found in patients with antiphospholipid antibodies (aPL). They are more strongly associated with clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome than aPL. It has been shown that β_2 GPI and C4b binding protein (C4bBP) share certain homology. In a previous study we have shown that anticardiolipin antibodies were associated with a plasma decrease of C4bBP. The aim of the present study was to evaluate in 131 patients with aPL whether the decrease in C4bBP is related to the presence of $\alpha\beta_2$ GPI. Lower C4bBP levels (mean \pm SD) in the group of patients having $\alpha\beta_2$ GPI (n=57) were observed when compared with the normal group (n=44), (74.3% \pm 28.1 vs 94.6% \pm 20.9, $p < 0.005$). This difference was more significant considering the IgG

isotype. The group of patients with positive $\alpha\beta_2$ GPI-IgG (n=41) had lower values of C4bBP (70.1% \pm 26.8) than both the normal group ($p < 0.005$) and the group of patients with negative $\alpha\beta_2$ GPI-IgG (n=90, 86.0% \pm 30.5%, $p < 0.05$). C4bBP deficiency (level $< 70\%$) was also more frequent in the group $\alpha\beta_2$ GPI-IgG (+) (63.4%) than in the group $\alpha\beta_2$ GPI-IgG (-) (34.4%, $p < 0.005$). Moreover, patients with aPL and previous venous thrombosis (n=32) showed lower C4bBP values (75.1% \pm 27.9) compared with the normal group ($p < 0.05$). At this time, the mechanisms responsible for the C4bBP decrease are not known. Our findings on the close relationship between abnormalities in the C4bBP/protein S system and the presence of $\alpha\beta_2$ GPI could explain the major thrombotic risk in patients having these autoantibodies.

INTRODUCCION

Los anticuerpos antifosfolípidos (aFL) son una familia muy heterogénea de anticuerpos y se detectan por ensayos de coagulación como anticoagulante lúpico (AL) y por ensayos inmunológicos como anticuerpos anticardiolipina (aCL) ^(1,2). Sin embargo, en estos últimos años se demostró que los aFL presentan especificidad por ciertas proteínas que unen fosfolípidos y en particular por la β_2 glicoproteína I (β_2 GPI) y la protrombina de origen humano ⁽³⁻⁶⁾. La asociación de los aFL con trombosis, pérdidas fetales y/o trombocitopenia define al síndrome antifosfolipídico (SAF) ^(7,8). Recientemente se presentaron evidencias de que la presencia de anticuerpos dirigidos específicamente contra la β_2 GPI ($\alpha\beta_2$ GPI) es un mejor marcador del riesgo de eventos clínicos relacionados al SAF que la presencia de aFL. Esto ha sido demostrado

particularmente para la trombosis venosa y las complicaciones obstétricas ⁽⁹⁻¹⁴⁾.

Durante la última década se han publicado varios estudios que evaluaron el posible efecto patogénico de los aFL sobre las plaquetas, células endoteliales y las proteínas del sistema de coagulación ^(15,16). Sin embargo, las anomalías detectadas deberían ser reevaluadas teniendo en cuenta el nuevo concepto de la verdadera especificidad de estos anticuerpos. Una de las hipótesis fisiopatológicas más atractivas es la relacionada a la interferencia de los aFL en el sistema antitrombótico de la proteína C. Hay varios estudios que demostraron la inhibición de la inactivación del factor Va por la proteína C activada (APC) cuando están presentes los aFL ^(17,18). En un estudio que publicamos recientemente encontramos que este efecto estaba relacionado

preferentemente con los $\alpha\beta_2$ GPI⁽¹⁹⁾. Otra de las alteraciones encontradas en estos pacientes fueron las deficiencias adquiridas de la proteína S y también de la proteína de unión a C4b (C4bBP) preferentemente en aquellos con aCL⁽²⁰⁾. Es conocido que la C4bBP y la β_2 GPI pertenecen a la superfamilia de las proteínas que controlan el sistema del complemento, las cuales comparten cierta homología estructural por la presencia de dominios sushi⁽²¹⁾. Por lo tanto, se decidió evaluar si había relación entre la presencia de $\alpha\beta_2$ GPI y los niveles plasmáticos de C4bBP en pacientes con aFL.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Se estudiaron 131 pacientes con aFL (78 mujeres y 53 hombres) y la media de edad era de 45 años (rango de 5 a 79 años). La actividad de AL se detectó en 44 (33,6%) pacientes, aCL en 26 (19,8%) y 61 (46,6%) presentaban simultáneamente AL y aCL. Setenta pacientes tenían diagnóstico de SAF y de ellos 14 eran pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Además había 16 pacientes con LES sin SAF y 45 conformaban el grupo de misceláneas (asintomáticos, neoplasias, enfermedades cardíacas, etc.). La historia de trombosis venosas estaba presente en 32 pacientes, la de trombosis arterial en 26 y 21 mujeres habían presentado complicaciones obstétricas (abortos o pérdidas fetales recurrentes). El grupo control estaba constituido por 44 voluntarios sanos con una media de edad de 40 años.

Las muestras de sangre para la determinación de AL fueron obtenidas por punción venosa y recogidas en tubos plásticos conteniendo citrato de sodio 0,11M en una relación de 9 partes de sangre y 1 parte de anticoagulante. El plasma pobre en plaquetas (PPP) fue obtenido por doble centrifugación a 2,500g durante 10 minutos y ensayado dentro de las dos horas de extraído. Para la preparación de los sueros las muestras fueron recolectadas en tubos de vidrio y luego de una incubación de 4 horas a 37°C se centrifugaron durante 10 minutos. Los sueros fueron alicuotados y almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

Actividad de anticoagulante lúpico

Se evaluó en plasma usando tres ensayos de coagulación para el screening: tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) con los reactivos Actin FSL (Dade International Inc., Miami, FL, USA) y PTT-LA (Diagnostica Stago, Asnières, France); tiempo del veneno de víbora Russell diluido (dRVVT) usando cefalina de cerebro de conejo y veneno de víbora de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA y tiempo de protrombina con tromboplastina diluida usando tromboplastina tisular recombinante (Innovin, Dade

International) diluida 1:500 en solución de Cl_2Ca 25 mM. Estos ensayos fueron realizados en el PPP del paciente, del normal y en las mezclas 1:1 y 4:1 (paciente:normal). La presencia del AL se confirmó mediante la prueba de neutralización con plaquetas en los ensayos de APTT y dRVVT y además con el ensayo de inhibición de la tromboplastina tisular utilizando la tromboplastina recombinante diluida y sin diluir. Se consideró la presencia del AL cuando al menos una de las pruebas de screening y de confirmación fueron positivas de acuerdo a los criterios que se establecieron previamente^(1,22).

ELISA para aCL

Los aCL de ambos isotipos (IgG e IgM) fueron determinados con el ELISA de referencia⁽²⁾. En el ensayo se utilizó la curva de calibración preparada con los estándares internacionales (Louisville APL Diagnostics, Louisville, KY, USA) y con nuestros sueros controles. Los resultados se expresaron en unidades estándares para IgG (uGPL) o IgM (uMPL). Valores menores de 10 unidades fueron considerados resultados negativos, entre 10 y 20 positivo débil, entre 20 y 80 positivo moderado y mayores de 80 unidades positivo fuerte.

ELISA para $\alpha\beta_2$ GPI

El ensayo fue realizado como se describió previamente para ambos isotipos de inmunoglobulinas^(9,10). Se utilizaron placas de poliestireno (Nunc-Immuplate Maxisorp, Kamstrup, Roskilde, Denmark) irradiadas con rayos de electrón a una dosis de 100 kGy. β_2 GPI humana purificada (Diagnostica Stago) y soluciones basadas en albúmina bovina (Sigma). En cada muestra de suero se determinó además la unión no específica (en pocillos sin antígeno) para obtener la actividad real de unión a la β_2 GPI. El punto de corte del ELISA, expresado en densidad óptica (DO), para cada isotipo fue calculado por el método de los percentilos y se estableció en el percentilo 99. Ellos fueron 0,055 (IgG) y 0,050 (IgM). Los niveles de los anticuerpos fueron categorizados en grados de positividad de acuerdo al siguiente esquema: positivo débil (DO: 0,055 a 0,150 para el isotipo IgG y 0,050 a 0,150 para el isotipo IgM), positivo moderado (DO: 0,150 a 0,300 para ambos isotipos) y positivo fuerte (DO: > 0,300 para ambos isotipos).

Dosaje de C4bBP

Fue realizado por el método inmunológico que utiliza micropartículas de látex cubiertas con anticuerpos anti-C4bBP unidos en forma covalente (Liatest C4bBP, Diagnostica Stago). Los resultados se expresaron en porcentaje respecto a un pool de 20 plasmas normales. Este ensayo inmunológico fue comparado previamente con el método de electroinmunodifusión (rocket) de Laurell⁽²⁰⁾ y se obtuvo una excelente correlación entre ambas técnicas. El rango de referencia normal es de 70 a 140%.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en valores medios \pm desviación estándar (DE) o valores medios y sus intervalos de confianza de 95%. La distribución de los datos mostró ser normal y por lo tanto se utilizaron métodos paramétricos. Para los análisis grupales se realizó el ANOVA y para las comparaciones posteriores se utilizó el procedimiento t de Bonferroni con un ajuste en el nivel de significación. Los datos de proporciones fueron comparados mediante la prueba de chi cuadrado con la corrección de Yate. La significación fue considerada cuando la probabilidad (p) era menor de 0,05.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados de los niveles plasmáticos de C4bBP en los 131 pacientes con aFL agrupados de acuerdo a la presencia de AL y/o aCL. En el análisis grupal, incluyendo el grupo normal, se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0,01$) y el análisis posterior de comparación múltiple demostró que la única diferencia significativa era dada por los niveles disminuidos de C4bBP en el grupo de 61 pacientes con la presencia simultánea de aCL y AL respecto del grupo normal. Cuando los niveles de C4bBP (media \pm DE) en los pacientes con aCL ($n=87$; $79,0\% \pm 31,1$) fueron comparados con aquellos sin aCL ($n=44$; $85,2\% \pm 28,3$) y los controles normales ($n=44$; $94,6\% \pm 20,9$) se observó una diferencia significativa sólo entre el grupo aCL(+) versus el grupo normal ($p < 0,02$).

Tabla I. Niveles de la proteína de unión a C4b (C4bBP) en los diferentes grupos de pacientes con anticuerpos antifosfolípidos agrupados según el tipo de anticuerpo.

Grupo	n	C4bBP (%)		P
		Media (DE)	ANOVA Comparación múltiple	
Normal	44	94,6 (20,9)		
aCL(+)AL(-)	26	83,3 (32,7)		
aCL(+)AL(+)	61	77,6 (30,7)		<0,01 (vs. Normal)
aCL(-)AL(+)	44	85,2 (28,3)		
				<0,01
aCL(+)a β_2 GPI(+)	55	73,6 (28,3)		<0,001 (vs. Normal)
aCL(+)a β_2 GPI(-)	32	88,2 (33,9)		
				<0,001

aCL: anticuerpos anticardiolipina (IgG y/o IgM), AL: anticoagulante lúpico,

a β_2 GPI: anticuerpos anti- β_2 Glicoproteína I (IgG y/o IgM)

Considerando estos datos de los niveles más bajos de C4bBP en los pacientes con aCL se decidió evaluar si existían diferencias dentro de este grupo teniendo en cuenta la presencia de a β_2 GPI. Los valores medios de C4bBP inmunológico se presentan en la Tabla I y el análisis estadístico mostró que los resultados más bajos se observan en los pacientes con reactividad simultánea en los ELISAs de aCL y a β_2 GPI ($p < 0,001$ vs normal).

La figura 1A muestra los intervalos de confianza de 95% para las medias del grupo normal y los grupos de pacientes con aFL que presentaron resultados negativos o positivos en el ensayo de a β_2 GPI (IgG y/o IgM). El ANOVA mostró diferencias significativas ($p < 0,002$) y el análisis posterior de comparación múltiple demostró niveles más bajos en los pacientes a β_2 GPI(+) comparados con el grupo normal ($p < 0,005$). Cuando se consideró el isotipo de inmunoglobulina, no se encontraron diferencias en los niveles de C4bBP al evaluar el isotipo IgM en comparación con los normales (datos no mostrados). Por el contrario, cuando los pacientes se agruparon de acuerdo a la presencia o ausencia de a β_2 GPI de isotipo IgG, el ANOVA mostró una significación mayor ($p < 0,0001$) que la mencionada anteriormente sin discriminación del isotipo de inmunoglobulina. Además se observó que los niveles de C4bBP eran significativamente menores en el grupo a β_2 GPI-IgG(+), ya sea comparado con el grupo normal ($p < 0,005$) o con el de los pacientes a β_2 GPI-IgG(-) ($p < 0,05$) (Figura 1B).

En la Tabla II se observan las frecuencias de valores de C4bBP por debajo del límite inferior del rango de

Tabla II. Prevalencia de pacientes con niveles de la proteína de unión a C4b (C4bBP) por debajo del límite inferior del rango de referencia.

Grupo	n	C4bBP <70%	
		n	%
Normal	44	2	4,5
a β_2 GPI(+)	57	31	54,4*
a β_2 GPI(-)	74	26	35,1
a β_2 GPI-IgG(+)	41	26	63,4**
a β_2 GPI-IgG(-)	90	31	34,4

a β_2 GPI: anticuerpos anti- β_2 Glicoproteína I (IgG y/o IgM), a β_2 GPI-IgG: anticuerpos anti- β_2 Glicoproteína I (IgG). Test del chi cuadrado con corrección de Yate: * $p < 0,05$ [a β_2 GPI(+) vs. a β_2 GPI(-)], ** $p < 0,005$ [a β_2 GPI-IgG(+) vs. a β_2 GPI-IgG(-)]

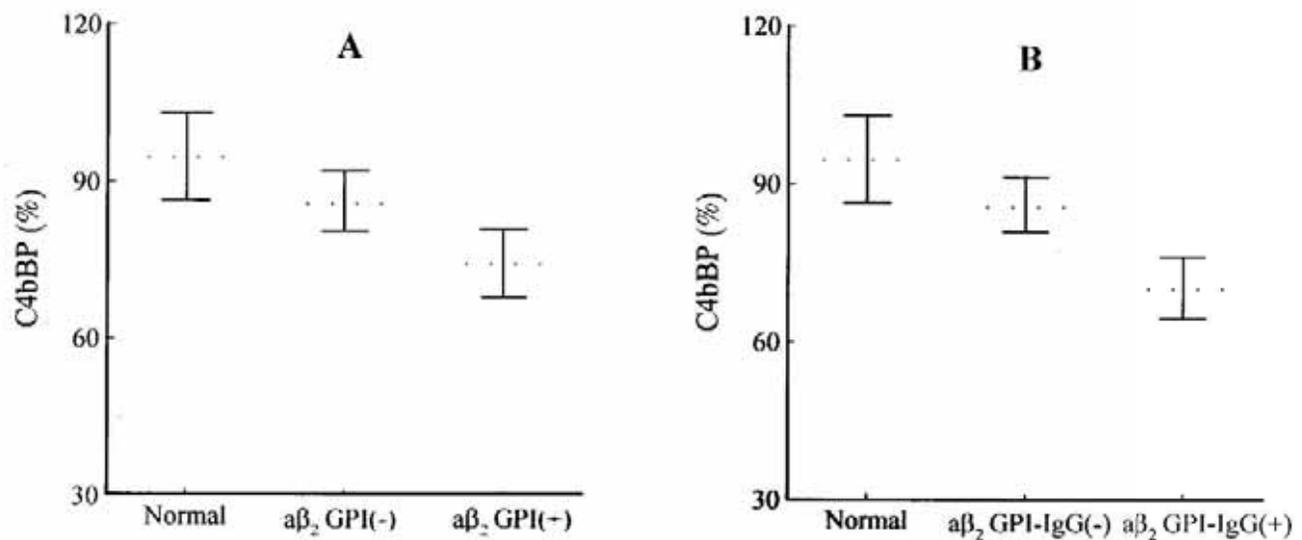


Figura 1: Niveles inmunológicos de la proteína de unión C4b (C4bBP) presentados como valores medios y sus correspondientes intervalos de confianza de 95% en el grupo de control normal y en los grupos de pacientes con o sin anticuerpos anti-β₂ Glicoproteína I (αβ₂GPI) de isotipos IgG y/o IgM (A) o en los grupos de pacientes con resultados positivos o negativos en el ELISA de αβ₂GPI de isotipo IgG (B).

referencia. Aproximadamente el 50% de los pacientes con αβ₂GPI de cualquier isotipo tenían niveles menores de 70% y la prevalencia fue aún mayor al considerar solamente a los pacientes con estos anticuerpos de isotipo IgG (63,4%).

El grado de disminución de los niveles plasmáticos de C4bBP no mostró relación con el título de anticuerpos de isotipo IgG y esto puede ser explicado, en parte, por el hecho de que la mayoría de los pacientes tenían títulos moderados o altos, el 82,9% de aquellos con αβ₂GPI y el 80,3% de los pacientes con aCL.

En lo que respecta a las complicaciones clínicas se encontró que los pacientes con historia de trombosis venosa (n=32) presentaban niveles significativamente disminuidos de C4bBP (media ± DE: 75,1% ± 27,9) comparados con el grupo normal (p<0,05). Por el contrario, aquellos que no habían sufrido eventos trombóticos venosos previos (n=99) presentaban niveles de esta proteína (83,0% ± 30,8) similares a los controles normales.

No se halló ninguna asociación entre los niveles antigénicos disminuidos de C4bBP y la presencia de otras complicaciones clínicas asociadas al SAF (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

La verdadera especificidad de los aFL ha sido un tema de gran desarrollo en los últimos años y es ahora aceptado que la mayoría de los aFL de pacientes con SAF están principalmente dirigidos contra las proteínas β₂GPI y protrombina humana complejadas *in vivo* a fosfolípidos⁽²³⁾. La β₂GPI es el principal antígeno reconocido por los aCL de pacientes con SAF o con

enfermedades autoinmunes⁽²⁴⁻²⁶⁾. En el dominio V de la molécula está el sitio de unión a fosfolípidos aniónicos⁽²⁷⁾ y fue recientemente demostrado que este dominio es requerido en la exposición del epítopo críptico reconocido por los aCL⁽²⁸⁾. Sin embargo, este último estudio demostró que el epítopo no está en el dominio V sino probablemente en el dominio IV de la molécula.

La β₂GPI está compuesta de cinco dominios con un patrón conservado de residuos cisteína, prolina y triptofano. Estos dominios sushi, denominados "short consensus repeats" (SCR), son característicos de la superfamilia de las proteínas que controlan el sistema del complemento⁽²¹⁾. Dentro de esta familia se encuentra la C4bBP que existe en plasma en tres isoformas con diferente composición de subunidades⁽²⁹⁾. La principal isoforma es aquella formada por siete unidades α y una unidad β (α₇β₁), aunque pueden existir otras isoformas (α₆β₁ y α₅β₂). Cada unidad α contiene 8 SCR y posee el sitio de unión a C4b. La subunidad β presenta 3 SCR y el sitio de unión a proteína S. Por lo tanto, la C4bBP es un importante regulador no sólo del sistema del complemento sino que también participa en el sistema antitrombótico de la proteína C al inhibir la actividad cofactor de la proteína S libre como consecuencia de la unión de la misma a su cadena β⁽³⁰⁾. Datos recientes indican que la proteína S tiene además propiedades anticoagulantes en una forma independiente de la APC. Entre ellas se encuentran la inhibición de la activación de factor X y de protrombina, y se demostró que estas funciones son llevadas a cabo más eficientemente por el complejo proteína S-C4bBP que por la proteína S libre⁽³¹⁾. Todos estos estudios sugieren que la C4bBP podría tener algún rol en los mecanismos fisiopatogénicos que conducen a los eventos trombóticos.

Una de las complicaciones clínicas más frecuentemente observadas en el SAF es la trombosis y la recurrencia de las mismas está relacionada con la presencia de títulos altos de aCL de isotipo IgG³². Considerando que estos autoanticuerpos son generalmente $\alpha\beta_2$ GPI y en base a nuestra observación previa de la asociación de la presencia de aCL con niveles disminuidos de C4bBP⁽²⁰⁾, decidimos evaluar la relación entre estos autoanticuerpos y la concentración antigénica de C4bBP. Los datos indicaron que la disminución más importante de esta proteína se observaba en pacientes con $\alpha\beta_2$ GPI de isotipo IgG. Además los pacientes con historia de trombosis venosa presentaron niveles disminuidos de la C4bBP en comparación con el grupo normal. Esto podría estar relacionado con la mayor frecuencia de $\alpha\beta_2$ GPI-IgG en los individuos con trombosis venosa y aFL⁽⁹⁻¹⁴⁾. En un estudio reciente se encontró una marcada reducción en la C4bBP en 200 mujeres con preeclampsia⁽³³⁾, pero en ese estudio no se evaluó la presencia de aFL.

Varias hipótesis podrían ser sugeridas para explicar la relación ente los niveles reducidos de C4bBP y la presencia de $\alpha\beta_2$ GPI. Recientemente se presentaron datos de una interrelación entre los sistemas de coagulación y del complemento donde la β_2 GPI sería la proteína de conexión al interferir en el complejo C4bBP-proteína S⁽³⁴⁾. Los $\alpha\beta_2$ GPI podrían estabilizar la unión de la β_2 GPI a la C4bBP o a la proteína S e inducir un aumento en la depuración de estas proteínas. Esta teoría explicaría la reducción de C4bBP y de la proteína S (datos no publicados) en pacientes aCL/ $\alpha\beta_2$ GPI, pero no coincidiría con la observación previa de niveles normales de β_2 GPI en pacientes con anticuerpos contra esta proteína⁽⁹⁾. La existencia de anticuerpos específicos contra el complejo C4bBP/proteína S, diferentes de los $\alpha\beta_2$ GPI, en los pacientes con SAF no pudo ser demostrada en nuestro laboratorio (datos no publicados). El epitope de la β_2 GPI reconocido por los $\alpha\beta_2$ GPI no ha sido identificado claramente y considerando la homología estructural entre la β_2 GPI y la C4bBP podría ser factible que estos anticuerpos presenten reacción cruzada con ambas proteínas y sólo se favorezca el aumento del clearance de la C4bBP por tener un peso molecular diez veces mayor que el de la β_2 GPI. Otra hipótesis diferente involucraría un fenómeno de regulación a nivel de la síntesis de la C4bBP. Se ha demostrado que en pacientes con SAF existen modificaciones en los niveles de citoquinas y se encontraron concentraciones muy elevadas del factor de necrosis tumoral (TNF)⁽³⁵⁾. En el estudio de Criado García y col⁽³⁶⁾ se evaluó la modulación de la expresión de los genes que codifican para las subunidades α y β de la C4bBP por diferentes citoquinas y se encontró que el TNF solo o en combinación con interleuquinas inhibía la expresión de ambas subunidades de la C4bBP en ensayos *in vitro*. Esto podría conducir a una disminución de la concentración antigénica de la proteína en los

pacientes con SAF.

En conclusión, nuestros datos sobre los niveles disminuidos de C4bBP en pacientes con $\alpha\beta_2$ GPI refuerzan el concepto de la relación fisiológica existente entre ambas proteínas. Teniendo en cuenta los nuevos aspectos funcionales de la C4bBP es posible especular sobre la existencia de algún rol de la misma en la fisiopatología del SAF.

RESUMEN

Los anticuerpos dirigidos contra la β_2 glicoproteína I ($\alpha\beta_2$ GPI) son reconocidos como uno de los más frecuentes autoanticuerpos presentes en pacientes con anticuerpos antifosfolípidos (aFL). Los $\alpha\beta_2$ GPI son considerados un mejor marcador de las complicaciones clínicas del síndrome antifosfolípido que la presencia de aFL. Dado que la β_2 GPI y la proteína de unión a C4b (C4bBP) presentan cierta homología estructural y en base a la disminución de C4bBP asociada a la presencia de anticuerpos anticardiolipina encontrada en un estudio previo, se evaluó en 131 pacientes con aFL si la disminución de C4bBP estaba asociada a los $\alpha\beta_2$ GPI. Los niveles antigénicos (media \pm DE) de C4bBP fueron menores en el grupo de pacientes con $\alpha\beta_2$ GPI ($n=57$) comparados con el grupo normal ($n=44$) (74,3% \pm 28,1 vs. 94,6% \pm 20,9; $p<0,005$). Las diferencias fueron aún más significativas al considerar al isotipo IgG: el grupo $\alpha\beta_2$ GPI-IgG(+) ($n=41$) tuvo valores más reducidos de C4bBP (70,1% \pm 26,8) que el grupo normal ($p<0,005$) y que el grupo $\alpha\beta_2$ GPI-IgG(-) ($n=90$; 86,0% \pm 30,5; $p<0,05$). La deficiencia de C4bBP (niveles $< 70\%$) fue más frecuente en el grupo $\alpha\beta_2$ GPI-IgG(+) (63,4%) que en el $\alpha\beta_2$ GPI-IgG(-) (34,4%; $p<0,005$). Se encontró además que los pacientes con aFL e historia de trombosis venosa ($n=32$) presentaban niveles de C4bBP menores (75,1% \pm 27,9) comparados con el grupo normal ($p<0,05$). El mecanismo de disminución de C4bBP no ha sido aún aclarado. El hallazgo de la alteración del sistema C4bBP/proteína S, principalmente en pacientes con $\alpha\beta_2$ GPI podría explicar, al menos en parte, el mayor riesgo trombótico de aquellos pacientes con estos autoanticuerpos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brandt JT, Triplett D.A., Alving B., Scharrer I.: Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: An update. *Thromb Haemost* 1995; 74:1185-1190.
2. Harris EN, The Second International Anticardiolipin Standardization Workshop/The Kingston Antiphospholipid Antibody (KAPS) Study Group. *Am. J. Clin. Pathol* 1990;94:476-484.
3. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA.: Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not

- directed to phospholipid only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. **Thromb Haemost** 1991; 66:629-632.
4. Mc Neil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA.: Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibition of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:4120-4124.
 5. Galli M, Comfurius P, Maassen C y col.: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. **Lancet** 1990; 335:1544-1547.
 6. Oosting JD, Derksen RHWM, Entjes HTI, Bouma BN, De Groot PG. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of β_2 -glycoprotein I. **Thromb Haemost** 1992; 67:499-502.
 7. Harris EN. The antiphospholipid syndrome – an introduction. **Phospholipid-Binding Antibodies**. Harris EN, Exner T, Hughes GRV y Asherson RA CRC Press, Boca Raton, Florida, USA 1991; p 373-386.
 8. Carreras L, Forastiero R, Falcón C, Maclouf J. Syndrome des antiphospholipides: de la reconnaissance des phospholipides à celle des «antiphospholipides-proteines». **Hématologie** 1996; 3:203-210.
 9. Martinuzzo M, Forastiero R, Carreras LO. Anti β_2 -glycoprotein I: detection and association with thrombosis. **Br J Haematol** 1995; 89:397-402.
 10. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, Kordich LC, Carreras LO. Relationship of anti β_2 -glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. **Thromb Haemost** 1997; 78:1008-1014.
 11. Cabiedes J, Cabral A, Alarcón-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti β_2 -glycoprotein I than with antiphospholipid antibodies. **J Rheumatol** 1995; 22: 1899-1906.
 12. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. Antibodies to phospholipid-free β_2 -glycoprotein I in patients with primary antiphospholipid syndrome. **J Rheumatol** 1995; 22: 1894-1898
 13. Balestrieri G, Tincani A, Spatola L y col. Anti beta₂-glycoprotein I antibodies: a marker of antiphospholipid syndrome?. **Lupus** 1995; 4:122-130.
 14. 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** 1995; 75:721-724.
 15. Carreras LO, Forastiero RR. Pathogenic role of antiprotein-phospholipid antibodies. **Haemostasis** 1996; 26:340-357.
 16. Arnout J. The pathogenesis of the anti-phospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. **Thromb Haemost** 1996, 75:536-541.
 17. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles A. Activated protein C resistance phenotype and genotype in patients with primary antiphospholipid syndrome. **Blood Coag Fibrinol** 1996; 7:344-348.
 18. Bokarewa MI, Bremme K, Falk G, Sten-Linder M, Egberg N, Blombäck M. Studies on phospholipid antibodies, APC-resistance and associated mutation in the coagulation factor V gene. **Thromb Res** 1995; 78:193-200.
 19. Martinuzzo M, Forastiero R, Adamczuk Y, Cerrato G, Carreras LO. Activated protein C resistance in patients with anti β_2 -glycoprotein I antibodies. **Blood Coag Fibrinol** 1996; 7:702-704.
 20. Forastiero RR, Kordich L, Basilotta E, Carreras LO. Differences in protein S and C4b-binding protein levels in different groups of patients with antiphospholipid antibodies. **Blood Coag Fibrinol** 1994; 5:609-616.
 21. Reid KBM, Day AJ. Structure-function relationships of the complement components. **Immunol Today** 1989; 10:177-180.
 22. Forastiero RR, Cerrato GS, Carreras LO. Evaluation of recently described tests for detection of the lupus anticoagulant. **Thromb Haemost** 1994; 72:728-733.
 23. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. **Arthritis Rheum** 1996; 39:1444-1454.
 24. Pengo V, Biasiolo A, Fior MG. Autoimmune antiphospholipid antibodies are directed against a cryptic epitope expressed when β_2 -glycoprotein I is bound to a suitable surface. **Thromb Haemost** 1995, 73:29-34.
 25. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize β_2 -glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. **J Exp Med** 1994; 179:457-462.
 26. Roubey RAS, Eisenberg RA, Harper MF, Winfield JB. Anticardiolipin autoantibodies recognize β_2 -glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of antigen density and bivalent binding. **J Immunol** 1995; 154:954-960.
 27. Hunt J, Krilis S. The fifth domain of β_2 -glycoprotein I contains a phospholipid binding site (cys281-cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. **J Immunol** 1994; 152:653-659;
 28. Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y y col.: Human β_2 -glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using deleted mutants expressed by a baculovirus system. **Blood** 1996; 87:3262-3270.
 29. Sánchez-Corral P, Corral García O, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding

- protein. I. Molecular basis for the C4bBP isoform pattern and its variations in human plasma. *J Immunol* 1995; 155:4030-4036.
30. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993; 70:29-35.
31. Koppelman SJ, van't Veer C, Sixma JJ, Bouma BN. Synergistic inhibition of the intrinsic factor X activation by protein S and C4b-binding protein. *Blood* 1995; 86:2653-2660.
32. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M. y col. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: A four-year prospective study from the Italian registry. *Am J Med* 1996; 100:530-536.
33. Schjetlein R, Haugen G, SandsetPM, Wisloff F. Reduced C4b-binding protein in preeclampsia. *Thromb Res* 1997; 85:153-158.
34. Merrill JT, Lahita RG. The antiphospholipid syndrome and SLE: is there a clue in the link between complement and coagulation?. *Lupus* 1996; 5:6-10.
35. Ferro D, Pittoni V, Quintarelli C y col.: Coexistence of antiphospholipid antibodies and endothelial perturbation in systemic lupus erythematosus patients with ongoing prothrombotic state. *Circulation* 1997; 95:1425-1432;
36. Criado García O, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines. *J Immunol* 1995; 155:4037-4043.