



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUIMICA

**“Rol de la p38MAPK en la activación de plaquetas y células
endoteliales mediada por los anticuerpos Antifosfolípidos”**

Mariano Esteban Vega Ostertag

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2010

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Antiphospholipid Standardization, dependiente del Departamento de Microbiología, Bioquímica e Inmunología de Morehouse School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA; Laboratorio de Antiphospholipid Standardization, dependiente de la División de Reumatología del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA y en la Cátedra del Practicanato de Bioquímica, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre el 1 de mayo de 2007 y el 17 de Diciembre de 2010, bajo la dirección de la Dra. Silvia Susana Pierangeli, Profesora de Medicina de la Division de Reumatologia del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA y la Dirección Asistente de la Dra. Nélide Nora Polini, Profesora Adjunta del Practicanato Bioquímica.

Firma del Alumno



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaria General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis a sido aprobada el **05/07/2011**, mereciendo la calificación de **(Diez sobresaliente)**

**A la memoria de mi mamá Celia Elena Ostertag y
de mi hermano José Pablo Vega**

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mucha gente:

- A la Dra. Silvia Susana Pierangeli, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella en los EE.UU, por darme los medios y la libertad para investigar, por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo de tesis y por haber aceptado ser su Directora, por compartir cada momento de mi vida en ese maravillosos País que tan marcado dejó mi corazón.
- A la Dra. Nelida Nora Pollini, por haber sido la profesora que me inició en este camino del estudio de la hemostasia, compartiendo su pasión, dedicación, conocimiento y toda su energía en aquellos prácticos de coagulación en épocas estudiantiles. Por permitirme realizar este trabajo de tesis, por haberme aceptado como tesista, por brindarme todo su apoyo, paciencia y cariño.
- A la Dra. Lucia Kordich, por haberme contagiado su pasión por el estudio de la hemostasia, por hacerme como pasante en los tiempos de mi Residencia Bioquímica, por enviarme a la Fundación Favaloro a completar mi formación profesional y por ser un ejemplo de honestidad, profesionalismo y sobre todo un ejemplo de vida.
- A la Dra Marta Martinuzzo, por ser una guía profesional, por contagiarme con su entusiasmo por el estudio de las plaquetas, por brindarme su amistad, cariño y por haber estado siempre atenta al camino de mi vida.
- Al Dr. Ricardo Forastiero, por ser una guía profesional, por haberme brindado su amistad, cariño y por haberme hecho sentir un hermano menor.
- Al Dr. Nigel Harris, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por apoyar mi trabajo y compartir el entusiasmo de los avances en el estudio de esta

enfermedad que él mismo reportó junto con otros investigadores varias décadas atrás.

- A mi mamá, por enseñarme que en la vida hay que luchar por lo que uno cree, por su amor, por haber luchado tanto para compartir un rato más de tiempo con nosotros y por que sé que desde el cielo siempre me seguirá cuidando.
- A mi Hermano Pablito, por ser siempre mi hermano mayor, porque lo extraño y lo extrañaré el resto de mi vida.
- A mi papá, por ser un padre maravilloso, por inculcarme el valor del trabajo, la honestidad, la sencillez, la generosidad, por haber estado siempre orgulloso de mí, por haberme apoyado incondicionalmente durante toda mi vida.
- A mi hermanita, por sé que siempre está, porque la amo.
- A mi hija Sophia, por ser la luz de mi vida, porque su amor tan puro y verdadero me sostiene y me da fuerzas.
- A Caro, por acompañarme a realizar mis sueños en los EE.UU.

Así mismo, hago extensivo mi agradecimiento al:

- Laboratorio de Antiphospholipid Standardization, dependiente del Departamento de Microbiología, Bioquímica e Inmunología de Morehouse School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA.
- Laboratorio de Antiphospholipid Standarization, dependiente de la División de Reumatología del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA
- Cátedra del Practicanato Profesional de Bioquímica, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, en cuyas instalaciones se realizó parte del trabajo de esta tesis.

Resumen

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune sistémica, que se caracteriza por la presencia conjunta de trombosis vascular o complicaciones obstétricas (pérdida fetal o abortos espontáneos a repetición) y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFLs) en el plasma de los pacientes.

El mecanismo por el cual esos anticuerpos producen la enfermedad no se comprende totalmente, y esto se debe a la poli especificidad de estos anticuerpos, la multiplicidad de los sitios de acción y por la variabilidad del contexto clínico en donde se presenta la enfermedad.

Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se demostró que la actividad trombogénica de los aFLs esta determinada entre otras por la interferencia que producen estos anticuerpos con el sistema hemostático: inhiben el camino de la proteína C activada, impiden la normal fibrinólisis y producen la activación celular, principalmente células endoteliales, monocitos y plaquetas. En las células endoteliales (CE) y en los monocitos, los aFLs incrementan la expresión de FT y moléculas de adhesión, mientras que en las plaquetas se observó un aumento en la producción plaquetaria de TXA₂, agregación y liberación de los gránulos plaquetarios en presencia de dosis subagregantes de diferentes agonistas.

Con el fin de dilucidar los mecanismos intracelulares involucrados en la activación celular mediada por los aFLs, se estudió el rol de la p38 MAPK, una proteína serina/treonina quinasa, que constituye la mayor cascada de transducción de señales inflamatorias desde la superficie celular hacia el núcleo.

En este trabajo de tesis se comprobó que los aFLs producen la activación de la p38 MAPk en las plaquetas y en las CE, y que esta vía de activación intracelular es en gran parte responsable del incremento de la activación plaquetaria y de las CE, debido a que los efectos protrombóticos y proinflamatorios de los aFLs son disminuyen significativamente cuando se inhibe la p38MAPk con el inhibidor específico SB20380.

Abstract

Antiphospholipid Syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease, characterized by the joint presence of vascular thrombosis or obstetric complications (fetal loss or recurrent spontaneous abortions) and the presence of antiphospholipid antibodies (aPL) in the plasma of patient.

The mechanism by which these antibodies cause disease is not fully understood, and this is due to the poly specificity of these antibodies, multiple sites of action and variability of clinical context where the disease occurs.

Using *in vitro* and *in vivo* showed that the thrombogenic activity of aPL is determined among others by the interference caused by these antibodies with the hemostatic system: the way to inhibit activated protein C, prevent normal fibrinolysis and cell activation occur mainly endothelial cells, monocytes and platelets. In endothelial cells (EC) and monocytes, AFLS increase TF expression and adhesion molecules, whereas in platelets was observed an increase in platelet production of TXA₂, platelet aggregation and release in the presence of doses of subagregantes different agonists.

In order to elucidate the intracellular mechanisms involved in mediated cell activation by the aPL, we studied the rol of p38 MAPK, a protein serine / threonine kinase, which constitutes the major transduction cascade of inflammatory signals from the cell surface to the nucleus.

In this thesis aPLs were found to produce the activation of p38 MAPK in platelets and EC, and that the intracellular activation pathway is largely responsible for the increased platelet activation and EC, because that prothrombotic and proinflammatory effects of aPLs are significantly diminished when p38MAPK was inhibited with specific inhibitor SB20380.

Indice

| | |
|---|----|
| Introducción | 1 |
| 1.-Sistema Hemostático | 2 |
| 1.1-cascada de la coagulación..... | 3 |
| 1.2-Rol del FT en la hemostasia..... | 4 |
| 2.-Endotelio | 7 |
| 2.1-Expresión de moléculas de adhesión..... | 7 |
| 2.2-Regulación de la hemostasia por las CE..... | 8 |
| 2.3- Actividad procoagulante del endotelio..... | 9 |
| 2.4.-Actividad anticoagulante del endotelio..... | 9 |
| 2.5.-Regulación de la fibrinólisis por el endotelio..... | 12 |
| 2.6.-Modulación de la función plaquetaria y el tono vascular..... | 13 |
| 2.6.1- Oxido nítrico..... | 13 |
| 2.6.2.- Prostaglandinas..... | 14 |
| 2.6.3.-Ectonucleotidasa CD39..... | 15 |
| 2.7.- Heterogeneidad del endotelio..... | 16 |
| 3.- Plaquetas | 17 |
| 3.1.-Función y mecanismo de activación..... | 17 |
| 3.2.- Activación plaquetaria: Interacción de las plaquetas con el endotelio dañado..... | 19 |
| 3.3.-Secreción y agregación plaquetaria..... | 19 |
| 3.4.- Interacción de las plaquetas con el endotelio en la inflamación..... | 20 |
| 3.5.- Activación plaquetaria: transducción de señales intracelular mediada por agonistas solubles..... | 21 |
| 3.6.- Activación plaquetaria: transducción de señales intracelular mediada por receptores de adhesión..... | 23 |
| 3.7.- producción de TXA ₂ | 25 |
| 4.- Síndrome Antifosfolípido | 26 |
| 4.1.- Introducción al Síndrome Antifosfolípido..... | 26 |
| 4.2.- Anticuerpos antifosfolípidos..... | 28 |
| 4.3.-Mecanismos trombogénicos de los aFLs..... | 30 |
| 4.4.- Evidencia de la activación plaquetaria mediada por los aFLs..... | 30 |
| 4.5.-Hipótesis de la activación plaquetaria | |

| | |
|---|-----------|
| mediada por aFLs vía receptor específico en plaquetas..... | 33 |
| 4.6.- Evidencia de la activación de CE y monocitos mediada por los aFLs..... | 34 |
| 4.7.- Hipótesis de la activación celular mediada por aFLs vía receptor específico..... | 36 |
| 5.- Transducción de señales y control de la expresión de los genes..... | 38 |
| 5.1.-Introducción..... | 38 |
| 5.2.- Proteínas Quinasas activadas por mitógenos (MAPK)..... | 39 |
| 5.3.- Identificación de las p38-MAPK..... | 41 |
| 5.4.- Regulación del camino de transducción de señales de las p38MAPK..... | 43 |
| 5.5- Respuestas biológicas de la activación de P38MAPK Rol de p38 en la inflamación..... | 44 |
| 5.6.- Rol de P38 y ERK quinasas en las plaquetas..... | 45 |
| 6.- Inhibidores de la ERK1/2 y p38MAPK..... | 48 |
| 6.1.- Inhibición de ERK1/2..... | 48 |
| 6.2.- Inhibición de la p38 MAPK..... | 48 |
| Materiales y Métodos..... | 50 |
| 1.-Selección de pacientes y controles..... | 51 |
| 2.-Animales de Experimentación..... | 51 |
| 3.-Reactivos..... | 52 |
| 3.1.-Reactivos químicos..... | 52 |
| 3.2.-Soluciones buffer..... | 52 |
| 3.3.-Anticuerpos empleados..... | 52 |
| 4.-Métodos..... | 54 |
| 4.1.-Purificación de IgGs..... | 54 |
| 4.2.- Obtención de los fragmentos F(ab')₂..... | 54 |
| 4.3.-Determinación de anticuerpos anti fosfolípidos..... | 55 |
| 4.3.1.-Detección de anticoagulante lúpico..... | 55 |
| 4.3.2.-Detección de anticuerpos anticardiolípidinas..... | 55 |
| 4.3.3.-Detección de anticuerpos anti-β ₂ glicoproteína I..... | 56 |
| 4.4.-Inmunoblot..... | 56 |

| | |
|--|----|
| 4.5.-Estudios en plaquetas | 57 |
| 4.5.1.-Aislamiento de plaquetas..... | 57 |
| 4.5.1.1.-Preparación de plaquetas lavadas..... | 57 |
| 4.5.1.2.-Preparación de PFG..... | 57 |
| 4.5.2.-Estudio de la fosforilación de p38 MAPK y de p44/p42 MAPK en plaquetas humanas..... | 58 |
| 4.5.3.-Estudio de la fosforilación de cPLA ₂ | 58 |
| 4.5.4.-Estudios de Agregación plaquetaria..... | 59 |
| 4.5.5.-Estudio de producción de Tromboxano β_2 | 59 |
| 4.5.6.-Estudios de la Movilización de Calcio intracelular..... | 60 |
| 4.6.-Estudios en células endoteliales | 61 |
| 4.6.1.-Cultivo de Células de Cordón Umbilical Humano..... | 61 |
| 4.6.2.-Estudio de la expresión de Factor Tisular (FT) inmunológico en cultivos de HUVECs..... | 61 |
| 4.6.3.-ELISA para la detección de FT..... | 61 |
| 4.6.4.-Estudio de la expresión de FT funcional en células HUVECs..... | 62 |
| 4.6.5.-ELISA para la determinación de IL-6 y IL-8..... | 63 |
| 4.6.6.-Estudios de Western Blot para la detección de iNOS y p38MAPK..... | 63 |
| 4.6.7.-Análisis de RNA mensajero para el FT..... | 64 |
| 4.6.8.-Elisa para la determinación de ICAM-1..... | 65 |
| 4.6.9.- Adhesión de monocitos a células endoteliales..... | 65 |
| 4.7.-Estudios “in vivo” | 67 |
| 4.7.1.- Análisis de la Dinámica de Formación del Trombo..... | 67 |
| 4.7.2.- Adhesión de Leucocitos al endotelio..... | 68 |
| 4.7.3.-Estudio de la agregación plaquetaria en ratón..... | 70 |
| 4.7.4.- Determinación de la actividad del FT en células peritoneales de ratón..... | 70 |
| 4.7.5.-Determinación de la actividad de FT en homogenados de arteria carótida de ratón..... | 71 |
| 4.7.6.-Determinación de la expresión de VCAM-1 endotelial en cortes de aorta de ratón..... | 71 |
| 4.8.-Métodos Estadísticos | 73 |

| | |
|--|----|
| Resultados y Discusión | 74 |
| 1.-Selección de Pacientes y Controles | 75 |
| 1.1.-Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con SAF..... | 76 |
| 1.2.-Caracterización de las IgG-aFL y los fragmentos F(ab') ₂ | 76 |
| 1.3.-Determinación del nivel de contaminación de las IgGs purificadas..... | 76 |
| 2.- Estudios en Plaquetas | 77 |
| 2.1.-Efectos de los aFLs sobre la fosforilación de p38MAPK en plaquetas..... | 77 |
| 2.2.- Efectos de los aFLs sobre la fosforilación de ERK1/ERK2..... | 79 |
| 2.3.- Efectos de los inhibidores específicos de p38MAPK y ERK1/ERK2 sobre el incremento de agregación mediado por IgG-aFL..... | 80 |
| 2.4.- Efectos de los aFLs sobre la fosforilación de FLA2c..... | 81 |
| 2.5.- Efectos de anticuerpos aFL sobre la producción de Tromboxano B ₂ | 82 |
| 2.6.- Efectos de anticuerpos aFL en la movilización de calcio intraplaquetario..... | 83 |
| 3.-Estudios en células endoteliales | 84 |
| 3.1.- Resultados de la expresión antigénica de FT en células HUVECs incubadas con IgG aFL o IgG SHN..... | 84 |
| 3.2.- Efecto de diferentes inhibidores sobre la expresión de FT inducida por los aFLs sobre las células HUVECs..... | 85 |
| 3.3.- Efecto de los aFL sobre la expresión de FT funcional en las células HUVECs..... | 86 |
| 3.4.- Efecto del inhibidor SB203580 sobre el incremento del FT funcional en HUVECs..... | 89 |
| 3.5.- Efecto de los aFLs sobre la expresión del ARNm del FT en las HUVECs..... | 89 |
| 3.6.- Efecto de los aFLs sobre la fosforilación de P38MAPK y la expresión de NOSi en las HUVECs..... | 91 |

| | |
|--|------------|
| 3.7.- Efecto de los aFLs sobre la producción de IL-6 e IL-8 en las HUVECs..... | 92 |
| 3.8.- Estudio de la Adhesión de monocitos a células endoteliales en presencia de aFL..... | 94 |
| 3.9.- Efecto del inhibidor SB203580 sobre el incremento de ICAM-1 mediado por los aFL en las células HUVECs..... | 96 |
| 4.- Estudios “in vivo” | 98 |
| 4.1.- Estudio de la trombosis y activación endotelial mediada Por los aFL en presencia del inhibidor SB203580..... | 98 |
| 4.2.- Adhesión de leucocitos a células endoteliales..... | 99 |
| 4.3.- Efecto de los aFL sobre la agregación plaquetaria..... | 100 |
| 4.4.- Actividad del FT en homogenados de arteria carótida y células peritoneales..... | 101 |
| 4.5.- Estudio del efecto del inhibidor de p38MAPK (SB203580) sobre la expresión de VCAM-1 mediada por los aFL en el endotelio de aorta de ratón..... | 103 |
| Conclusiones | 105 |
| 1.- Estudios en Plaquetas | 106 |
| 2.-Estudios en células endoteliales | 107 |
| 3.- Estudios “in vivo” | 108 |
| Referencias Bibliográficas | 110 |
| Abreviaturas | 132 |
| Artículos Originales | 135 |
| Artículos originales que forman parte de este trabajo de tesis..... | 136 |
| Artículos originales que forman parte colateral de este trabajo de tesis..... | 136 |

Introducción

1.- Sistema Hemostático

En los mamíferos existe un sistema hemostático muy complejo que permite mantener la integridad de los vasos sanguíneos en un sistema circulatorio cerrado de alta presión. Se basa en la formación de un coágulo impermeable compuesto por plaquetas y fibrina que es contenido y localizado en el sitio de la injuria (1,4). Este sistema está compuesto por:

- a. La pared de los vasos sanguíneos, recubiertos con células endoteliales (CE), que en condiciones normales mantienen una superficie inerte, inactiva, capaz de soportar el flujo sanguíneo sin interactuar con los componentes celulares de la sangre.
- b. Proteínas plasmáticas solubles las cuales participan en la coagulación de la sangre o en la regulación de la coagulación.
- c. Componentes celulares de la sangre: plaquetas, eritrocitos y leucocitos, incluyendo granulocitos, monocitos y linfocitos.
- d. Micropartículas derivadas de las CE, los leucocitos y las plaquetas, aunque la información sobre la función de éstas es todavía limitada.

Todos estos componentes juegan un rol primario de diferentes maneras en este mecanismo de defensa, y participan directamente en el proceso hemostático. En condiciones normales los componentes del sistema hemostático circulan en la sangre en forma inactiva. Luego de que se produce una injuria vascular, este sistema se activa. La disrupción del endotelio lleva a la exposición de la matriz subendotelial, con la consecuente adhesión de plaquetas al colágeno, factor Von Willebrand (FvW) y la expresión subendotelial del factor tisular (FT) (9, 44,45). Alternativamente las CE son activadas, con la expresión de receptores en la membrana plasmática, la exocitosis de los cuerpos de Weibel Palade, y la iniciación de procesos bioquímicos internos. Cambios en la membrana plasmática alteran la composición de los fosfolípidos presentados al flujo sanguíneo. Con la expresión del FT, los zimógenos de las proteínas de la coagulación son convertidos secuencialmente en enzimas, y se forma rápidamente trombina. Así se inicia la formación del trombo (1-4, 23,24).

El sistema hemostático es regulado con gran precisión y se conocen las vías de regulación críticas (24, 31-36). Cuando la activación del sistema excede los controles regulatorios normales que contienen y localizan la formación del trombo en el área de la injuria, ocurre una formación patológica del trombo que conocemos como trombosis (62).

1.1.-Cascada de la Coagulación

El camino del FT es el disparador más importante de la cascada de la coagulación, este factor activo es normalmente expresado en muchos tipos de células fuera de la vasculatura sanguínea. Luego de que ocurre una injuria vascular o tisular, se expone a la circulación esta glicoproteína integral de membrana, la cual tiene un peso molecular de 45 Kda, y actúa como receptor de alta afinidad y también como cofactor para el factor de coagulación VII activado (VIIa), de modo que este complejo FT-VIIa actúa eficientemente activando a los factores IX a IXa y X a Xa respectivamente, lo que lleva a la formación de bajas concentraciones de trombina, la cual activa los cofactores V y VIII a Va y VIIIa (22,23). El complejo tenasa (FVIIIa: FIXa) juega un rol fundamental en amplificar la cascada de la coagulación al activar el factor X a Xa. El complejo protrombinasa (FVa: FXa) activa la protrombina (PT) a trombina, la cual es una proteasa central en la cascada de la coagulación (23, 24).

La trombina cliva el fibrinógeno en monómeros de fibrina solubles que luego se polimerizan. La trombina también activa a la enzima transglutaminasa denominada FXIII a FXIIIa la cual convierte a los monómeros solubles de fibrina en una matriz de fibrina (1,4).

La cascada de la coagulación es regulada por varios anticoagulantes. Un inhibidor de serina proteasas tipo kunitz llamado inhibidor del camino del factor tisular (TFPI) inhibe el complejo FT: FVIIa al formar un complejo cuaternario con el FXa (34). La proteína C (PC) es convertida a proteína C activada (PCa) por un complejo trombina: trombomodulina localizado sobre la superficie de las CE. La PCa con su cofactor la proteína S (PS) cliva e inactiva a los FVa y FVIIIa (31). La antitrombina (AT) inactiva a la trombina, aunque también puede inactivar a otras proteasas en la cascada de la coagulación, incluyendo al factor IXa, Xa, XIa y el FXIIa (36). En la figura 1 se representa la cascada de la coagulación y los principales anticoagulantes naturales involucrados en la regulación de la misma.

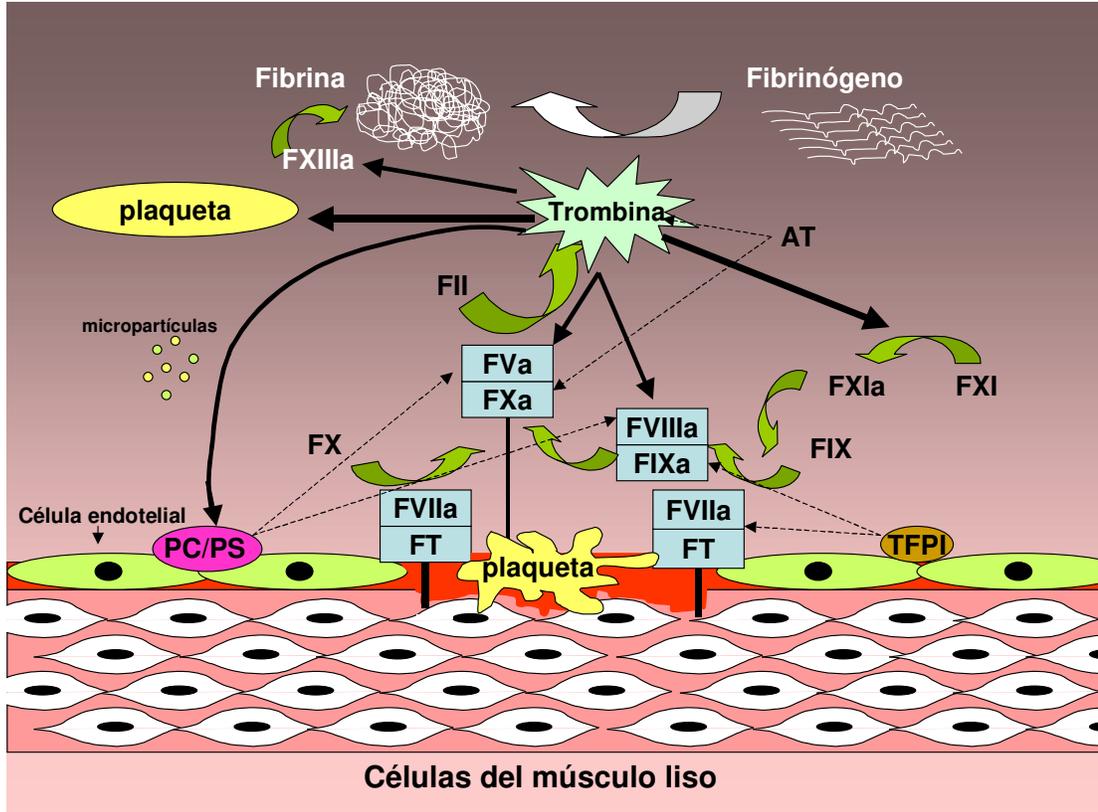


Figura 1. Cascada de la coagulación y anticoagulantes naturales. FT: factor tisular, FIIa: factor II activado, FVa: factor V activado, FVIIa: factor VII activado, FVIIIa: factor VIII activado, FIXa: factor IX activado, FXa: factor X activado, FXIa: factor XI activado, FXIIIa: factor XIII activado AT: antitrombina, PC/PS: sistema proteína C proteína S, TFPI: inhibidor del camino del factor tisular.

1.2.-Rol del FT en la Hemostasia

Estructuralmente el FT es miembro de la superfamilia de receptores de citoquinas de clase II y es importante en el desarrollo embriofetal (5-7). El gen del FT está localizado en el cromosoma 1 (p21-p22). Los 6 exones de este gen se traducen en una proteína que contiene 263 aminoácidos (aas) distribuidos en un dominio extracelular de 263 aas, una región transmembrana que contiene 23 aas y un dominio intracelular de 21 aas (8). En la figura 2 se observan los diferentes dominios del FT y la interacción entre las proteínas FT-FVII y el FX en un modelo tridimensional basado en la estructura atómica de las proteínas, el cual fue tomado del banco de datos de proteínas (PDB) (26).

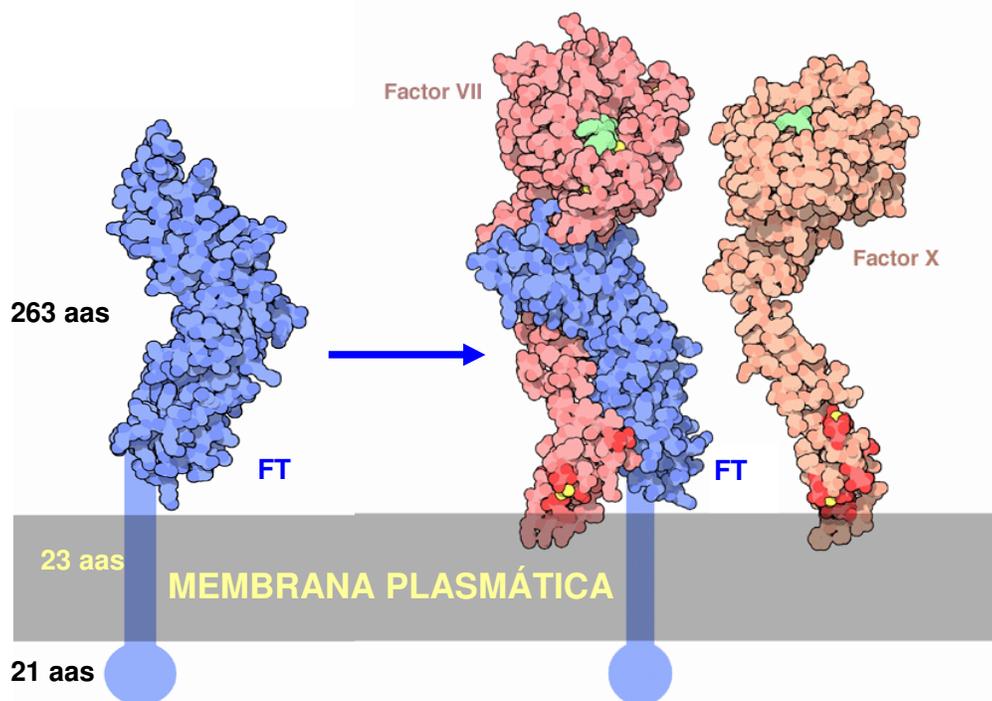


Figura 2. Formación del complejo FT - Factor VIIa.

Los seres humanos pueden vivir con bajas concentraciones de FVII, pero es imposible el desarrollo embrionario en ausencia del FT (7).

El FT une al factor VIIa para activar a los factores FIX y FX mediante proteólisis limitada, iniciando la cascada de la coagulación. Por otro lado los complejos de FT-FVIIa y FT-FVIIa-FXa están involucrados en el inicio de señales de inflamación, progresión de tumor y angiogenesis mediante el clivaje de receptores activados por proteasas (PAR) (9).

Es expresado constitutivamente en las células del músculo liso de la pared vascular, en fibroblastos de la adventicia dentro de la pared vascular y en fibroblastos que se encuentran en el tejido alrededor de los vasos sanguíneos. Se sabe que su distribución es heterogénea y depende del tejido. Existe gran concentración en cerebro, pulmón, corazón, útero, placenta y testículos, mientras hay niveles indetectables en músculo esquelético, articulaciones e hígado (24).

Contrariamente al dogma que se mantuvo durante muchos años de que el FT era mantenido constitutivamente en un compartimiento fuera del flujo sanguíneo, recientemente se comprobó que la actividad antigénica de esta proteína puede detectarse en sangre entera, más específicamente en la superficie de CE, monocitos y/o en micropartículas derivadas de estas células (10, 11).

En condiciones fisiológicas la mayor parte del FT no posee actividad protrombótica (12,13), este estado inactivo denominado encriptación, está determinado por uniones disulfuros, por lo cual posee una baja unión a factor VIIa con una ineficiente proteólisis de FX a FXa. La unión disulfuro entre las cisteínas Cys¹⁸⁶ y Cys²⁰⁹ está involucrada en el control de la actividad coagulante del FT. Esta forma inactiva puede transformarse rápidamente en activa por medio de la reducción de las uniones disulfuro (14-17).

Las CE en reposo expresan una muy pequeña cantidad de FT tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo en estas células se induce su expresión cuando son estimuladas con citoquinas, como por ejemplo: factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina-1 β (IL-1 β), o mediadores como la histamina, trombina, LDL oxidada, factor de crecimiento vascular endotelial. Estos mediadores estimulan las vías de transducción de señales que involucran a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) con activación de factores de transcripción corriente abajo tales como el factor nuclear de cadena liviana κ potenciador de células B activadas (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1) o la proteína 1 de respuesta de crecimiento temprano (Egr-1) (18-20). Además el lipopolisacárido (LPS) bacteriano produce un incremento del RNA mensajero (RNAm) del FT (21).

En individuos sanos y en ausencia de injuria se demostró la presencia de factor VII unido al FT expresado en el tejido que rodea los vasos sanguíneos, presumiblemente derivado del plasma (21). Al estudiar la activación de la cascada de la coagulación *in vivo* por métodos cromogénicos, empleando péptidos de activación de los factores FX y FIX, se observó que existe un nivel basal de activación dependiente del complejo FT: FVII (22).

Las micropartículas derivadas de las CE y monocitos, que transportan FT, circulan normalmente en la sangre en una concentración de 60 pg/mL y esta concentración se considera que está por debajo del límite para la activación de la cascada de la coagulación. Gracias al estudio de la formación de trombos *in vivo*, se pudo demostrar que el FT asociado a micropartículas se acumula y se activa en el trombo que se desarrolla en el lugar de la injuria vascular, y esta acumulación de micropartículas es dependiente de la unión P-selectina/PSGL-1. Sin embargo, en la formación del trombo el balance en la contribución del FT, derivado de la pared de los vasos sanguíneos y el derivado de las micropartículas, puede variar significativamente, dependiendo del lugar de la injuria, o del tipo de patología asociada (23).

2.- Endotelio

Estratégicamente localizado entre el flujo sanguíneo y la pared vascular se encuentra una monocapa continua de CE que cubren la superficie interna del sistema vascular y que se comporta como una barrera dinámica que regula una gran variedad de funciones fisiológicas, que incluyen: el control del tono vasomotor, el tráfico de células sanguíneas, el balance hemostático, la proliferación de músculo liso, la transducción de señales, el transporte selectivo, la permeabilidad, la angiogénesis y la inmunidad innata y adquirida (27).

La activación de las CE, está referida a los cambios fenotípicos que resultan de la estimulación de estas células por una amplia variedad de citoquinas, toxinas, factores de crecimiento o fuerzas físicas. Bajo condiciones de excesiva fricción del endotelio a causa del aumento del flujo sanguíneo (shear stress), la injuria, el incremento de la turbulencia o la inflamación, se pierden los mecanismos normales de defensa que mantienen las propiedades de trombo resistencia del endotelio (62). Esta transformación es acompañada por el incremento en la expresión de moléculas de adhesión que dirigen a las células inflamatorias a los sitios de la injuria (28-30).

La inflamación promueve la coagulación en varios aspectos: produce el aumento de la actividad intravascular del FT, aumenta la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie celular intravascular, mientras que por el contrario, disminuye la capacidad fibrinolítica y anticoagulante del endotelio (63).

2.1.-Expresión de moléculas de adhesión

El endotelio cumple un rol fundamental en la adhesión y migración de leucocitos desde la sangre a los tejidos en los sitios de inflamación, o durante la vigilancia normal del sistema inmune; mediante la regulación de moléculas de adhesión. Esta infiltración de leucocitos a los tejidos es un proceso que tiene lugar casi exclusivamente en las vénulas postcapilares y que involucra: el rodamiento sobre el endotelio, la adhesión y la transmigración a través del mismo hacia el tejido subyacente.

El primer paso o rodamiento de los leucocitos sobre el lado luminal del endotelio es mediado entre ligandos leucocitarios y las selectinas endoteliales: selectina-E y selectina-P. La adhesión firme de los leucocitos al endotelio es mediada por el aumento de la afinidad de las integrinas leucocitarias $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), $\alpha L\beta 2$ (LFA-1, CD11a/CD18), y $\alpha M\beta 2$

(Mac-1, CD11b/CD18) por las moléculas endoteliales de adhesión: molécula de adhesión endotelial 1 (ICAM-1) y molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1). Las bases moleculares de la trans migración son menos comprendidas hasta el momento pero se piensa que involucran a las moléculas CD99, PECAM-1/CD31 y la molécula de adhesión JAM-1 (28-30). En la Figura 3 se observan los pasos de rodamiento, adhesión y trans migración de leucocitos con las moléculas involucradas en cada caso.

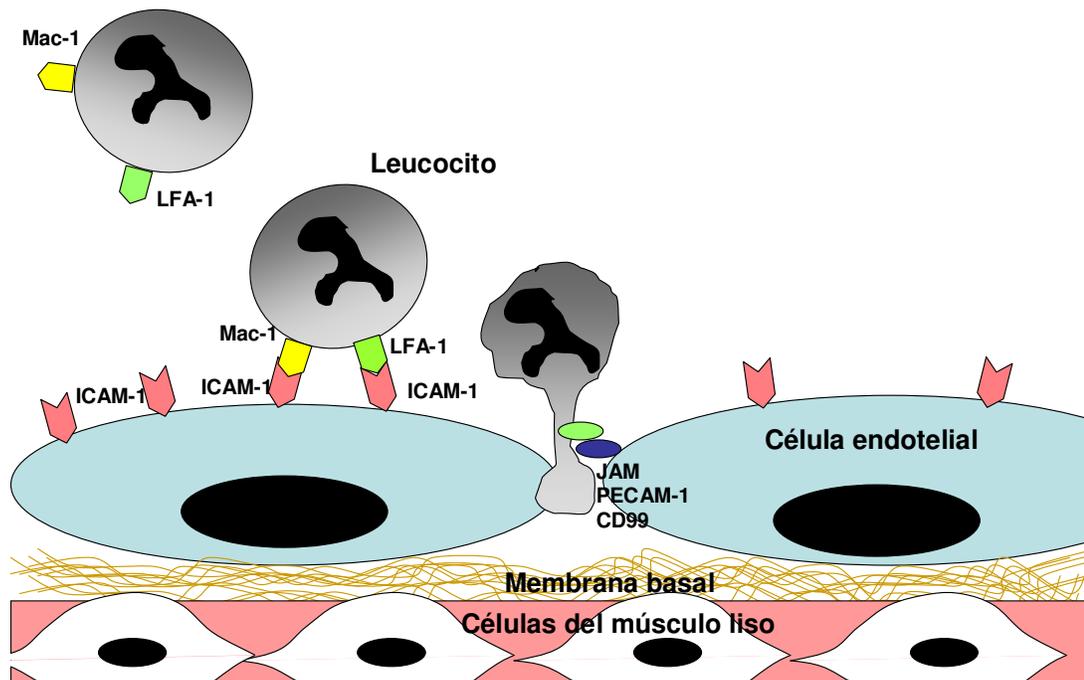


Figura 3. Activación endotelial

2.2.- Regulación de la hemostasia por las CE

El rol crítico que juega el endotelio en la homeostasis de la hemostasia, es definido por la triada de Virchow (representada en la figura 4) como el exquisito balance entre el flujo de la sangre, la reactividad de los factores de coagulación solubles circulantes y la influencia moduladora de la pared de los vasos sanguíneos.



Figura 4. Triada de Virchow

Las CE regulan la hemostasia mediante múltiples funciones que son específicas de regiones; actúan sobre la reactividad plaquetaria y el tono vascular y además modulan las vías de la coagulación y la actividad fibrinolítica (2).

2.3.- Actividad procoagulante del endotelio.

De las sustancias procoagulantes más importantes sintetizadas por las CE, tenemos a una glicoproteína multimérica de alto peso molecular denominada FvW (25), la cual tiene dos funciones fundamentales en la hemostasia normal: 1) soporta la adhesión plaquetaria a las superficies trombogénicas y la agregación bajo condiciones de estrés hemodinámico; 2) sirve como transportador del factor de la coagulación FVIII en el plasma, protegiendo a este de la rápida degradación proteolítica. La disminución de la función del FvW resulta en la tendencia al sangrado, mientras que en las arterias y en las lesiones ateroscleróticas el FvW conduce a la oclusión trombótica aguda (1, 3,10). Las demás sustancias procoagulantes sintetizadas por el endotelio son detalladas en la tabla 2.

2.4.- Actividad anticoagulante del endotelio.

En condiciones normales, en ausencia de daño vascular, el balance entre las fuerzas procoagulantes y anticoagulantes se inclina hacia esta última. Las vías más importantes de regulación de la coagulación son las constituidas por: la AT, el TFPI, la vía de la PCa, el cofactor II de la heparina y el inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z (ZPI) (31-36).

La AT es el principal inhibidor del sistema debido a su capacidad de inhibir a la trombina, el factor Xa, el factor XIa, la calicreína y la plasmina. Es una glicoproteína de

cadena simple sintetizada en el hígado, que ejerce la inhibición al crear un complejo trombina-antitrombina que se elimina rápidamente de la circulación. La velocidad de reacción puede incrementarse hasta 1000 veces en presencia de heparina, que actúa como cofactor de esta serpina, produciendo una neutralización inmediata de la trombina o del factor Xa. Los glicosaminoglicanos de la superficie endotelial como el heparán sulfato son los que tienen la capacidad de fijar AT y de esta manera actuar como cofactores de su actividad inhibitoria, confiriéndole al endotelio vascular una de sus propiedades antitrombóticas (36).

El TFPI es una serpina sintetizada primariamente por el endotelio de la microvasculatura y en pequeñas cantidades por megacariocitos y macrófagos. Inhibe al complejo enzimático factor VIIa-TF en un modo dependiente del factor Xa, a través de la formación de un complejo cuaternario (Xa-TFPI-VIIa-FT) (34).

La vía de la PCa funciona como anticoagulante al inactivar a los factores V activado (FVa) y el factor VIII activado (FVIIIa) y así disminuir la generación de trombina en el área donde se forma el coágulo, el zimógeno de la PC se localiza en el endotelio por medio de la unión al receptor de la proteína C de la célula endotelial (EPCR). La trombina generada vía la cascada de la coagulación se localiza en el endotelio por la unión a una proteína endotelial integral de membrana, denominada trombomodulina (TM), así la trombina unida a la TM queda reducida en su actividad procoagulante y además activa a la PC que junto al cofactor PS, inactivan a los factores FVa y FVIIIa. Además del efecto anticoagulante, la PCa ejerce efectos citoprotectivos que incluyen: alteración en el perfil de expresión de genes, efectos anti-inflamatorios, anti-apoptóticos y estabilización de la barrera endotelial (31).

El cofactor II de la heparina inhibe solo a la trombina, y su actividad es incrementada aproximadamente 1000 veces por el dermatán sulfato, que es sintetizado por la CE y se encuentra en la matriz extracelular asociado a proteínas adhesivas o en la superficie de fibroblastos o células musculares (32).

La anexina V es una proteína no glicosilada que une Ca^{2+} y fosfolípidos y que tiene una potente propiedad anticoagulante; es sintetizada en la placenta y en las CE de arterias y venas e inhibe la formación de trombina como así también del Xa.

El ZPI es una proteína que pertenece a la superfamilia de serpinas de inhibidores de proteasas pero que contiene un residuo tirosina en su sitio activo. La proteína Z, una proteína vitamina K dependiente semejante a los factores VII, IX, X y PC, circula formando un complejo con el ZPI. Este inhibidor es capaz de inhibir el Xa en presencia de FL y Ca^{2+} ,

pero la velocidad de esta inhibición se incrementa hasta 1000 veces en presencia de PZ (35). En la tabla 2 se resumen las sustancias anticoagulantes sintetizadas por el endotelio.

2.5.- Regulación de la fibrinólisis por el endotelio

La fibrinólisis es la degradación fisiológica de la fibrina que tiene como función limitar y disolver a los coágulos sanguíneos (37, 24). La base bioquímica de la fibrinólisis involucra la unión del plasminógeno (Plgno) circulante a la fibrina, y su activación a plasmina (Plna) por el activador del plasminógeno tisular (tPA), también unido a fibrina. Debido a que la fibrina es un cofactor necesario para la activación del Plgno a Plna, a medida que la fibrina se degrada se limita también la formación de Plgno (38). La serina proteasa tPA es sintetizada y liberada por las CE. Además de unirse a la fibrina el tPA se une a la Anexina II y otro receptor sobre la CE y la superficie plaquetaria y así la generación de Plna y la fibrinólisis queda restringida al sitio de la formación del trombo (33). El Plgno puede también ser convertido en Plna por la acción del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). La actividad catalítica de la uroquinasa son localizados sobre la superficie celular a través de la unión a un receptor de u-PA (uPAR). La fibrinólisis es controlada predominantemente por la actividad de la α_2 -antiplasmina, inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1), el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) (24). En la figura 5 se resumen las vías de regulación de la fibrinólisis.

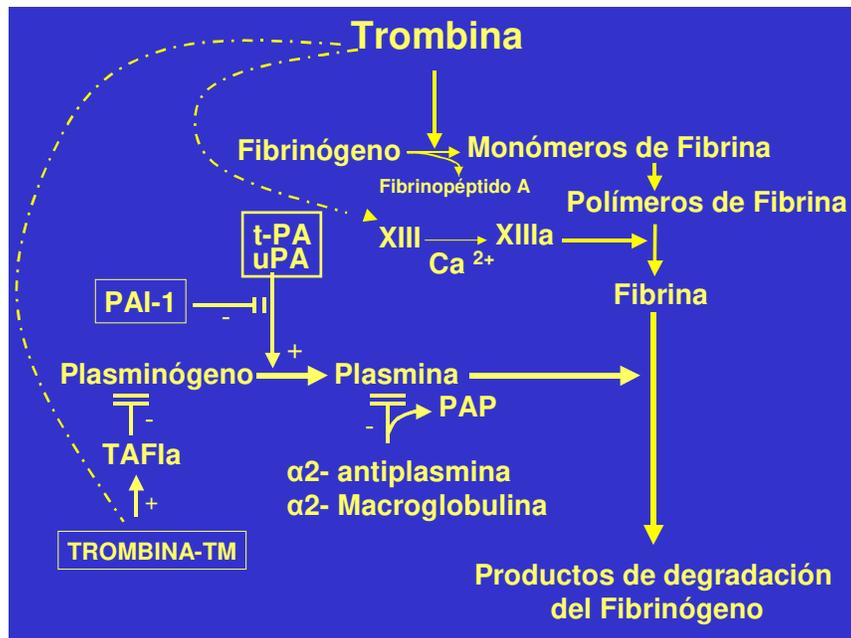


Figura 5. Sistema fibrinolítico: TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado, PAP: plasmina -antiplasmina. Trombina-TM: complejo trombina trombomodulina, PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno, t-PA: activador del plasminógeno tisular, u-PA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

2.6.- Modulación de la función plaquetaria y el tono vascular

El endotelio produce tres sustancias trombo reguladoras: óxido nítrico, prostaciclina y la ectonucleotidasa CD39.

2.6.1.- Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es una de las sustancias más importantes que produce el endotelio y ejerce una gran variedad de efectos sobre la vasculatura. Es el principal determinante del tono vascular, pero también ejerce acciones anti-trombóticas, anti-proliferativas y anti-inflamatorias. Sin embargo en grandes concentraciones y en conjunto con otros oxidantes, el NO puede producir enfermedad vascular.

El NO es sintetizado por enzimas óxido nítrico sintetasas (NOS); una familia de enzimas que incluyen NOS neuronal (NOSn), NOS inducible (NOSi) y NOS endotelial (NOSe). Las tres isoformas producen NO a partir de L-arginina en la presencia de NADPH y oxígeno. La síntesis de NO es representada en la figura 6.

En las CE existen dos formas de NOS: una constitutiva y otra inducible. La forma constitutiva (NOSe) es regulada por Ca^{2+} / calmodulina, cuando las células son estimuladas por agonistas tales como ADP, trombina, bradiquinina, estrés hemodinámico; mientras que la forma inducible es independiente de Ca^{2+} y es estimulada por citoquinas y el LPS bacteriano.

El NO producido en el citoplasma de las CE difunde hacia las células del músculo liso vascular adyacentes, y en el citoplasma de estas se une y estimula a las enzimas guanidil ciclasa soluble, lo que lleva a un incremento en el guanidil mono fosfato cíclico (GMPc) y a una disminución del Ca^{2+} intracelular. Esto produce una disminución en la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina-miosina en las células del músculo liso y promueve la vasorelajación (39, 40).

Las acciones del NO sobre la vasculatura son resumidas en la tabla 1.

Tabla 1. Acciones del NO en la vasculatura

| |
|--|
| Regulación del tono vascular |
| Inhibición de la adhesión plaquetaria, la agregación y el reclutamiento de las plaquetas |
| Modulación de la proliferación y la apoptosis |
| Modulación del ambiente redox intracelular |
| Inhibición de la adhesión leucocitaria |
| Inhibición de la respiración celular |

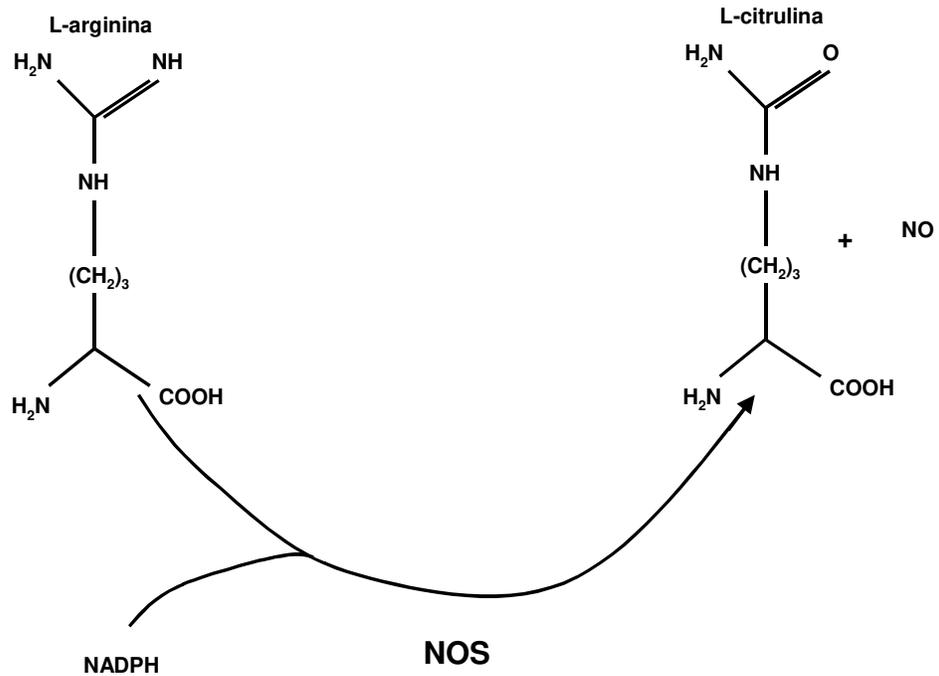


Figura 6. Síntesis de NO. NOS: oxido nítrico sintetasa. NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

2.6.2.- Prostaglandinas

Las CE producen un derivado prostanoide, llamado prostaciclina (PGI₂) que induce vasodilatación e inhibe la agregación plaquetaria.

En respuesta a una gran variedad de estímulos, que incluyen hormonas, agentes bioquímicos o fuerzas físicas, se eleva la concentración de calcio intracelular lo que activa a las fosfolipasas A₂ (PLA₂) y fosfolipasa C (PLC), que catalizan la liberación de ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de membrana. La enzima microsomal prostaglandina H sintetasa, también conocida como cicloxigenasa (COX), cataliza la oxigenación y ciclización de AA libre, produciendo el endoperóxido llamado prostaglandina G₂, el cual es luego reducido a través de la actividad peroxidasa de COX. Los endoperóxidos son transformados rápidamente a eicosanoides. El mayor y más importante producto de la COX en las CE es PGI₂, el cual es formado por la acción de una isomerasa denominada PGI₂ sintetasa. El PGI₂ tiene una vida media extremadamente corta y es metabolizado por

hidrólisis a 6-ceto-PGF_{1α}. En la figura 7 se representa la biosíntesis y el metabolismo de la PGI₂.

Existen dos formas de COX en las CE, una forma constitutiva denominada COX-1, y una forma inducible denominada COX-2, esta última es inducida por exposición de las CE a estímulos protrombóticos, inflamatorios o mitogénicos.

Los efectos bioquímicos de PGI₂ son mediados a través de proteína G y resultan en el incremento en la concentración intraplaquetaria de AMP cíclico (AMPc) que produce la inhibición del cambio de forma, ausencia de secreción plaquetaria e impide la unión del FvW y el fibrinógeno a la superficie plaquetaria (41, 42).

2.6.3.- Ectonucleotidasa CD39

La ectonucleotidasa CD39/ nucleótido trifosfato difosfohidrolasa (NTPDasa-1), es una enzima asociada a la membrana de la CE y es activada por sustrato, inhibe la función plaquetaria al metabolizar el ATP y ADP a AMP (43).

Tabla 2. Sustancias procoagulantes y anticoagulantes sintetizadas por el endotelio.

| Procoagulante | Anticoagulantes |
|--|---|
| Factor tisular | Inhibidor del factor tisular |
| Factor V | Trombomodulina |
| Receptor del factor IXa | Proteína S |
| Factor von Willebrand | Receptor endotelial de proteína C |
| | Heparán sulfato proteoglicanos (Mecanismo AT dependiente) |
| | Dermatán sulfato proteoglicanos (Mecanismo cofactor II dependiente de la heparina) |
| | Proteasa nexinas 1 y 2 |
| | Anexina V |
| Inhibidor del activador tisular del Plasminógeno (PAI-1) | Activador tisular del plasminógeno (t-PA) Activador del plasminógeno tipo Uroquinasa (u-PA) |
| Factor von Willebrand | Prostaciclina |
| Colágeno | Oxido nítrico |
| Factor activante de plaquetas | Actividad de ectonucleotidasa CD39 |

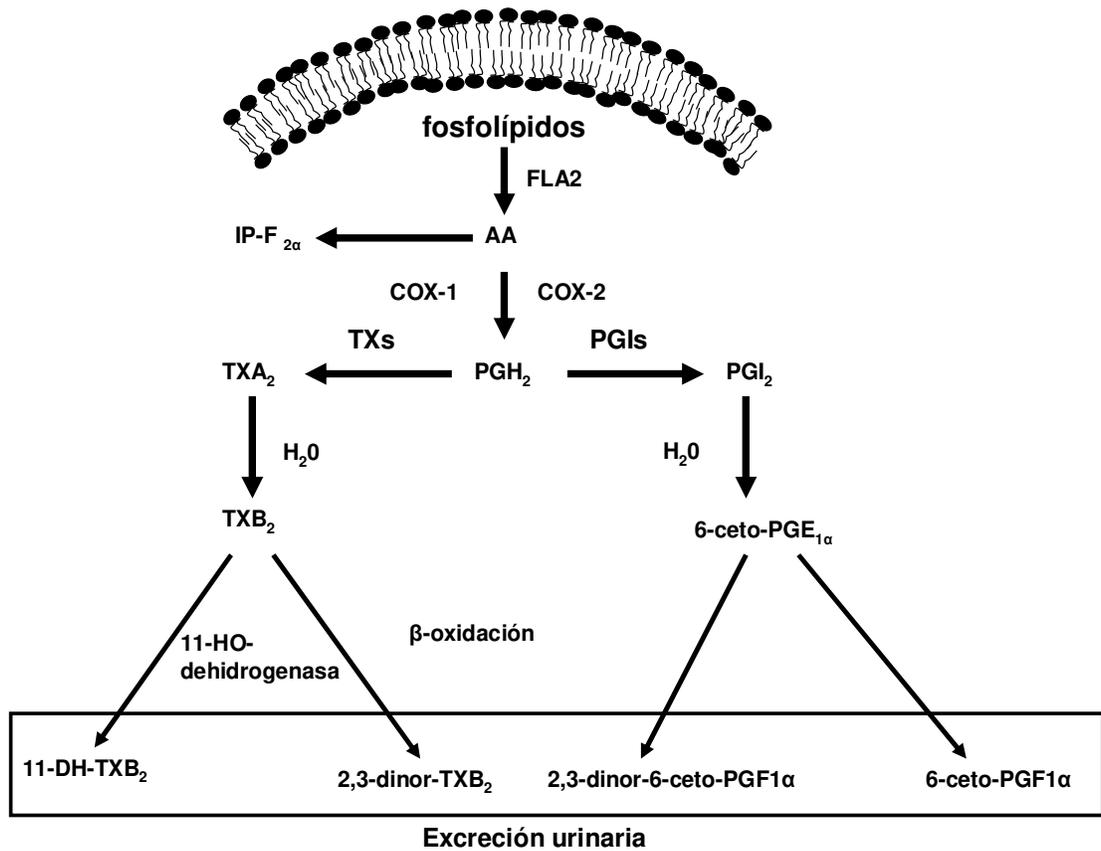


Figura 7. Síntesis de Prostaciclina

2.7.- Heterogeneidad del endotelio

El endotelio presenta una marcada heterogeneidad en cuanto a su capacidad para activar o modular los mecanismos protrombóticos a lo largo del árbol vascular (27, 41), es entonces que en la clínica, se observan patrones de trombosis específicos asociados a diferentes defectos de la hemostasia. Por ejemplo los defectos congénitos en el camino de la PCa y la TM, como así también defectos en el sistema de la AT o polimorfismos genéticos como es el de la protrombina 20210, resultan más comúnmente en trombosis venosa profunda que en trombosis arterial. En el síndrome Antifosfolípido la trombosis puede producirse tanto en venas como en arterias. Mientras que en el síndrome urémico hemolítico y en la púrpura trombocitopenica trombótica las trombosis se producen en el lecho vascular del hígado y pulmones (62, 93).

3.-Plaquetas

3.1.-Funciones y mecanismo de activación

Las plaquetas tienen como función principal la formación de un tapón hemostático fisiológico en el sitio de injuria vascular de manera de prevenir la hemorragia (hemostasia primaria), además, intervienen en reacciones de coagulación, inflamación y reparación de tejidos. En condiciones normales las plaquetas circulan en un estado inactivo en el cual no interactúan con el endotelio íntegro ni con otras células sanguíneas. Pero ante la injuria vascular, alteraciones en el flujo sanguíneo o estímulos químicos, las plaquetas se activan, con la siguiente triada funcional: adhesión, secreción y agregación (23).

3.2.- Activación plaquetaria

Interacción de las plaquetas con el endotelio dañado

Las plaquetas son activadas por el daño endotelial, a través de dos mecanismos que pueden actuar en forma conjunta o separada. Por un lado se activan al unirse a la matriz subendotelial y por otro son activadas por la trombina generada por el FT derivado de la pared vascular o del flujo sanguíneo (23).

En la fase de iniciación de la hemostasia primaria las plaquetas ruedan, se adhieren y se despliegan sobre una matriz extracelular subendotelial, compuesta por un gran número de macromoléculas adhesivas, entre ellas el: colágeno, el FvW, la fibronectina, laminina, etc, formando una monocapa de plaquetas activadas (43).

Los mecanismos de adhesión plaquetaria al sitio del daño endotelial están determinados principalmente por las condiciones reológicas del flujo sanguíneo que operan en el sitio (61).

La adhesión inicial de las plaquetas al sitio del daño vascular comienza con la interacción de las glicoproteínas plaquetarias GPVI y GPIa que se unen a las fibras de colágeno expuestas en la pared del vaso dañado y el complejo receptor glicoproteico GP Ib/V/IX que se une al FvW unido al colágeno, como se representa en la figura 8. La interacción entre FvW y GP Ib/V/IX es necesario para la unión de plaquetas al subendotelio en condiciones de alto flujo sanguíneo (44-52).

Las plaquetas poseen receptores heterodímeros, de la familia de las integrinas, compuestos por subunidades α y β que tienen baja afinidad por sus ligandos en plaquetas no activadas. Durante la adhesión inicial a la matriz subendotelial, las plaquetas son

activadas, lo que genera señales intracelulares que producen cambios conformacionales en ambas subunidades de estos complejos y que resultan en la exposición de sitios de unión o el aumento de la afinidad por sus ligandos. De esta manera la adhesión firme de las plaquetas a la matriz subendotelial es mediada por estas integrinas las cuales unen colágeno ($\alpha 2\beta 1$), fibronectina ($\alpha 5\beta 1$), laminina ($\alpha 6\beta 1$) y vitronectina ($\alpha v\beta 3$), como así también el complejo glicoproteico, más densamente expresado sobre la membrana plaquetaria, la GPIIb/IIIa o integrina $\alpha IIb\beta 3$ que interacciona con la fibronectina y el FvW unido al colágeno (53, 61).

Bajo condiciones estáticas (herida abierta) o flujo sanguíneo lento, las plaquetas pueden unirse a las fibras de colágeno directamente por medio del complejo glicoproteico GPIa/IIa, también conocida como integrina $\alpha 2\beta 1$ y así ser activadas (53, 61).

Por el otro lado el FT dispara otra vía de activación plaquetaria, la cual no requiere de los componentes de la matriz subendotelial ni tampoco requiere del FvW, y es independiente de la GPVI. El FT presente en el subendotelio forma complejo con el factor VIIa, y este complejo inicia una cascada de activación enzimática que genera trombina. Como se observa en la figura 8, la trombina cliva y activa al receptor activable por proteasa 4 (PAR-4) sobre la superficie plaquetaria y produce la activación de la plaqueta con la consiguiente liberación de adenosina difosfato (ADP), serotonina y tromboxano A_2 (TX A_2) (23).

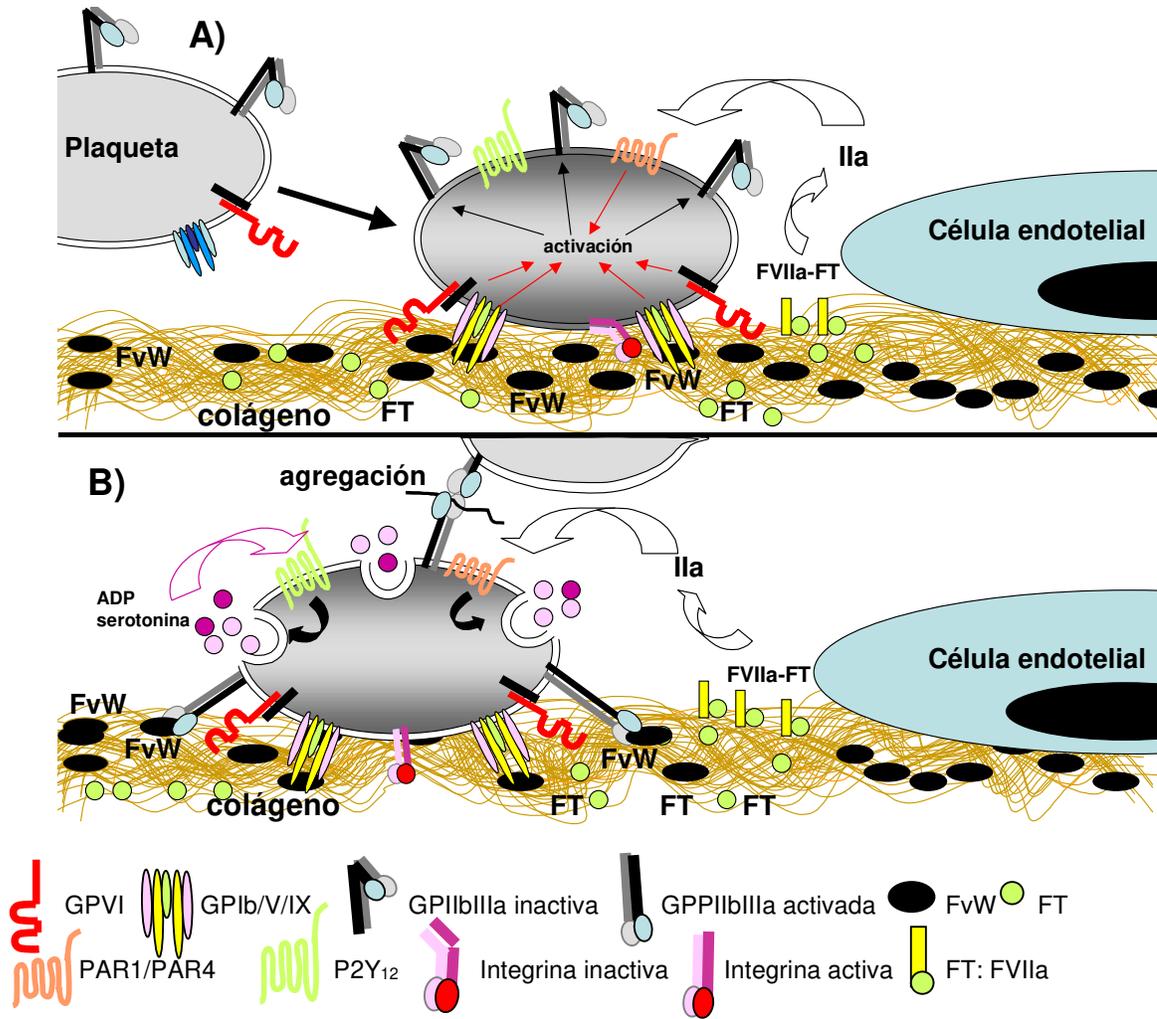


Figura 8. Adhesión plaquetaria

A) activación mediada por adhesión a colágeno.

B) amplificación de la activación mediada por agonistas solubles y agregación.

3.3.- Secreción y Agregación plaquetaria

Internamente las plaquetas están constituidas por un citoesqueleto, un sistema tubular denso, algunas mitocondrias, gránulos de glucógeno, gránulos de almacenaje α , gránulos densos (δ) y peroxisomas. Los gránulos α contienen proteínas importantes para la función hemostática de las plaquetas, tales como: FvW, fibrinógeno, P-selectina, PECAM-1, ligando CD-40 (Cd154), factor plaquetario 4 (PF4), β -tromboglobulina, trombospondina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), FV, como también un pool de GPIIb/IIIa (α IIb β 3), por el otro lado los gránulos δ , son ricos en nucleótidos (ADP y ATP), serotonina, histamina, pirofosfato y calcio (46).

Las plaquetas que circulan inactivas en la sangre tienen una forma discoide y los gránulos están homogéneamente distribuidos. Las plaquetas activadas muestran cambios en el ensamblaje de las proteínas del citoesqueleto que resultan en un cambio de forma con extensión de pseudópodos desde la membrana plasmática. Los gránulos son centralizados y por fusión con la membrana plasmática, el contenido de estos es secuencialmente liberado, proceso denominado: *secreción*; los factores liberados activan y reclutan a plaquetas circulantes con el fin de aumentar y estabilizar el coágulo hemostático. En este sentido la liberación de ADP, serotonina y TXA₂ contribuyen al reclutamiento de plaquetas circulantes y también son responsables de cambios en las plaquetas activadas que son el cambio de forma y el aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias, incluyendo: P-selectina, ligando CD40 y otros (44-52).

Como se explicó anteriormente en las plaquetas inactivas, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ posee baja afinidad por sus ligandos. En el sitio del daño vascular, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ es activada por señales intracelulares iniciadas por la exposición de las plaquetas a proteínas adhesivas subendoteliales, colágeno y FvW, o agonistas solubles como trombina y ADP. La $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activada no solo media la adhesión plaquetaria sino también la *agregación* por medio de la unión al fibrinógeno formando puentes entre dos receptores $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (heterodímero), lo cual contribuye a la estabilización del coágulo (53, 54).

3.4.- Interacción de las plaquetas con el endotelio en la inflamación

Mientras que en condiciones normales el endotelio controla la reactividad plaquetaria a través de mecanismos moduladores e inhibitorios como son el NO y la PGI₂, durante la inflamación el endotelio pierde estas propiedades de tromborresistencia y por lo tanto se generan interacciones entre las plaquetas y el endotelio. Inicialmente esta interacción se observa como rodamiento de las plaquetas sobre las CE del endotelio, y está mediada por selectinas presentes en ambos tipos celulares. La P-selectina (CD62P) es expresada rápidamente sobre la superficie de las CE en respuesta a estímulos inflamatorios por translocación desde las membranas de los gránulos de almacenaje (cuerpos de Weibel Palade) a la membrana plasmática. La P-selectina endotelial media el rodamiento de plaquetas tanto en vénulas como en arteriolas en los procesos inflamatorios al interaccionar con las glicoproteínas plaquetarias PSGL-1 o la GPIb/IX/V. La E-selectina (expresada en CE durante la inflamación), permite también la interacción entre las plaquetas y el endotelio. Luego del rodamiento la adhesión firme de plaquetas a las CE es

mediada por las integrinas β_3 ($\alpha\text{IIb}\beta_3$) de la plaqueta con la integrina $\alpha\text{v}\beta_3$ mediada por puentes fibrinógeno (55).

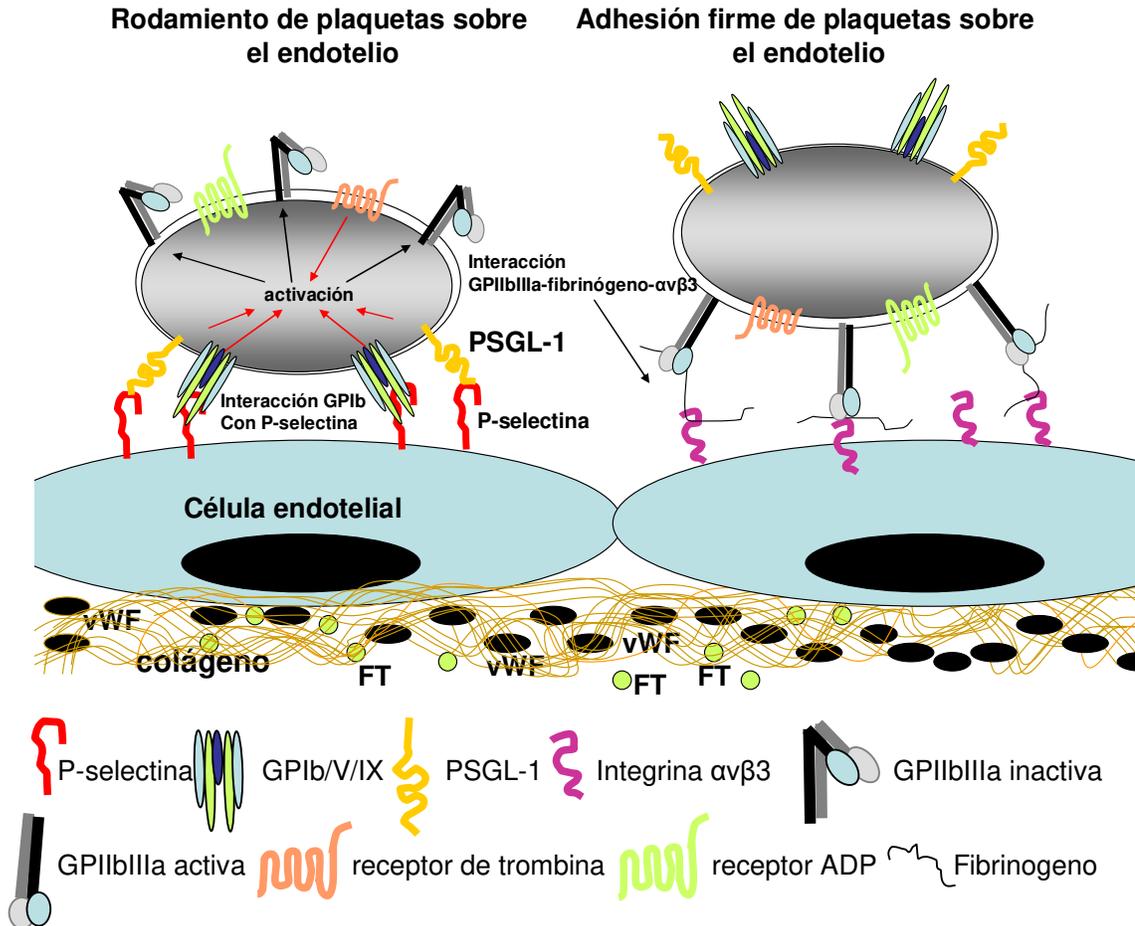


Figura 9. Adhesión de plaquetas al endotelio en la inflamación

3.5.-Activación Plaquetaria: Transducción de señales intracelular mediada por agonistas solubles

La unión de ligandos a receptores o el entrecruzamiento de receptores conduce a la producción o la liberación de diferentes mensajeros moleculares intracelulares: Ca^{2+} , productos de hidrólisis del fosfatidilinositol mediado por la PLC, diacilglicerol (DG) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), TXA_2 y nucleótidos cíclicos (AMPc, GMPc).

Los agonistas plaquetarios solubles como la trombina, el ADP, el TXA₂, la epinefrina y la serotonina se unen a sus receptores de la familia de las proteínas de siete dominios transmembrana, acoplados a proteína G heterodiméricas, unidoras de GTP, como se representa en la figura 10. Las señales a través de los receptores asociados a la proteína Gαq: receptores de trombina (PAR-1, PAR-4), receptor de TXA₂ (TPα/TPβ), receptor de ADP (P2Y₁) y receptor de serotonina (5-HT_{2A}), desencadenan el metabolismo del fosfatidilinositol a través de la activación de la PLC (50-52). Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) a fosfatidil-inositoltrifosfato (PIP₃) que dirige la movilización de Ca²⁺ desde el sistema de túbulos densos. Por su parte el DG activa a la proteína quinasa C (PKC) que fosforila y activa a la P47 fosfoproteína (Pleckstrin) la que a su vez esta relacionada a la secreción de los gránulos.

El aumento en la concentración citoplasmática de Ca²⁺ causa la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) por la quinasa de la MLC (MLCK), un proceso que es necesario para el cambio de forma. El incremento de Ca²⁺ lleva a la secreción de los gránulos, con la consiguiente liberación de ADP, el cual se une a su receptor P2Y₁₂ y amplifica la activación plaquetaria. Así mismo la movilización de Ca²⁺ produce la activación de la PLA₂, que cataliza la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria. Por medio de la ciclooxigenasa (COX), el ácido araquidónico se oxida a intermediarios inestables G₂ (PGG₂) y prostaglandina H₂. Al mismo tiempo las tromboxano sintetasas forman el TXA₂, que es secretado y se une a su receptor plaquetario (TPα/TPβ), asociado a proteína G_q, lo cual potencia los procesos estimulatorios (56-59).

La transducción de señales a través de receptores asociados a proteínas Ga_{12/13} (PAR1, PAR4) contribuye al cambio de forma en las plaquetas.

El ADP secretado también estimula la vía de transducción de señales dependientes de la proteína Gi asociada a el receptor P2Y₁₂, lo que suprime la producción del mensajero inhibidor AMPc.

La epinefrina estimula a las plaquetas a través de receptores α_{2a} acoplados a proteínas G_q, y comparte el mecanismo final de transducción de señales transmitido por los receptores P2Y₁₂.

La PGI₂ ejerce un efecto inhibidor plaquetario a través de la unión con su receptor PGI₂-R el cual esta acoplado a proteína G_{as} y estimular la producción del inhibidor mensajero AMPc.

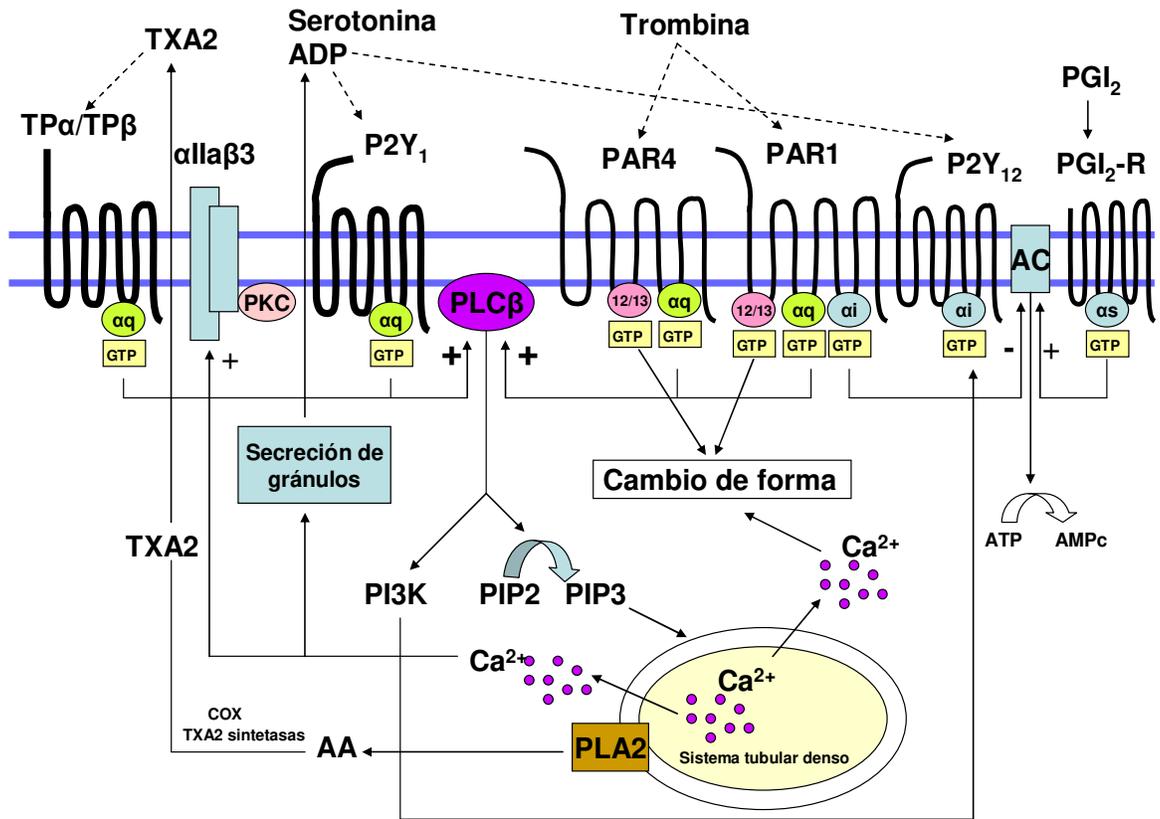


Figura 10. Transducción de señales mediada por agonistas solubles a través de receptores de siete dominios transmembrana asociados a proteínas G.

3.6.-Activación Plaquetaria: Transducción de señales intracelular mediada por receptores de adhesión

La transducción de señales derivada de la activación de las plaquetas por la unión de colágeno al GPVI es similar a la de los receptores de antígeno de los linfocitos T y B. El GPVI está asociado constitutivamente con un dímero de receptor de cadena gamma Fc (FcR-γ).

Cuando el colágeno se une al receptor GPVI se produce un entrecruzamiento de esta glicoproteína con el FcR-γ. Este entrecruzamiento genera la fosforilación de los motivos de activación tirosina inmunoreceptor (ITAM) en el FcR-γ, por medio de una tirosina quinasa Src (Lyn, Fyn). Este motivo ITAM fosforilado une y activa a una tirosina quinasa, denominada Syk.

La activación de Syk inicia la activación de varias proteínas efectoras y adaptadores, corriente abajo, que en conjunto constituyen un complejo formado por (LAT, SLP-76, Gads) el cual se asocia y activa a la fosfolipasa C gama 2 (PLC γ 2) como se observa en la figura 11. Esto da como resultado la formación de DG y IP3 (41, 42, 51, 57).

El complejo glicoproteico GP Ib/IX/V es el receptor más importante que media la interacción con el FvW. Este complejo consiste en las glicoproteínas GP Iba y GPIb β que están unidas por puentes disulfuros y asociadas en forma no covalente con la GPIX y la GPV en un complejo 2:4:2:1.

El complejo GP Ib/IX/V también une otras proteínas adhesivas (colágeno, trombospondina-1), α -trombina y factores de la coagulación (quininógenos, FXI, FXII). Además juega un rol importante en la interacción de plaquetas con células endoteliales activadas y con leucocitos, a través de la unión con P-selectina y MAC-1 (α M β 2) respectivamente. El dominio N-terminal de la GPIba contiene los sitios de unión para estos ligandos.

El modelo de cómo se produce la transducción de señales a partir de la interacción entre vWF y GPIb no es totalmente comprendido. La región citoplasmática de GPIb está asociada a filamina (proteína unidora de actina), calmodulina y 14-3-3 ζ , lo cual está asociado a otras proteínas importantes en la transducción de señales como fosfatidilinositol 3 quinasa (PI-3K), quinasa de adhesión focal (FAK), tirosinas quinasas asociadas con Src, proteínas activadoras de GTP-asas y fosfatasas de tirosinas (PTP1b y SHPTP10) (44,46, 50, 52). En la figura 11 se representan las principales proteínas asociadas a GP Ib/IX/V involucradas en la transducción de señales plaquetarias dependientes de la activación de este complejo.

Además otra vía de transducción de señales dependiente del complejo GPIb/IX/V involucra la unión con el receptor Fc de cadena γ (Fc γ RII), el cual está acoplado a la activación de Syk, fosfolipasa C γ 2 (PLC γ 2), DAG, IP3, lo que lleva a la activación de PKC y aumento en la concentración de Ca²⁺ citoplasmático y activación de α IIb β 3 (52).

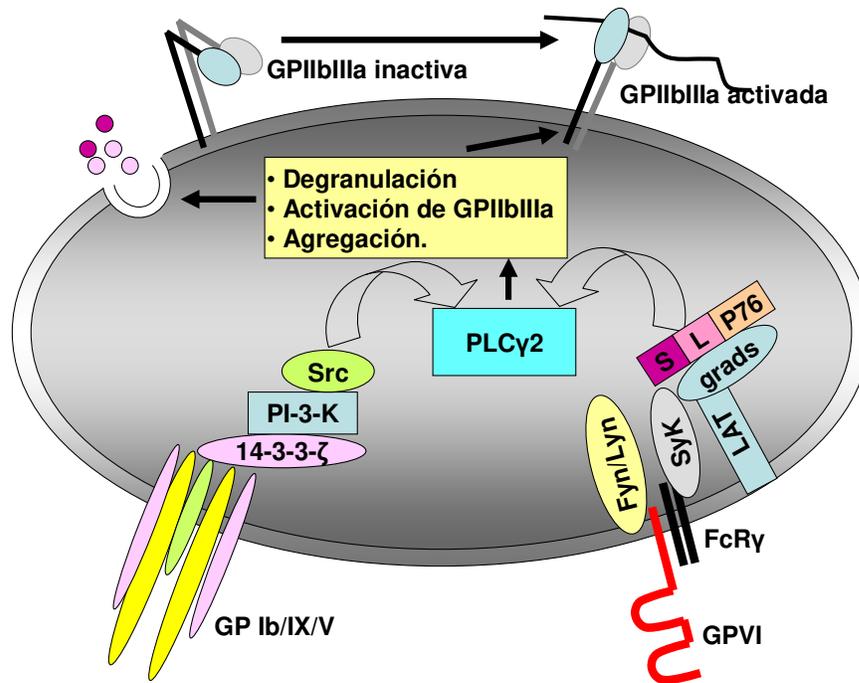


Figura 11. Transducción de señales intracelular mediada por receptores de adhesión.

3.7.- Producción de TXA₂

El TXA₂ es el eicosanoide más importante producido por las plaquetas, y posee una potente actividad proagregatoria y vasoconstrictora. Se forma a partir del ácido araquidónico liberado de lípidos de la membrana plaquetaria, por la acción secuencial de las enzimas: fosfolipasa A₂ (FLA₂), prostaglandina H sintetasa y tromboxano sintetasa, como se observa en la figura 7. Es una molécula inestable con una vida media de aproximadamente 30 segundos *in vitro*; debido a esta inestabilidad, este eicosanoide es rápidamente convertido, no enzimáticamente, en tromboxano B₂ (TXB₂).

El paso inicial de la formación de TXA₂ en las plaquetas es la activación de la FLA₂ citoplasmática (FLA₂c); una enzima de 85 Kda que requiere concentraciones submicromolares de Ca²⁺ para su activación, lo que induce la translocación de esta enzima hacia la membrana a través de sitios de unión a lípidos dependientes de Ca²⁺. La fosforilación de la FLA₂c sobre residuos de serina, mediada por proteínas quinasas específicas produce un incremento en la actividad enzimática (112, 215-219).

4.- Síndrome Antifosfolípido

4.1.- Introducción al Síndrome Antifosfolípido

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune sistémica, que se caracteriza por la presencia conjunta de trombosis vascular o complicaciones obstétricas (pérdida fetal o abortos espontáneos a repetición) y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFLs) en el plasma de los pacientes (64-68).

En ausencia de otra enfermedad autoinmune como es el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) o la Artritis Reumatoidea (AR), el síndrome se denomina *síndrome antifosfolípido primario* y es dos veces más frecuente en mujeres que en varones. Cuando el SAF se presenta en coexistencia con LES, se denomina *síndrome antifosfolípido asociado a LES*, pues se desconoce hasta el momento si SAF y LES son dos enfermedades que coinciden en un individuo; si el LES ofrece soporte para el desarrollo de SAF o bien si SAF y LES son dos elementos de un mismo proceso, lo cierto es que cerca de un 30% de los pacientes con LES desarrollan también SAF. En este grupo de pacientes, la relación mujer: varón para el desarrollo de SAF es de 9:1, la cual es la misma que en el LES.

El origen de los anticuerpos patogénicos que causan SAF es desconocido, pero existen dos teorías que explican el origen de anticuerpos dirigidos contra una proteína denominada β_2 glicoproteína I (β_2 GPI):

1) Por un lado se sostiene que los anticuerpos son originados por la continua exposición de neo-epitopes en la β_2 GPI, producto de cambios conformacionales en la molécula cuando se une a fosfolípidos aniónicos, por ejemplo de células apoptóticas o células muertas, en el contexto de enfermedades inflamatorias, como es el LES o enfermedades infecciosas crónicas (69, 70).

2) La otra teoría esta basada en el desarrollo de anticuerpos contra péptidos virales o bacterianas, en el transcurso de enfermedades infecciosas, que mimetizan a epitopes en la β_2 GPI (71, 72).

El diagnostico del SAF, presenta grandes dificultades hasta el momento, y esto es debido a varios factores, entre ellos la presencia de aFLs en individuos aparentemente sanos sin manifestaciones clínicas, la presencia esporádica de aFLs asociada a infecciones sin manifestaciones trombóticas, la presencia persistente de aFLs asociadas a algunos tipos de infecciones como la hepatitis C y el HIV sin manifestaciones trombóticas,

y la falla en la reproducibilidad de los ensayos que detectan aFLs, lo que ha llevado al replanteo de los criterios clínicos y de laboratorio para definir la enfermedad (73, 74).

Los primeros criterios de clasificación para definir el SAF, fueron propuestos por Harris en 1987 (75). En aquella clasificación, se enfatizó la coexistencia de manifestaciones clínicas, trombosis venosa o arterial, trombocitopenia o complicaciones obstétricas conjunto con hallazgos de laboratorio como la presencia de anticoagulante lúpico (AL) y anticuerpos anticardiolipinas (aCLs). En el año 1999 durante la conferencia realizada en Sapporo, Japón, el panel de expertos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) estableció el primer consenso internacional para el diagnóstico de SAF, donde se modificaron los criterios que definían a las complicaciones obstétricas y los criterios de laboratorio (67). Estos criterios de clasificación fueron nuevamente revisados y modificados durante la conferencia de la ISTH en Sydney, Australia, en el año 2006, con el fin de aumentar la especificidad en el diagnóstico de SAF, y son los que actualmente permanecen en vigencia (68).

En ellos se establece que la enfermedad SAF está presente si se encuentran al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio en forma conjunta, de la siguiente manera:

1) Criterios Clínicos:

Trombosis vascular: Uno o más episodios de trombosis arterial, venosa o trombosis de pequeños vasos, en cualquier tejido u órgano (confirmados por estudios de imágenes o histopatología).

Complicaciones Obstétricas: Una o más muertes fetales inexplicables de un feto normal morfológicamente con 10 o más semanas de gestación, o uno o más nacimientos prematuros de un neonato morfológicamente normal antes de las 34 semanas de gestación, debido a eclampsia, severa preeclampsia o insuficiencia placentaria, o por la ocurrencia consecutiva de 3 o más abortos inexplicables antes de las 10 semanas de gestación y descartadas las causas anatómicas, endocrinas, infecciosas o genéticas.

2) Criterios de Laboratorio:

1. Anticoagulante Lúpico (LA) presente en el plasma en dos o más ocasiones, determinados con un intervalo de al menos 12 semanas y no más de cinco años entre una y otra determinación; detectado según las recomendaciones del Comité de Expertos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia.

2. Anticuerpos anticardiolipinas (aCLs) de isotipo IgG e IgM presentes en el suero o plasma en títulos mayores de 40 GPL o MPL o > al percentilo 99, en dos o más ocasiones separadas por no menos de 12 semanas y determinados por ensayos de ELISA estandarizados.

3. Anticuerpos anti β_2 -glicoproteína I (anti- β_2 GPI) de isotipo IgG e IgM presentes en el suero o plasma en títulos mayores al percentilo 99, en 2 o más ocasiones separadas por no menos de 12 semanas y determinados por ensayos de ELISA estandarizados.

Según estas nuevas recomendaciones, el diagnóstico de SAF no se puede realizar si el hallazgo de dos resultados positivos para aFLs es mayor de 5 años entre un test y otro. Por otro lado se excluyen algunas entidades clínicas previamente consideradas, como *livedo reticularis*, trombocitopenia y algunos hallazgos de laboratorio como son la presencia de aCL de isotipo IgA o anti- β_2 GPI de isotipo IgA, además de la presencia de anticuerpos anti-fosfatidil serina, anti-fosfatidil etanolamina, anti-protrombina o anti-protrombina-serina. Se considera que la presencia de algunos de estos hallazgos de laboratorio o clínicos está altamente asociada a SAF, pero no se toman como criterio diagnóstico.

4.2.- Anticuerpos Antifosfolípidos

Los aFLs son un grupo heterogéneo de autoanticuepos, que fueron reconocidos por primera vez en el año 1952 por su habilidad de prolongar los ensayos de coagulación *in vitro* en pacientes que padecían LES, por lo que de allí deviene el nombre de anticoagulante lúpico (AL), aunque años mas tarde se reconoció que los aFLs no actuaban como anticoagulante *in vivo* (76, 77). Con la observación de que muchos pacientes con AL tenían resultados falsos positivos en el test de VDRL para sífilis, se llego al desarrollo de un ensayo para detectar anticuerpos anticardiolipinas, primero como radioinmuno ensayo y luego como ELISA (78, 79).

En 1990 tres grupos de investigadores demostraron en forma independiente que algunos anticuerpos aCLs no estaban dirigidos contra cardiolipina, sino contra la proteína plasmática β_2 GPI, la cual se une a cardiolipina (80 -82), estudios posteriores demostraron que la actividad de AL es dependiente de β_2 GPI y PT (83, 84). En vista de estos hallazgos, el nombre de anticuerpos antifosfolípidos con el cual se denominó a los anticuerpos del SAF que parecían tener afinidad por los fosfolípidos aniónicos, resultó ser incorrecto debido a que en realidad se unen a proteínas con afinidad por fosfolípidos aniónicos como son la cardiolipina (CL) o la fosfatidilserina (FS).

En la actualidad se reconocen dos tipos diferentes de aFLs, los anticuerpos autoinmunes asociados a SAF, que requieren proteínas que se unan a fosfolípidos negativos para que sean reconocidos en ensayos de ELISA con fosfolípidos, y aquellos aFLs alloinmunes que aparecen asociados a enfermedades infecciosas y que no requieren proteínas para unirse a fosfolípidos (88).

Las proteínas blanco antigénicos más importantes y más estudiadas a las cuales están dirigidas los aFLs en el SAF son la β_2 GPI y la PT (85-87). Se han descrito más de 20 proteínas diferentes como blancos antigénicos de los aFL asociados a SAF (88-91), de las cuales las más relevantes son descritas en la tabla 3.

Tabla3. Proteínas contra las cuales están dirigidos los aFLs.

| Proteínas blanco antigénicos de los aFLs |
|---|
| β_2 glicoproteína I (β_2 GPI) |
| protrombina (PT) |
| Proteína C (PC) |
| Proteína S (PS) |
| Receptor endotelial de la proteína C (EPCR) |
| Inhibidor del camino del factor tisular (TFPI) |
| Trombomodulina (TM) |
| Anexina V |
| Anexina 2 |
| Plasmina |
| Activador tisular del Plasminógeno (t-PA) |
| Inhibidor del activador del plaminógeno tipo -1 (PAI-1) |
| Quininógenos de alto y bajo peso molecular |
| Factor VII/VIIa |
| Componente del complemento H y C4b |
| Lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL ox) |

La población de anticuerpos anti- β_2 GPI es heterogénea, la mayoría de ellos son responsables de la actividad aCL que se observa en los ensayos de ELISA que contienen CL o en los ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos como AL.

Sin embargo en algunos pacientes con SAF se encuentran anti- β_2 GPI que no presentan actividad antifosfolípidos en los ensayos de aCL y AL. Existen dos teorías que intentan explicar esto; una teoría se basa en la especificidad de especie (especialmente para el isotipo IgM), y la otra en que el epitope reconocido por los anticuerpos no está expresado cuando la β_2 GPI está unida a los fosfolípidos (88).

4.3.- Mecanismos trombogénicos de los aFLs

Debido a que la actividad AL es la que se encuentra más fuertemente asociada a trombosis es que las primeras hipótesis del mecanismo trombogénico de los aFLs se basaron en la interferencia que producen estos anticuerpos entre la unión de proteínas plasmáticas anticoagulantes y la superficie de fosfatidilserina. Fundamentalmente en el sistema de la PCa, la cual desempeña su función como anticoagulante, mediante la unión e inactivación de los factores procoagulantes Va y VIIIa (como se explica en la pag. 12); la teoría actualmente aceptada es que los complejos de anti- β_2 GPI y β_2 GPI (anti- β_2 GPI / β_2 GPI) compiten con el complejo PCa por los limitados sitios de unión a fosfatidilserina o bien que estos complejos interfieren en la formación del complejo PCa (88, 92). Debido a que las alteraciones del sistema PCa producen trombosis principalmente en el lecho vascular venoso pero no en el arterial (93), se dirigió la atención a la activación celular principalmente de células endoteliales, monocitos y plaquetas; con la intención de explicar todas las características clínicas asociadas a SAF.

4.4.- Evidencia de la activación de plaquetas mediada por los aFLs

Las plaquetas cumplen un rol central en la hemostasia primaria y también juegan un papel fundamental en el desarrollo de la trombosis arterial, una manifestación clínica que se observa en un gran porcentaje de los pacientes con SAF.

Varios factores indican que las plaquetas son uno de los blancos de los aFLs circulantes: Varios estudios reportaron una fuerte correlación entre la trombocitopenia y la presencia de aCL (94, 95). En los primeros estudios sobre plaquetas y aFLs, Khamashta y *col.* (96) demostraron que los anticuerpos aCLs de pacientes con SAF se unieron a fosfolípidos aniónicos en la membrana de plaquetas, cuando estas fueron previamente congeladas y descongeladas. También Haga y *col.* (97), usando citometría de flujo, encontraron que aCLs de clase IgG se unieron a plaquetas fragmentadas por congelación-descongelación pero no a plaquetas intactas en reposo o activadas. Sin embargo en un estudio realizado por Hasselaar y *col.* (98) observaron que los aFLs se unen a plaquetas

en reposo (separadas por filtración en gel) y esta unión no aumentó al activar las plaquetas con una mezcla de trombina y colágeno. Shechter y *col.* (99) demostraron la presencia de aFLs unidos a la membrana de plaquetas de pacientes con SAF que tenían trombocitopenia y reportaron un importante descenso en la concentración de serotonina de las plaquetas de estos pacientes, comparadas con plaquetas de pacientes sanos. Jan Out y *col.* (100) eluyeron aFLs de las plaquetas de 7/11 pacientes (64%) con LES lo que podría indicar que estos anticuerpos se unen a plaquetas en circulación. Reverter y *col.* (101) utilizando un método de perfusión en cámara, recubierta con colágeno, observaron un aumento importante de la adhesión plaquetaria y la formación de trombos en sangre anticoagulada incubada con plasma de pacientes con SAF primario comparada con sangre incubada con plasma de dadores sanos. Mediante citometría de flujo determinaron que las IgGs aFLs purificadas de estos pacientes, se unieron a plaquetas previamente activadas con colágeno pero no a plaquetas en reposo. Estudios de la Dra Pierangeli y *col.* demostraron que los anticuerpos anticardiolipina provenientes de pacientes con SAF, pero no los obtenidos de pacientes con sífilis, aumentaron la activación de plaquetas tratadas con dosis subóptimas de ADP, trombina o colágeno (102). En otros estudios, se demostró que anticuerpos aCL obtenidos en conejos, produjeron un aumento de la activación plaquetaria inducida por colágeno (103, 104).

Galli y *col.* (105) observaron que en presencia de β_2 GPI y PT, los aCL y AL interactúan con plaquetas activadas y con microvesículas derivadas de plaquetas en forma similar a lo observado en la interacción con fosfolípidos en fase sólida. Otros investigadores demostraron que la fracción purificada de anticoagulante lúpico AL (sin actividad aCL) reacciona con protrombina unida a lípidos de plaquetas mientras que las fracciones purificadas aCL y aFS se unen a la membrana de plaquetas activadas, mediante la β_2 GPI (106, 107).

Arvieux y *col.* (117) demostraron agregación y liberación plaquetaria utilizando anticuerpos monoclonales de ratón anti- β_2 GPI y dosis subagregatorias de diferentes agonistas, y propusieron que tanto la porción Fab como la porción Fc de estos anticuerpos fueron responsables de la activación.

Otros investigadores propusieron que la activación plaquetaria en los pacientes con SAF es mediada únicamente por la interacción de complejos aFLs y β_2 GPI con el receptor Fc γ RII (108), pero estos resultados no pudieron ser corroborados por otros estudios. En otras publicaciones se demostró *in vitro* que la activación plaquetaria mediada por los aFLs se logra a pesar de inhibir el receptor Fc γ RII o al utilizar fragmentos F(ab')₂ de los aFLs (109, 110).

La activación plaquetaria juega un rol fundamental en el mantenimiento de la hemostasia y en los desordenes tromboembólicos. Una de las sustancias proagregantes más potente es el TXA₂ sintetizado por las mismas plaquetas. Es así que, el ácido acetil-salicílico, el cual bloquea la formación plaquetaria de TXA₂. Es la droga de elección en la prevención de los accidentes cerebrovasculares, del infarto de miocardio y también se usa en bajas dosis en pacientes con aFLs que no han presentado trombosis (110).

La producción de TXA₂ parece jugar un rol fundamental en la activación plaquetaria mediada por los aFLs. Es así que, Lellouche y *col.* (111) reportaron un aumento significativo de la excreción urinaria del mayor metabolito proveniente del TXA₂ (11-dehidro-tromboxanoB₂) en pacientes con anticoagulante lúpico (AL) comparado con individuos sanos, lo que indicaría la activación de las plaquetas circulantes. Martinuzzo y *col.* (112) demostraron un incremento del metabolito derivado del tromboxano plaquetario (11-dehidro TXB₂) y una reducción en el metabolito derivado de la prostaglandina I₂ vascular (2,3 dinor-6-ceto-prostaglandina F_{1α}) en la orina de pacientes con LA y aFLs comparado con individuos sanos. Los aFLs purificados de estos pacientes aumentaron la agregación, la liberación de serotonina y la producción de TXB₂ de plaquetas aisladas de individuos sanos y tratadas con dosis subagregatorias de trombina.

Robbins y *col.* (113) demostraron que complejos formados por anticuerpos aFLs y β₂GPI (aFLs/β₂GPI) aumentaron la producción plaquetaria de TXA₂ *in vitro*. En un estudio reciente publicado por el grupo de la Dra Pierangeli (114), se demostró que las plaquetas incubadas con aFLs y dosis subóptimas del péptido agonista del receptor plaquetario de trombina (TRAP), aumentaron considerablemente los niveles de expresión de la glicoproteína α_{IIb}β₃ (GP1Ib/IIIa), indicando activación plaquetaria. Esta activación se revirtió al incubar las plaquetas con hidroxiclороquina (una droga utilizada en el tratamiento de la malaria), la cual inhibe la liberación de ácido araquidónico y la formación de tromboxano en las plaquetas (115, 116). Opara y *col.* (118) demostraron que el incremento de TXB₂ plaquetario mediado por complejos aFLs/β₂GPI puede ser inhibido por agonistas del cAMP, el cual suprime el incremento de calcio y la fosforilación de Proteínas kinasas específicas. En un estudio reciente se propuso que los complejos aFLs/β₂GPI, mediante la unión a fosfolípidos y al receptor 2 de la apolipoproteína E, producen el aumento de la activación plaquetaria mediada por el colágeno; y este aumento de la activación puede ser revertida inhibiendo la producción de tromboxano o bloqueando el receptor plaquetario de tromboxano (109).

De los reportes anteriores se deduce que los aFLs deben unirse a proteínas blancas sobre fosfolípidos expuestos en plaquetas previamente activadas o envejecidas, y

mediante un receptor específico podrían llevar a la activación de plaquetas en circulación o a la destrucción de estas en el sistema retículo endotelial. También se deduce que los aFL incrementan la producción de TXB2 en plaquetas previamente activadas y este mecanismo puede ser revertido por agonistas del cAMP, el cual inhibe la fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógenos y el incremento del calcio intracelular.

4.5.-Hipótesis de la activación plaquetaria mediada por aFLs vía receptor específico en plaquetas

Lutters y col (109), utilizando una proteína recombinante que es un dímero β_2 GPI y que asemeja a la disposición de dímero que tendría esta proteína cuando está unida a los anticuerpos como complejo anti- β_2 GPI / β_2 GPI, observaron un incremento de la adhesión de plaquetas a superficies recubiertas con colágeno, y demostraron que este aumento de la adhesión de plaquetas a colágeno es mediada por la interacción del dímero β_2 GPI con fosfolípidos aniónicos expuestos en la membrana externa de la plaqueta y el receptor 2 de la apolipoproteína E. Además el mismo grupo comprobó que en el dominio V de la proteína β_2 GPI contiene sitios de unión a los receptores de la familia LDL (119).

Por otro lado Shi y col. (120) demostraron que complejos de anti- β_2 GPI / β_2 GPI pueden unirse y activar a las plaquetas al interaccionar directamente con la glicoproteína GPIIb α . Esto fue comprobado por Pennings MT y col. (121) Utilizando la proteína recombinante dimérica de β_2 GPI, la cual produjo sensibilización plaquetaria a expensas de la unión del dímero β_2 GPI a la glicoproteína de membrana GPIIb α . Por otro lado estudios posteriores de este mismo grupo, demostraron que los dímeros de β_2 GPI, pueden sensibilizar a las plaquetas por medio de los dos receptores descritos. En la figura 12 se esquematizan los mecanismos de activación plaquetaria mediados por los aFLs.

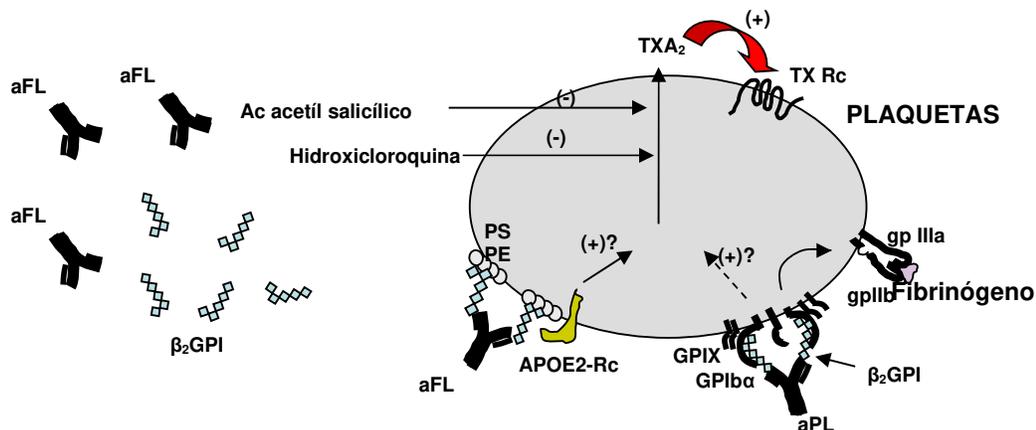


Figura 12. Activación Plaquetaria mediada por los aFLs.

4.6.- Evidencia de la activación de CE y monocitos mediada por los aFLs

Los primeros estudios que sugirieron que los aFLs alteraban la actividad de las CE tendiendo a un estado de hipercoagulación, fueron propuestos por Carreras y Vermeylen (122). En otros trabajos se demostró que los plasmas con actividad AL de pacientes con SAF provocaban un desbalance entre prostaglandinas y tromboxano, suprimiendo la producción endotelial de PGI₂ e incrementando el TXB₂ derivado de plaquetas (111, 112).

Mediante estudios *in vitro* en cultivos de CE, se reportó que éstas células expresan cantidades significativamente mayores de moléculas de adhesión: ICAM-1, VCAM-1 y E selectina cuando son incubadas con aFLs y β₂GPI (125-129). Del Papa y col concluyeron que la esta propiedad proinflamatoria de los aFLs es mediada por la actividad anti-β₂GPI de estos anticuerpos (123, 124). Al realizar estudios *in vivo*, en un modelo de trombosis en ratón, Pierangeli y col (125, 126) observaron que los aFLs monoclonales y policlonales (purificados del suero de pacientes con SAF), producen la activación de CE con el consecuente incremento en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y P-selectina, y esto se correlaciona con un aumento en la formación del trombo. Por otro lado se observó un incremento de marcadores de activación endotelial tales como micropartículas derivadas de CE y VCAM-1 soluble en el plasma de pacientes con SAF (130, 131). Estos estudios condujeron a la hipótesis de que las propiedades proinflamatorias de los aFLs inducen la perturbación de CE en los pacientes con SAF reforzando las manifestaciones trombóticas en esta enfermedad.

Los primeros hallazgos de la activación de los mediadores de transducción de señales intracelulares mediados por aFLs, fueron dirigidos por la Dra Pierangeli (129). En

estos estudios se comprobó que el incremento en la expresión de moléculas de adhesión en la membrana de CE humanas cultivadas, es mediado en parte por la activación del factor nuclear NF- κ B. Estos hallazgos fueron confirmados por otros (132-134).

El incremento de moléculas de adhesión y liberación de citoquinas también se observa en otros tipos de CE derivadas de cerebro y piel, sugiriendo que tales efectos deben ser generalizados a CE de diferentes sitios anatómicos (135).

Además de las propiedades proinflamatorias mediada por los aFLs sobre las CE, existe una gran cantidad de evidencia de que el camino del FT está directamente involucrado en la fisiopatología del SAF.

En los primeros estudios relacionados con el FT, Rustin MH y col (136) demostraron que al incubar células endoteliales humanas cultivadas con suero proveniente de pacientes con LES y con actividad AL, se produjo un incremento significativo de la actividad procoagulante de estas células. Hasselaar y col (137), demostraron que el incremento en la actividad procoagulante de CE es inducido por los anticuerpos aFLs presente en el suero de los pacientes y este efecto se aumenta al incubar las CE con aFLs y concentraciones subóptimas de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); estos hallazgos fueron confirmados por otros (143, 144).

En CE humanas cultivadas *in vitro*, se demostró que los aFLs pueden incrementar la expresión del FT en su membrana. En estudios realizados en plasma de pacientes con SAF, se detectó un aumento importante de los niveles de TF antigénico, y además se han reportado micro partículas ricas en FT en pacientes con anticuerpos aFLs (138-142).

En forma similar a la teoría de que los aFLs provocan el incremento en la expresión de FT sobre la membrana de las CE, existe una gran cantidad de evidencia de que los monocitos de sangre periférica de los pacientes con SAF, juegan un importante rol en la fisiopatología protrombótica de la enfermedad. Los primeros reportes que originaron esta hipótesis, se remontan a 1990, donde de Pros y col (145) describieron el incremento de la actividad procoagulante en los monocitos de pacientes con LES, de los cuales más de la mitad poseían actividad de AL en el plasma. Posteriormente Kornberg y col (146) reportaron incremento de la actividad de FT en monocitos estimulados con un anticuerpo monoclonal aCL. Posteriores trabajos de investigación confirmaron que los aFLs purificados de pacientes con SAF producen el incremento de la expresión de FT en monocitos normales (147- 151). Los efectos procoagulantes observados en monocitos dependen de la fracción F (ab) de los aFLs y no de la fracción Fc (152, 153). Trabajos adicionales comprobaron que los monocitos aislados de pacientes con SAF exhiben un

aumento en la concentración de FT y RNAm de FT comparados con monocitos aislados de pacientes sanos (149-151).

Por otro lado se evidenció que tanto los anticuerpos anti- β_2 GPI purificados de pacientes con SAF, como anticuerpos monoclonales con actividad anti- β_2 GPI, derivado de linfocitos B periféricos de pacientes con SAF, aumentan la actividad de FT y el RNAm de FT en monocitos. Este incremento es dependiente de β_2 GPI, y tiene un pico máximo entre las 2 y las 6 hs desde que estas células son estimuladas con los anticuerpos. La actividad no depende de la des-criptación de FT existente en la membrana sino en la producción de una nueva proteína (154, 155). En la figura 13 se observan los mecanismos de activación de CE mediado por los anticuerpos aFLs.

4.7.- Hipótesis de la activación celular mediada por aFLs vía receptor específico

La activación de las CE y monocitos mediada por los aFLs debe involucrar la activación de uno o más receptores en la membrana de dichas células y generar señales intracelulares que trasladen la información del medio ambiente celular al núcleo. Al menos dos tipos de receptores han sido involucrados en la activación celular mediada por los aFLs, estas proteínas son la Anexina II y el receptor toll like 4 (un receptor de lipopolisacarido bacteriano) como se representa en la figura 13 (156-159). Las evidencias halladas hasta el momento se inclinan hacia la activación de este último receptor, debido a que:

a) La anexina II es una proteína integral de membrana que sirve como receptor del tPA y del Plasminógeno (33). Este receptor no atraviesa la membrana celular lo que dificulta la transducción de señales intracelulares.

b) Raschi E. (158) reveló que la activación de las CE debe ser mediada por la interacción de los anti- β_2 GPI con el receptor TLR-4 (porque los anti- β_2 GPI producen la activación de señales intracelulares que involucran al factor de diferenciación mieloide 88 (MyD 88). Estudios *in vivo* realizados por Pierangeli y col (159) comprobaron la disminución en la cinética de formación de trombo y en la inflamación del endotelio en ratones genéticamente modificados deficientes en el TLR-4 comparados con ratones control no deficientes en este receptor. Estos datos fueron corroborados por otros investigadores (160).

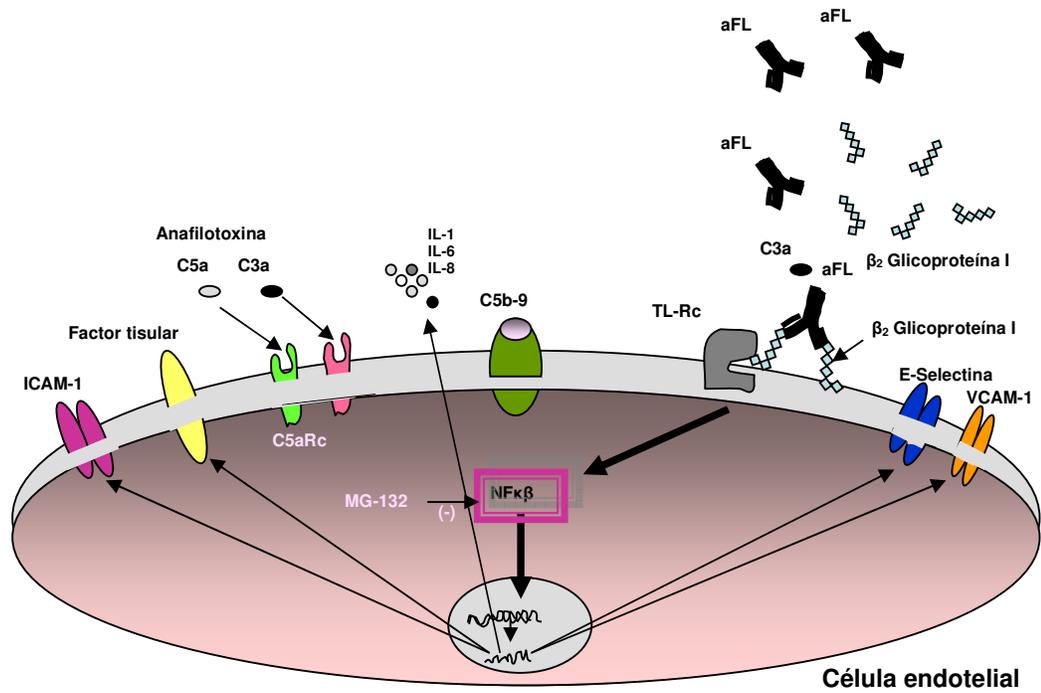


Figura 13. Mecanismo fisiopatogénico de los aFLs sobre la CE.

C5a y C3a: fragmentos de componentes del complemento 5 y 3 activados (anafilotoxinas).

IL: interleuquina, C5b-9: complejo de ataque a membrana del complemento. ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1. TL-Rc: receptor toll like.

5.- Transducción de señales y control de la expresión de los genes

5.1.-Introducción

Las células reciben señales del medio extracelular a través de receptores ubicados en la membrana plasmática, y esas señales pueden llegar al núcleo celular y provocar la transcripción de genes específicos, gracias a dos grandes vías (Fig. 14). En primer lugar, se conocen a nivel intracelular, diferentes cascadas de fosforilación proteica, que se propagan por si mismas hasta fosforilar a factores de transcripción que residen en el núcleo. En segundo lugar, se conocen un determinado número de factores de transcripción que se encuentran latentes en el citoplasma en forma inactiva y que son activados luego de que un receptor en la superficie celular interacciona con su ligando, estos factores de transcripción una vez activados se acumulan en el núcleo y dirigen la transcripción de genes.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), pertenecen a una gran familia de serina/treonina quinasas, y constituyen la mayor cascada de transducción de señales inflamatorias desde la superficie celular hacia el núcleo (161). Otras cascadas de quinasas incluyen aquellas que son activadas luego del incremento de segundos mensajeros (incluyendo AMPc y Ca^{2+}) o por la interacción de ligandos con receptores celulares asociados a proteínas G y receptores tirosina quinasa (162). Usualmente tales caminos de transducción de señales producen la fosforilación y subsiguiente activación de factores de transcripción, terminando en la transcripción de genes.

Hasta el momento reconocemos ocho caminos principales en la transducción de señales que activan factores de transcripción que se encuentran latentes en el citoplasma. Los dos caminos que son directamente activados en los receptores de la superficie celular son: a) la familia de las moléculas SMAD que están involucrados en la transducción de señales de la superfamilia de ligandos del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), y b) la familia STAT (transducción de señales y activadores de transcripción) la cual son activadas por mas de 20 citoquinas compartiendo los receptores asociados a quinasas Janus (JAK) que fosforilan los receptores sobre residuos de tirosina para iniciar la transducción de señales (163,164).

Otros cuatro grupos importantes involucrados en la activación de factores citoplasmáticos latentes requieren fosforilación citoplasmática de serina y/o proteólisis.

Esto incluye la familia del factor nuclear Rel kB (NF-kB), la cual es activada por una gran variedad de estímulos tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-1 y productos virales y bacterianos (165).

Finalmente las fluctuaciones de segundos mensajeros (Ca^{2+} y concentraciones de fosfoinosítidos) pueden activar factores de transcripción latentes en el citoplasma tales como factor nuclear en células T activadas (NFAT) y tubby, un producto de un gen asociada a obesidad.

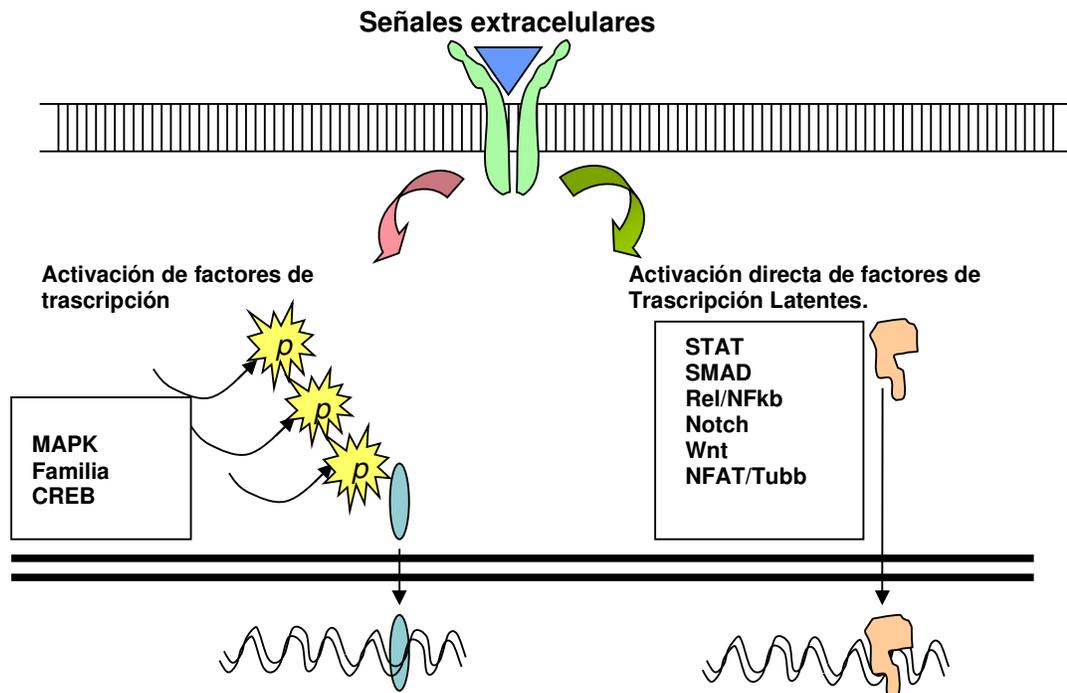


Figura 14. Diferentes caminos de señales extracelulares que terminan en la transcripción de genes. Izquierda: cascada de fosforilación intracelular que activan factores de transcripción nuclear. Derecha: Factores de transcripción latentes en el citoplasma son activados sobre la interacción ligando-receptor.

5.2.- Proteínas Quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

Las células responden a cambios en las propiedades físicas y químicas del medio ambiente que las rodea, alterando muchas de las funciones celulares, tales como supervivencia, potencial y velocidad de crecimiento, interacción con otras células y numerosos procesos celulares involucrados en la homeostasis y salud del organismo. Esos cambios del medio ambiente celular incluyen alteraciones en la

concentración de nutrientes, factores de crecimiento, citoquinas y agentes que dañan la célula, pero también estímulos físicos, como por ejemplo, cambios en la osmolaridad del medio e incidencia de luz ultravioleta.

La respuesta celular a estos estímulos extracelulares es mediada, en parte, por un determinado número de enzimas quinasas y fosfatasas (166). Las MAPKs son miembros de una discreta cascada de señales intracelulares, las cuales son puntos focales para diversos estímulos extracelulares y funcionan regulando procesos celulares fundamentales. Se describieron cuatro subgrupos distintos dentro de la familia de las MAPK. Estas incluyen:

1. Quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs).
2. Proteínas quinasas activadas por estrés o c-jun N-terminal quinasas (JNK/ SAPK).
3. ERK5/big MAP quinasa 1 (BMK1).
4. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (p38 MAPKs).

La activación de ERK ha sido caracterizada como un componente central del camino de transducción de señales, estimuladas por señales relacionadas con el crecimiento (167,168).

El grupo JNK de proteínas quinasas son activadas en respuesta a un determinado número de factores que producen estrés celular, incluyendo la gran osmolaridad y la oxidación (169). La ERK5/BMK1 MAP regula el camino de transducción de señales de la expresión temprana de genes inducida por el suero (170). El grupo de las proteínas p38 MAPK están relacionadas con la inflamación, crecimiento celular, diferenciación celular, ciclo y muerte celular (171).

Para que se produzca la activación de las MAPK estas deben ser fosforiladas en dos residuos aminoacídicos de treonina y tirosina y esto requiere de la presencia de una quinasa dual específica la cual son conocidas como MAP/ERK quinasas (MEKs) o MAP quinasas quinasas (MAPKK). La especificidad de las MAPKK por las MAPK es dependiente del contexto: todas las enzimas MAPKK, producen la doble fosforilación sobre la siguiente secuencia aminoacídica: Treonina-Xaa-Tirosina, pero el aminoácido X es el que confiere la especificidad, así es que X es ácido glutámico en ERK, prolina en JNK, y glicina en p38 MAPK quinasa. Las MAPK quinasa ERKs son activadas por MKK1 y MKK2, las JNK por MKK4 y MKK7, y la p38 MAPK por MKK3, MKK4 y MKKK6. Las fosfatasas de la MAPK revierten la fosforilación y retornan las MAPK a su estado inactivo.

La actividad de las MEK quininas es controlada mediante fosforilación, una vez fosforilada MEK se torna enzimaticamene activa. Esta fosforilación es mediada por otras quininas denominadas MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK, MKKK, MEKK), una familia de proteínas de la cual el protooncogen c-Raf es el miembro mas prominente. En la Figura 15 se representa el camino de transduccion de señales de las MAPKs.

De la activación de las MAPKs, surge la fosforilación y activación de factores de transcripción presentes en el núcleo o en el citoplasma, produciendo la expresión de ciertos genes blancos que resultan en una respuesta biológica.

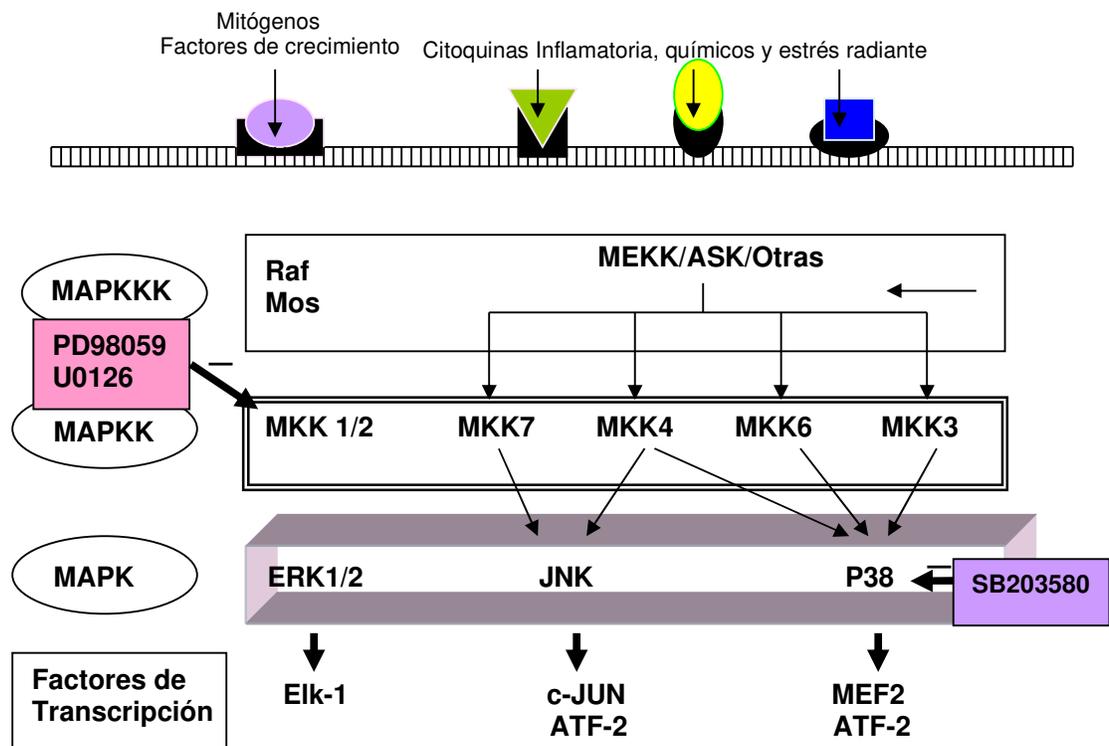


Figura 15. Cascada de transducción de señales de las MAPK y inhibidores de MAPKs más frecuentemente utilizados.

5.3.- Identificación de las p38-MAPK

Entre los años 1993 y 1994 se descubrió una nueva proteína con un peso de 38 Kda que era rápidamente fosforilada en residuos de tirosina en macrófagos estimulados con endotoxina, a la que se denominó p38 α o simplemente p38.

Utilizando técnicas de clonado molecular, se llegó a la conclusión de que esta proteína pertenecía a la familia de las MAPKs (172). Paralelamente a esto, otro grupo de investigadores descubrió que la p38 MAPK compartía una gran homología con una enzima conocida como HOG1, la cual cumple la función de sensor osmótico en la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*; ambas pertenecen a la familia de las MAPKs y además son fosforiladas en residuos de tirosina luego de cambios extracelulares en la osmolaridad, por lo que se piensa que estas proteínas tienen un mismo gen ancestral (173, 174). La p38 fué identificada como una quinasa que se encuentra corriente arriba de M2K en células estimuladas con arsénico o con IL-1 (175, 176). Esta proteína fué clonada y purificada como una molécula que tiene la propiedad de unir derivados de compuestos piridinil imadazol, los cuales, a su vez, son inhibidores de la producción de citoquinas proinflamatorias (177).

En la actualidad se conocen cuatro isoformas de p38MAPK en mamíferos, y comparten entre ellas una homología de aproximadamente el 60%. Hay dos isoformas denominadas p38 α y p38 β que se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tipos de tejidos (178, 179), la isoforma p38 γ se expresa predominantemente en músculo esquelético y la forma p38 δ en pulmones, riñones, testículos, páncreas e intestino delgado (180-182).

De acuerdo a la similitud en la estructura primaria proteica y a la diferente susceptibilidad a inhibidores específicos, las isoformas de p38 se pueden organizar en dos grupos:

- a) La p38 α y la p38 β comparten una homología del 75% en la secuencia aminoacídica. En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se demostró que la p38 α y la p38 β son inhibidas a bajas concentraciones por los compuestos SB203580 y SB202190.
- b) La p38 γ y la p38 δ solo tienen un 61% de homología con la p38 α , pero alrededor de un 70% de homología entre ellas. Las isoformas γ y δ no son afectadas por los inhibidores SB203580 y SB202190 (183-185).

La base molecular de la diferencia inhibitoria que produce SB203580 entre las isoformas de p38 radica en un cambio aminoacídico. Las isoformas α y β poseen un aminoácido treonina en la posición 106 en el bolsillo de unión al ATP, que interacciona con un átomo de fluoruro del inhibidor, mientras que en las isoformas γ y δ , en la posición 106 existe un aminoácido metionina (186,187).

Otra diferencia entre los dos subgrupos de p38MAPK radica en la diferente especificidad del sustrato de las quinasas. Por ejemplo mientras que las isoformas γ y

δ fosforilan eficientemente a la proteína Tau asociada a los microtubulos, no ocurre lo mismo con las isoformas p38α y β (188, 189).

5.4.- Regulación del camino de transducción de señales de las p38 MAPK

Para comprender los caminos de transducción de señales durante la inflamación, la p38 ha sido objeto de numerosos estudios (178). Se halló una gran cantidad de información respecto de la regulación de la p38 en el sistema inmune. Se observó la activación de p38 en respuestas inflamatorias, como por ejemplo en macrófagos tratados con LPS (174), células endoteliales estimuladas con TNF (190), condrocitos estimulados con IL-17 (191), línea de células mococíticas U1 estimuladas con IL-18 (192), plaquetas humanas estimuladas con trombina (193), y neutrófilos humanos tratados con el péptido quimiotáctico, N-formil metionin-leucin-fenilalanina (fMLP) o con Acetato forbol miristato (PMA) (194, 195).

El camino de transducción de señales de la p38 es asociado con la inflamación, el crecimiento celular, la diferenciación celular, y la muerte celular. En la mayoría de las células inflamatorias, la p38α es la isoforma que mayormente se activa.

Los estímulos extracelulares de las p38 incluyen una variedad de citoquinas (IL-1, IL-2, IL-7, IL-17, IL-18, TGF-β y TGF-α) y un número de patógenos que activan la p38 a través de diferentes receptores Toll, incluyendo, como se nombro anteriormente el LPS, el peptidoglicano Estafilococcica, la enterotoxina B estafilococcica y los virus ecovirus 1 y Herpes Simplex 1 (178). Inclusive factores de crecimiento (factor estimulante de colonia granulocítica-macrofágica, factor estimulante de colonia 1, eritropoyetina (196) son capaces de estimular p38 como también factores ambientales como el calor, osmolaridad, ultravioleta, radicales oxígeno, y estados de hipoxia.

Como se comentó anteriormente la activación de p38 ocurre mediante la doble fosforilación de residuos Treonina 180-Glicina-Tirosina 182, en el sitio de activación, y esta fosforilación es mediada principalmente por dos quinasas denominadas MKK3 y MKK6 (197, 198). Luego de esta doble fosforilación se produce un cambio global en la proteína p38 que altera la alineación de dos sitios quinasas ubicados en los extremos N terminal y C terminal, lo que lleva a un incremento en la actividad enzimática de esta quinasas (199, 200)

Las MKK3 y MKK6 son muy selectivas en la activación de p38MAPK y no activan JNK o ERK 1/2 (201-204). En respuesta a la mayoría de los estímulos las MKK3 y MKK6 son las quinasas que activan a p38 α , sin embargo bajo ciertas circunstancias, como por ejemplo, radiación ultravioleta, MKK4, una quinasa que activa a JNK, puede activar a p38 α (205).

Las MKK3 y MKK6 a su vez, son activadas por una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK). Las MKKK parecen ser célula y estímulo específicos. Hay varias MAPKKKs implicadas en la regulación del camino de transducción de señales de la p38MAPK, como por ejemplo: MLKs, ASK1TAK1 y algunos miembros de la familia MEKK. Un amplio grupo de proteínas, actúa activando MKK quinasas, activan el camino de transducción MKK/p38, lo cual explica por que esta cascada puede ser activada por una gran variedad de estímulos.

La desactivación de la p38 MAPK quinasa fosforilada es mediada por fosfatasa que también son capaces de desfosforilar a otras MAP quinasas como ERK y JNK.

Los blancos de activación de la p38 son también otras quinasas o factores de transcripción tales como ATF-2 y MEF2. ATF-2 puede formar heterodímeros con factores de transcripción jun y así asociarse con AP-1. La p38 ha sido asociada también con la activación de NF κ B, ya que un inhibidor de p38 MAP (SB203580) se demostró que atenúa la transcripción dependiente de NF κ B (206,207). MAPKAP quinasa 2 (MK2) es una de las muchas quinasas que son reguladas mediante fosforilación directa de p38, de manera que estudios realizados en ratón demostraron que ratones que pierden el gen de MK2 aumentan la resistencia al estrés y la supervivencia al shock endotóxico inducido por LPS dada la reducción de un 90% en la producción de TNF- α , siendo esto un efecto post transcripcional ya que la producción de RNA mensajero de TNF- α no se redujo y tampoco fué afectada la secreción de TNF- α .

5.5- Respuestas biológicas de la activación de P38MAPK Rol de p38 en la inflamación

La activación de la cascada de la p38 tiene como consecuencias diferentes manifestaciones biológicas, tales como: Inflamación, apoptosis, ciclo celular, diferenciación celular, etc, entre las más importantes.

Las evidencias que demuestran la importancia de p38 α en la inflamación, provienen de diferentes fuentes:

1. Juega un rol fundamental en la regulación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y FNT- α (208).
2. Induce enzimas tales como COX-2, la cual controla la remodelación del tejido conectivo en condiciones patológicas (209).
3. Controla La expresión de la enzima iNOS que juega un rol central en la vasodilatación a través de la regulación de NO (210, 211); en el endotelio inflamado la vasodilatación inducida por NO produce el incremento del flujo sanguíneo dentro del tejido inflamado y facilita el tráfico de leucocitos a ese sitio.
4. Regula la expresión de moléculas de adhesión, tales como VCAM-1 y E-selectina en las CE, lo cual regula el rodamiento y la adhesión de leucocitos sobre el endotelio antes de trasmigrar al tejido inflamado. (212, 213).
5. Induce a expresión de moléculas involucradas en la quimioatracción como es MCP-1 (214).

Además de todo lo anterior el camino de transducción de señales de la p38 juega un rol en la regulación de la proliferación y diferenciación de células del sistema inmune. La p38 participa en la proliferación celular y/o diferenciación inducida por factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias (CSF), eritropoyetina (EPO), y el cluster de diferenciación 40 (CD-40) (190, 215). El rol de la p38 en enfermedades relacionadas con la inflamación ha sido estudiado en varios modelos de animales. La inhibición de p38 por SB203580 puede reducir la mortalidad en un modelo de ratón de shock inducido por endotoxina e inhibe tanto el desarrollo de artritis inducida por colágeno en ratones como la artritis en ratas cuando son estimuladas con adyuvantes (216).

5.6.- Rol de P38 y ERK quinasas en las plaquetas

Las plaquetas humanas contiene al menos tres miembros de la familia MAPKs: ERKs (ERK1/2), p38 y JNK (217-219).

La p38 y ERKs son activadas por diferentes agonistas tales como trombina, colágeno, FvW y ADP (225, 226). Además de la activación mediada por los agonistas, la p38 también es activada por el estrés celular, como por ejemplo: el calor, el shock osmótico, el arsenito y el peróxido de hidrógeno y por lipoproteínas de baja densidad (220-222). Cuando las plaquetas son tratadas con agonistas se observa una marcada activación de ERK2 respecto a ERK1 y esto es muy probablemente debido a que

existe una muy escasa cantidad de la quinasa ERK1 comparada con ERK2 (223, 224).

En las plaquetas se observa dos fases temporalmente diferentes de activación de p38 y ERKs mediada por diferentes mecanismos que son importantes en distintos aspectos de la función plaquetaria (225).

La activación plaquetaria con bajas dosis de agonistas produce una activación temprana y transitoria de p38 y ERK (226), y esto se observa como un máximo de fosforilación de estas MAPKs dentro de los minutos de estimulación, y luego esta fosforilación disminuye muy probablemente como consecuencia de una regulación negativa ejercida por la integrina GPIIb/IIIa a medida que ésta se une con el fibrinógeno (227-229).

Por otro lado hay una activación tardía de p38 y ERKs que es mediada por integrinas (225).

Hasta el momento se dispone de una información limitada respecto de la función fisiológica que cumplen las MAPKs en las plaquetas, como también respecto del camino de transducción de señales en las que están implicadas.

En términos generales podemos decir que ERK2 y p38 están involucradas en diferentes fases de la activación plaquetaria:

- 1.** En las plaquetas estimuladas por trombina, colágeno o FvW se produce una rápida activación de p38. Luego esta quinasa fosforila a la PLA₂C en un residuo serina 505, lo cual lleva al incremento de la actividad de esta enzima con el subsiguiente aumento en la liberación de ácido araquidónico y producción de TXA₂ plaquetario (230-235).
- 2.** La activación de p38 y ERK2 es importante en la secreción de granulos δ y granulos α , cuando las plaquetas son estimuladas con bajas dosis de agonistas como trombina y colágeno, como se demostró en estudios de agregación plaquetaria y liberación de granulos, utilizando inhibidores de p38 (SB203580) y de ERK (UO126) (225).
- 3.** La activación de p38 y ERK2 es importante en la adhesión plaquetaria mediada por FvW y/o colágeno a alto flujo sanguíneo. La unión de FvW a la GPIIb/IX produce la secuencial activación de p38 y ERK2 vía el camino de transducción de señales PI3K-Akt-GMPc la cual es importante para la activación de integrinas dependientes de GPIIb/IX (225, 236).
- 4.** Además de la activación temprana mediada por agonistas antes descrito, existe una activación tardía de p38 y ERKs que es importante en la

retracción del coagulo, esta activación es mediada por integrinas y lleva a la fosforilación de MLC (225).

5. Existe muy poca información sobre el rol de p38 en trombosis *in vivo*. En un modelo de trombosis arterial inducida por FeCl_3 , en ratones genéticamente modificados, heterocigotos para la deficiencia del gen de p38 α , se demostró que p38 esta involucrada en la formación del trombo mediante regulación de la activación plaquetaria y la actividad del factor tisular (226, 237).

6. Se ha determinado que ERK1/ERK2 no son responsables de la fosforilación de la PLA_2c en las plaquetas y que la inhibición de la cascada ERK quinasa no afecta a la liberación o la agregación plaquetaria inducida por agonista (224), mientras que la activación de ERK2 se produce en condiciones donde esta impedida la unión del fibrinógeno a la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (59, 227, 228.).

7. P38 juega un rol importante en la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ inducida por los agonistas FvW y trombina (225, 226, 229)

En la figura 16 se resumen las principales vías de la activación de p38 y ERK y la interrelación entre estas dos quinasas, tambien se representan las diferentes funciones que tienen estas quinasas en las plaquetas.

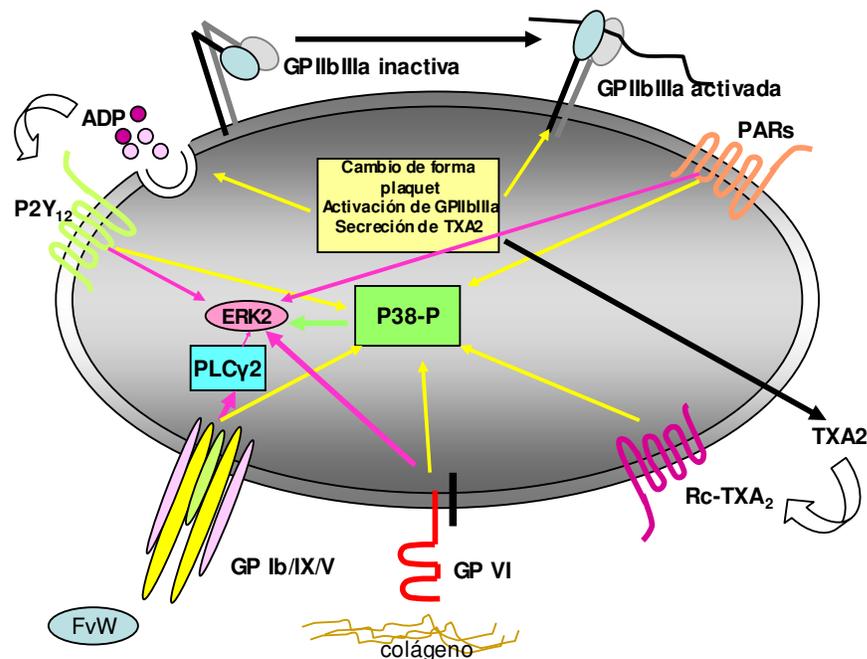


Fig 16. Activación de P38 MAPK y ERK1/2 inducida por diferentes agonistas (Trombina, ADP, TXA₂).

6.- Inhibidores de la ERK1/2 y p38MAPK

6.1.- Inhibición de ERK1/2

Existen dos compuestos químicos que fueron desarrollados como inhibidores de MEK 1/2, los cuales han sido utilizados como agentes terapéuticos contra el cáncer (238-240). Ambos inhibidores, denominados PD98059 y U0126, bloquean la fosforilación de MEK1 y la subsecuente activación de ERK1/2.

La quinasa MEK1 es un componente de la cascada clásica de MAPK, la cual es estimulada con mayor fuerza por factores de crecimiento y esteroides de forbol que promueven el desarrollo de tumor. El inhibidor PD98059 se une a MKK1 y previene su activación por quinasas que se encuentran más arriba en la cascada de traducción de señales, tales como Raf (como se observa en la figura 15), revirtiendo el fenotipo transformado de las células Ras-transformadas (238).

En estudios recientes utilizando una segunda generación del inhibidor de MEK1, denominado PD184352, se logró la inhibición de la actividad de ERK en células de carcinoma de colon, y por lo tanto se inhibió el crecimiento tumoral (241).

En modelos de injuria cerebral traumática, fue benéfico la utilización de inhibidores de MEK (241).

En un modelo *in vivo* de tolerancia a la isquemia cerebral global, la inhibición de la activación de ERK1 con PD98059, disminuye los efectos de la injuria isquémica (242) y este inhibidor disminuye la inflamación mediada por LPS de *Helicobacter pylori* en un modelo de rata (243).

6.2.- Inhibición de la p38 MAPK

La activación de p38 es necesaria para la síntesis de varias citoquinas pro-inflamatorias, por lo tanto esta proteína ha sido foco del desarrollo de varios tipos de inhibidores con diferentes grados de selectividad.

Los agentes anti-inflamatorios piridinilimidazol y pirimidinilimidazol, denominados compuestos SB (SmithKline Beecham) y ejemplificados por SB203580 y SB220025, suprimen la producción de citoquinas proinflamatorias a través de la inhibición específica de p38 α y p38 β , en varios modelos animales de inflamación y también inhiben la síntesis de IL-8 y FNT-(α) en los monocitos estimulados con LPS (244, 245).

Esos compuestos SB inhiben tanto la actividad de la p38 fosforilada como también la autofosforilación de esta enzima. El mecanismo inhibitor de los SB consiste en la competencia con el ATP por la unión al sitio de unión a nucleótido, en la proteína p38, en una relación estequiométrica de 1:1 y con una constante de disociación (Kd) en el orden de los 10 a 40 nM.

Estos inhibidores son altamente selectivos en la inhibición de p38 y no ejercen actividad inhibitoria sobre otras quinasas relacionadas, como son ERKs o JNKs (228). La concentración de la droga para producir el 50% de inhibición (IC₅₀) de la p38MAPK es de 50 nM y a una concentración de 10 μM de SB203580 produce la inhibición del 98% de la actividad de P38α y solo un 10% de cualquier otra MAP quinasa (246-249). Las características de este compuesto están resumidas en la tabla 4.

Tabla 4. Estructura y propiedades de los Inhibidores de MAPKs más utilizados.

| Blanco | Compuesto | Estructura | IC ₅₀ o Ki <i>in vivo</i> | propiedades |
|--------|--|------------|---|---|
| p38 | SB203580 C21H16N3F 4-[5-(4-Fluorofenil)-2-[4-(metilsulfonil)fenil]-1H-imidazol-4-il]piridina | | IC ₅₀ p38α=50 | Inhibidor competitivo del ATP en p38 |
| MEK1/2 | PD 98059 C16H13 2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona | | IC ₅₀ =2 | No es Inhibidor competitivo del ATP en MEK ½ Inhibe a MEK1/2 |

En la estructura del inhibidor de p38, el grupo fluoro-fenilo ubicado en posición para en el anillo del compuesto, descansa dentro de una sección del bolsillo de unión al ATP donde hace contacto con 10 residuos hidrofóbicos por medio de fuerzas de van der Waals. El aminoácido treonina (Tr) 106 juega un rol fundamental en esta interacción, provee suficiente espacio para que el anillo fluorofenilo del inhibido SB encaje en el bolsillo de unión al ATP. Los aminoácidos con cadenas más grandes que la Tr, que reemplacen a la Tr en la posición 106, tendrán una interferencia estérica con la unión de la droga; por ejemplo: la Tr 106 es reemplazada por metionina en la p38 (γ), p38 (δ) y JNK quinasa y por glutamina en la ERK1 y ERK2 quinasas, explicando porque ningún otro miembro de las MAPK diferente a p38 (α) y p38 (β) son inhibidos significativamente por estas drogas (246-249).

Materiales y Métodos

1.- Selección de Pacientes e Individuos sanos

Para llevar a cabo los estudios “*in vitro*”, tanto en plaquetas como en las CE, se seleccionaron ocho sueros de pacientes con diagnóstico de SAF según el criterio de Sapporo citado por Miyakis y col (68). La presencia de aFL fue verificada al menos en dos oportunidades separadas entre 8 a 12 semanas. El grupo estaba constituido por cinco pacientes con historia de trombosis venosa profunda (TVP); dos pacientes tenían historia de TVP y pérdida fetal recurrente y un paciente tenía historia de TVP, accidente cerebro vascular (ACV) arterial isquémico y pérdida fetal recurrente. Todos los pacientes tenían altos títulos de anticuerpos anticardiolipina (aCL) de isotipo IgG, altos títulos de anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) y anticoagulante lúpico (AL) positivo.

Como control normal se utilizó un pool de sueros de 10 individuos sanos, no relacionados, que no tuvieron historia personal o familiar de trombosis, ni de enfermedades autoinmunitarias y negativo para los test de anticuerpos aCL, anti- β_2 GPI y AL.

Para llevar a cabo los estudios “*in vivo*” se seleccionó el suero de un paciente con SAF primario; el paciente era un varón de 53 años de edad con una historia de un ataque isquémico transiente, dos infartos de miocardio, tres episodios de TVP y un episodio de tromboembolismo pulmonar. Este paciente tenía altos títulos de anticuerpos aCL de isotipo IgG, altos títulos de anti- β_2 GPI y AL positivo.

Como control normal se utilizó el mismo pool de sueros proveniente de 10 individuos clínicamente sanos seleccionados para los estudios “*in vitro*”.

Todos los pacientes y sujetos controles firmaron un consentimiento informado, el cual fue aprobado por el Comité de Ética y estudios humanos de Morehouse School of Medicine.

2.- Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1, con un peso aproximado de 20g (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA). A los animales se los mantuvo en grupos de a cinco, en jaulas estándar para roedores, a una temperatura ambiente de 25 °C, expuestos a un foto período de 12:12 horas de luz: oscuridad y alimentados con Purina Rodent Chow (Purina, St. Louis MO). El agua potable se les administró *ad libitum* en botellas adaptadas a la jaula. El cuidado y control de enfermedades de estos ratones estuvo a cargo del Center of Laboratory Animal Resources (CLAR) of

Morehouse School of Medicine, hasta el momento de ser empleados para los estudios.

3.- Reactivos

3.1.- Reactivos químicos

Prostaglandina E1 (PGE₁); apyrasa VII; ácido acetil salicílico (ASA); Indometacina; trombina bovina; BSA; ovoalbúmina; esferas de pepsina-agarosa; Pentobarbital Sódico; PMA; LPS; Cardiolipina (5mg/ml) y Reactivo para la detección de endotoxinas: Amebocito *Limulus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); Proteína G-Sefarosa (Gamma Bind G, Tipo 3 Sefarosa CL-6B) y Sefarosa 2B (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ); reactivo de Bradford; reactivo para tinción de proteínas con plata "Silver stain" y reactivo de quimioluminiscencia "Amplight" (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); SB203580; PD 98059 y MG132 (Calbiochem, San Diego, CA, USA); SB 202474 (EMB Biosciences Inc, San Diego, CA, USA), p-nitrofenilfosfato en buffer dietanolamina pH: 9,8 (Biotecx, Houston, TX, USA) y tetrametil bencidina TMB (Dako, Carpinteria, CA, USA).

3.2.- Soluciones buffer

Buffer de unión (fosfato de Sodio 0.01 M, ClNa 0.15 M, EDTA 0.01M); PBS (0.001 mol/L fosfato de Sodio, ClNa 0.15 M, pH 7.4); buffer de lavado para inmunoblot (Tris 0.01 M, ClNa 0.15 M, Tween-20 0.1%); buffer acetato (acetato de Sodio 0.1M, pH 4,5); HB (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaHCO₃ 5 mM, dextrosa 10 mM, pH 7,4); HBSS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA); buffer de Laemmli (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA); solución de bloqueo para inmunoblot (5 % de leche en polvo sin grasa en TBS-T) y buffer de inmunoprecipitación 2X (Tris/HCl 100 mM, pH 7.4, NaCl 300 mM, EGTA 2mm, leupeptin 5 µg/ml, aprotinin 5 µg/ml, PMSF 2 mM, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 2 mM, Nonidet P-40 2 %, sodium deoxicolato 0.5 %)

3.3.- Anticuerpos

[A1]: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-p38 MAPK humano fosforilada, 28b10 (Thr 180/Tyr 182) (Cell Signals Technology, Beverly, MA, USA).

[A2]: Anticuerpo policlonal de conejo anti p38 MAPK humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

- [A3]: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-ERK1/ERK2 humano fosforilada, E10 (Thr202/Tyr 204) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- [A4]: Anticuerpo policlonal de conejo anti- ERK1/ERK2 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- [A5]: Anticuerpo policlonal de conejo anti-cPLA₂ humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- [A6]: Anticuerpo secundario de Cabra anti-IgG de conejo, marcada con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- [A7]: Anticuerpo anti-cadena γ IgG humana marcado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- [A8]: Anticuerpos anti-cadenas livianas humanas κ marcado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- [A9]: Anticuerpo anti-cadenas livianas humanas λ marcado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- [A10]: Anticuerpo policlonal de conejo anti-NOS2 Humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- [A11]: Anticuerpo monoclonal de ratón anti- FT humano (producto N° 4508; American Diagnostica, Stamford, CT, USA).
- [A12]: Anticuerpo IgG policlonal de conejo anti-actina humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- [A13]: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-cd54 humano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).
- [A14]: Anticuerpo monoclonal de rata contra VCAM-1 de ratón (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).
- [A15]: Fragmento F(ab)'₂ de cabra anti IgG de rata conjugado con Qdot 655 (Invitrogen, Eugene, OR, USA).

4.- Métodos

4.1.- Purificación de IgGs

Las fracciones de IgGs del suero fueron obtenidas utilizando el método de cromatografía de afinidad. Se preparó una columna de Proteína G Sefarosa. La columna se equilibró con buffer de unión, se eluyeron las IgGs con ácido acético 0,5 M ajustado a pH 3 y se recolectaron en buffer Tris-HCl, pH 9, con el fin de neutralizar las fracciones eluidas. Se dializaron contra PBS, pH 7,4 durante toda la noche a 4°C. Los dializados fueron filtrados a través de filtros con poros de 0,22 µm de diámetro (Millipore Products Division, Bedford, MA, USA).

Las IgGs purificadas se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras, mostrando una única banda de 150 Kd luego de la tinción con plata.

Se determinó la concentración de los anticuerpos purificados mediante el método colorimétrico de Bradford (252) y para ello se preparó una curva de calibración con SAB (10 a 100 µg/ml).

Las concentraciones de proteínas en las fracciones eluidas fueron obtenidas por interpolación en la curva realizada con SAB. En todos los experimentos se utilizaron preparaciones de anticuerpos con un nivel de endotoxinas contaminantes inferior a 0,03 unidades/ml, utilizando el método de lisado de Amebocito *Limulus* según se describe en el inserto provisto por el fabricante.

4.2.- Obtención de los fragmentos F (ab')₂

Las IgGs purificadas se dializaron contra buffer acetato durante 2 hs a 4°C y luego se sometieron a digestión con esferas de pepsina-agarosa durante 18 hs a 37°C. Se separaron las esferas de pepsina-agarosa mediante centrifugación a 4000g durante 10 minutos, y los sobrenadantes se dializaron contra PBS, pH 7,4 a 4°C. Los fragmentos Fc y las IgGs no digeridas se removieron mediante cromatografía de afinidad, con Proteína G-Sefarosa.

Los fragmentos F(ab')₂ fueron analizados mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras, mostrando la típica banda de 110 Kd luego de la tinción con plata.

4.3.- Determinación de anticuerpos antifosfolípidos

4.3.1.- Detección de anticoagulante lúpico

La actividad de AL en plasma se evaluó usando tres ó cuatro ensayos de coagulación para el screening: APTT con los reactivos Actin FSL (Dade International Inc, Miami, FL, USA); PTT-LA (Diagnostica Stago, Asnieres, France); dRVVT utilizando el reactivo DVVtest (American Diagnostica) y KCT con una suspensión de Caolín al 2% en agua destilada. La presencia del inhibidor lúpico fue considerada positiva cuando se obtenía prolongación de los tiempos de coagulación que no corregían al realizar las mezclas de plasmas de paciente con plasma pobre en plaquetas (PPP) normal en las proporciones 1:1 (paciente: normal). La confirmación de la presencia de AL se realizó mediante la PNP en los ensayos de APTT y dRVVT, el ensayo confirmatorio DVV Confirm (American Diagnostica) y con el TTI, usando la tromboplastina tisular recombinante Innovin (Dade International) sin diluir y diluida 1:500 en solución CaCl₂ 0.025M. La presencia del AL fue confirmada cuando al menos uno de los ensayos de detección y uno de los de confirmación fueron positivos, teniendo en cuenta los criterios previamente establecidos (250).

4.3.2.- Detección de anticuerpos anticardiolipinas

Se determinó la actividad aCL en las fracciones de IgGs purificadas mediante ensayos de ELISA (64, 251). Se utilizaron placas de 96 pocillos (Titertek, MP Biomedical, Aurora, OH) que fueron cargadas con 30 µl/pocillo de una solución de CL de concentración 50 µg/ml en etanol. Las placas fueron secadas al aire mediante incubación a 4°C durante toda la noche. Luego se lavaron tres veces con PBS y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con 75µl de una solución de 10 % de SFB en PBS. Posteriormente, se añadieron 50 µl/pocillo de las IgG purificadas (dilución 1:50 en SFB-PBS) en duplicado junto con controles positivos y negativos. En los ELISA aCL se incluyeron estándares (Louisville APL Diagnostics, Seabrook, TX) para expresar los resultados en unidades GPL. Luego de una hora de incubación se lavaron las placas tres veces con 100 µl de PBS, y posteriormente se agregó 50 µl/pocillo de un antisuero anti-cadena γ IgG humana marcado con fosfatasa alcalina. Después de una hora de incubación se volvieron a lavar tres veces con PBS y luego se agregó 50 µl/pocillo de sustrato p-nitrofenilfosfato en buffer dietanolamina (pH 9,8). Cuando las DO de los estándares llegaron aproximadamente a uno, la reacción se detuvo por el agregado de

50 μ l/pocillo de una solución 1N de H₂SO₄. Las placas fueron leídas a 405 nm usando el Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). En forma similar, la actividad aCL de los fragmentos F (ab')₂ se determinó mediante la técnica de ELISA empleando como anticuerpo secundario una mezcla de anticuerpos anti-cadenas livianas humanas κ y λ marcados con fosfatasa alcalina. Se realizó una curva de calibración con los estándares utilizados para IgG entera y se reportó los valores de aCL en unidades GPL (actividad anticardiolipina de 1 μ g/ml de anticuerpo IgG obtenido de un suero estándar purificado por cromatografía de afinidad).

4.3.3.- Detección de anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I

La actividad anti- β_2 GPI en los sueros de los pacientes con SAF y en el pool de sueros de individuos sanos fue determinada mediante ELISA utilizando un kit comercial (Quanta-Lite, Inova Diagnostics, San Digo, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La actividad anti- β_2 GPI de las IgGs purificadas y de los fragmentos F(ab')₂, fue determinada mediante ELISA con algunas modificaciones a la técnica descrita anteriormente (253). Se utilizaron placas de ELISA irradiadas (Costar 3590, Corning Inc, Corning, NY), las cuales fueron cargadas con 20 μ g/ml de β_2 glicoproteína I purificada y bloqueada con 5% de ovoalbúmina en PBS. Como anticuerpos secundarios fueron utilizados anti-IgG humana (cadena γ específico) y una mezcla de anticuerpos anti- κ y anti- λ humana marcados con fosfatasa alcalina, para las IgGs y los F (ab')₂ respectivamente. Las actividades anti- β_2 GPI fueron expresadas en unidades de DO a 405 nm medida usado el Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

4.4.- Inmunoblot

Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida comerciales (Precast-Polyacrylamide-Gel) y buffer de corrida (Tris/glicina/SDS), utilizando el sistema Mini-Protean Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) a 10 voltios durante 30 minutos en una unidad de transferencia semiseca (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo de inmunoblot, durante 2 hs a 4° C y luego incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón ó policlonal de conejo, diluidos en solución de bloqueo. Luego de 16 hs de incubación a 4°C, las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min. con TBS-T e incubadas con un anticuerpo secundario (Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo marcados con peroxidasa) diluidos en solución de bloqueo. Finalmente se lavaron las membranas tres veces durante 5 min con TBS-T y se revelaron mediante quimioluminiscencia. Las placas se fotografiaron utilizando un sistema de imagen computarizado (Foto/Analyst Investigator-PC System, Fotodyne Incorporate, Hartland, WI) y la intensidad de las bandas se cuantificaron mediante análisis densitométrico utilizando el Gel Pro Analyzer 4.5 Softwar (Fotodyne Inc).

4.5.- Estudios en Plaquetas

4.5.1.- Aislamiento de plaquetas

Durante un período de 10 días previos a la extracción de la muestra se seleccionaron donantes de plaquetas, clínicamente sanos, quienes no habían recibido medicación que pudieran afectar la funcionalidad plaquetaria. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos de plástico empleando como anticoagulante citrato de sodio al 3.8% en una relación (9/1; v/v).

Mediante centrifugación a 120 x g durante 20 min a temperatura ambiente se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) el cual fue transferido a un tubo de Khan de poliestireno.

4.5.1.1- Preparación de plaquetas lavadas

El PRP fue centrifugado a 800 x g durante 10 min a temperatura ambiente, en presencia de 0,1 µM de PGE1 y resuspendido en buffer Hepes, suplementado con 0,4 U/ml de apyrasa VII y 1 mM de ASA. La concentración de paquetas fue ajustada a 1 x 10¹² plaquetas/L. Esta concentración de plaquetas fue empleada para los ensayos de inmunoblot y movilización de calcio.

4.5.1.2.- Preparación de plaquetas filtradas por gel (PFG)

El PRP se filtró a través de una columna de Sefarosa 2B equilibrada con buffer Hepes en ausencia de inhibidores como se describió (254). Al eluído se lo ajustó a una

concentración plaquetaria de $250 \pm 50 \times 10^9/L$ para ser usado en los estudios de agregación y de $300 \times 10^9/L$ para ser usado en los estudios de producción de TXB₂. Las plaquetas filtradas fueron mantenidas a 37°C en un tubo plástico siliconado tapado, y se analizaron dentro de las 2 hs luego de ser extraídas.

4.5.2.- Estudio de la fosforilación de p38 MAPK y de p44/p42 MAPK en plaquetas humanas

Alícuotas de 100 µl de plaquetas lavadas se incubaron en microtubos en condiciones estáticas durante 5 min a 37°C con: 50, 100 o 200 µg/ml de IgG-aFL; IgG-SHN (como control) y 200 µg/ml de F(ab')₂ IgG-aFL ó F(ab')₂ IgG-SHN. Luego, las mismas se estimularon con 0.005 U/ml de trombina durante 2 min.

Como controles de fosforilación se utilizaron alícuotas de plaquetas incubadas con PBS por 5 min y estimuladas con 0.005 U/ml o 1U/ml de trombina durante 2 min.

En el tiempo establecido se detuvo la reacción mediante el agregado de buffer Laemmli suplementado con 5% de 2-mercaptoetanol. Los lisados fueron calentados a 95°C por 10 min y centrifugados a 11000 x g durante 10 minutos, luego el sobrenadante de estos lisados fueron sembrados en geles de poliacrilamida al 12% y se resolvieron por electroforesis. Los inmunoblots se realizaron con los siguientes anticuerpos: anti-fosfo P38MAPK, anti-MAPK total, anti fosfo-ERK1/ERK2 o anti ERK1/ERK2 total.

4.5.3.- Estudio de la fosforilación de cPLA₂

Se incubaron alícuotas de 100 µl de plaquetas lavadas, en una concentración de 1×10^{12} plaquetas/L, con 50 µl (200 µg/ml de concentración final) de F(ab')₂ IgG-SHN ó F(ab')₂ IgG-aFL (n=5) durante 5 min y a continuación se las estimuló con 0,005 U/ml de trombina durante 2 min. Como control de fosforilación se incubó una alícuota de plaquetas lavadas con 50 µl de PBS durante 5 minutos y posteriormente se las estimuló con 0,005 U/ml ó con 1 U/ml de trombina durante 2 min. En el tiempo establecido se detuvo la reacción mediante el agregado de igual volumen de buffer de inmunoprecipitación 2X. Los lisados fueron incubados durante 1 h a 4°C con 90 µl de proteína G-Sefarosa (50 mg/ml de solución stock). Luego de una breve centrifugación, se incubaron los sobrenadantes con 1 µg de anticuerpo anti-cPLA₂ durante 2 hs a 4°C y los inmunocomplejos se precipitaron por la adición de 90 µl of proteína G-Sefarosa durante 45 minutos en continua rotación. Los inmunocomplejos fueron centrifugados y

lavados tres veces con 1 ml de buffer de inmunoprecipitación 1X y finalmente se resuspendieron en 25 μ l de buffer Laemmli suplementado con 5% de 2-mercaptoetanol.

Las muestras se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 10%, durante 210 min a 150 voltios empleado como buffer de corrida Tris-glicina-SDS pH 8,3. El inmunoblot se realizó con un anticuerpo policlonal de conejo anti- cPLA₂ humano. La forma fosforilada de la cPLA₂ se detectó como una segunda banda de movilidad más lenta, como fué descrito anteriormente (255).

4.5.4.- Estudios de Agregación plaquetaria

Se preincubaron en cubetas de agregación, alícuotas de 420 μ l de PFG suplementadas con 1 μ l de ClCa₂ (1mM de concentración final) durante 20 minutos a 37°C, con diferentes concentraciones de SB203580 (0,1 y 1 μ M) o con 10 μ M de PD 98059 o con el mismo volumen del disolvente de estas drogas (DMSO 1%). Luego se las incubó durante 5 min con 30 μ l de anticuerpos IgG-aFL (concentración final 200 μ g/ml) o con 30 μ l de anticuerpo IgG-SHN (concentración final 200 μ g/ml). Posteriormente se midió la agregación plaquetaria por el método turbidimétrico de Born (256), en un agregómetro de doble canal (Minigator II, Payton Scientific Inc, Buffalo, NY) mediante la adición de una dosis subagregatoria del agonista (0,005 U/ml de trombina).

La agregación fue registrada durante 5 minutos en un registrador lineal, y se evaluó como la amplitud de las curvas de agregación en mm.

4.5.5.- Estudio de producción de Tromboxano B₂

Las PFG fueron ajustadas a una concentración de 3×10^{11} plaquetas/L en buffer Hepes e incubadas con F(ab')₂ aFL ó F(ab')₂ SHN en una concentración final de 200 μ g/ml o con PBS, durante 5 minutos, en la presencia o ausencia de 1 μ M de SB203580 y luego estimuladas durante 3 minutos con 0,005 U/ml de trombina. En el tiempo establecido se detuvo la producción de TXB₂ mediante la adición de igual volumen de buffer Hepes conteniendo 0,1mM de Indometacina e inmediata centrifugación de las muestras a 10000 rpm durante 30 segundos a 4°C y la posterior separación de los sobrenadantes, los cuales se guardaron a -20°C hasta el momento de ser analizados. La concentración de TXB₂ fue determinada en los sobrenadantes utilizando un test de ELISA (Amersham-Pharmacia, Biotech) según el procedimiento indicado en el inserto del equipo diagnóstico. El ensayo se basa en la competición entre el TXB₂ de la muestra o de los calibradores con un TXB₂ marcado con acetilcolinesterasa (TXB₂

marcado) por un limitado número de sitios de unión a un anti suero de conejo anti TXB₂. Debido a que la concentración del TXB₂ marcado es constante mientras que la concentración de TXB₂ es variable, la cantidad de TXB₂ marcado que se une al antisuero de conejo es inversamente proporcional a la concentración de TXB₂ libre en el pocillo. Estos complejos antisuero de conejo unido a TXB₂ libre o TXB₂ marcado se unirán a un anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG de conejo que fue previamente pegado a los pocillos de la placa de ELISA. Posteriormente la placa se lavó para eliminar el reactivo no unido y luego se agregó un sustrato para acetilcolinesterasa a cada pocillo de la placa. El producto de esta reacción tiene un color amarillo que absorbe a 412 nm. La intensidad de este color se determinó espectrofotométricamente y es proporcional a la cantidad de TBX₂ marcado unido al pocillo, lo cual es inversamente proporcional a la cantidad de TXB₂ libre presente en el pocillo durante la incubación.

4.5.6.- Estudios de la Movilización de Calcio intracelular

Las plaquetas lavadas en una concentración de 1×10^{12} plaquetas/L se incubaron en microtubos cubiertos, protegidos de la luz, durante 20 minutos a 37°C, con una mezcla de indicadores de Calcio sensibles a la luz visible: Red-Fura acetoxymethyl ester (RF-AM) 5 μ M y Calcium Green acetoxymethyl ester (CG-AM) 5 μ M. Se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente; se descartó el sobrenadante y el pellet plaquetario se resuspendió en buffer Hepes suplementado con 0,4 U/ml de apyrasa VII y 1mM de ASA. Las plaquetas se ajustaron a una concentración de 1×10^{12} plaquetas/L.

Alícuotas de plaquetas de 100 μ l fueron incubadas en placas de 96 pocillos previamente siliconados (Titertek), con 200 μ g/ml F (ab')₂ IgG-aFL o 200 μ g/ml de F(ab')₂ IgG-SHN o PBS durante 5 minutos, y posteriormente se las estimuló con 0,01 U/ml de trombina. Cada experimento, incluyó una curva de calibración utilizando 0,01; 0,1; 0,5 y 1 U/ml de trombina. Los picos de emisión de calcium-green y de fura-red se determinaron a 530/30 y 640/40 nm de longitud de onda respectivamente, en el lector de fluorescencia para microplaca Cytofluor II (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Las elevaciones de Calcio intracelular resultan en un incremento de la intensidad de fluorescencia del Calcium-Green y una disminución en la intensidad de fluorescencia del fluoroforo Fura-Red a 485/20 nm de longitud de onda de excitación. Los cambios en la concentración de Calcio se evaluaron en base a la relación entre la intensidad de señal del Calcium green respecto a la intensidad de señal del Fura-Red, según se ha descrito (257).

4.6.- Estudio en células Endoteliales

4.6.1.- Cultivo de Células de Cordón Umbilical Humano

Se realizó el cultivo de células de cordón umbilical humano según el protocolo descrito (258). Se cultivaron HUVECs (Emory University Skin Diseases Research Center, Atlanta, GA) en placas de 6 ó 96 pocillos, placas de cultivo de 60 mm ó frascos T75; cubiertos con colágeno y con el medio de cultivo MCDB 110 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se suplementó con 1mg/dl de heparina, 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 10 mg/dl de estreptomina, 10% de SFB inactivado y 7,5 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales, H-Neurex (ECGS; Upstate Biotechnology). Se cultivaron hasta llegar a confluencia en estufa de cultivo gaseada a 37 °C con 5% de CO₂

4.6.2.- Estudio de la expresión del FT inmunológico en cultivos de HUVECs

Se cultivaron células HUVECs en placa de cultivo de 96 pocillos, como se describió anteriormente. Cuando el cultivo llegó a confluencia, el medio fue reemplazado por otro medio de cultivo MCDB 110 conteniendo solamente 1% de SFB y incubando toda la noche previa al experimento.

Los pocillos fueron incubados durante 4 horas a temperatura ambiente con 200 µg/ml de IgG aFL (n = 8), 200 µg/ml de IgG NHS (n = 4), disueltos en medio de cultivo o se incubaron con medio de cultivo solo como control. Como controles positivos se incubaron las células con 100 nM de PMA o 500 ng/ml de LPS disueltos en medio de cultivo. En algunos experimentos las células fueron pretratadas con 1, 5 o 10 µM de SB203580 o con 50 µM de MG132, durante 60 minutos antes del agregado de IgG aFL o IgG SHN. Los experimentos se realizaron por duplicado en tres ensayos diferentes.

4.6.3.- ELISA para la detección del FT

Se midió la expresión del FT en la superficie de las células endoteliales mediante un ensayo de ELISA según lo descrito por (259), con las siguientes modificaciones:

Se incubaron las células durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:500 de un anticuerpo monoclonal anti FT humano en HBSS suplementado con 10% de SFB. Luego se descartó la solución de anticuerpo y se fijaron las células con formaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos. Las células se lavaron de 3 a 4 veces con HBSS y posteriormente se incubaron con una dilución 1:500 de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa en HBSS, suplementado con 10% de SFB. Las células fueron luego lavadas 3 a 4 veces con HBSS y posteriormente incubadas con una solución de TMB. La reacción se detuvo por el agregado de una solución de ácido sulfúrico 8N y las densidades ópticas se midieron en un lector de microplaca a 450 nm de longitud de onda. En todos los experimentos se realizó un control, en donde las células fueron tratadas como se describió en el párrafo anterior, pero sin agregar el primer anticuerpo anti FT.

4.6.4.- Estudio de la expresión del FT funcional en células HUVECs

Se determinó la función del FT en el lisado de células HUVECs empleando un ensayo cromogénico comercial (Actichrome TF; American Diagnostica, Stamford, CT), que mide factor Xa luego de la activación por el complejo factor VII-FT. La cantidad de factor Xa se mide por su habilidad de clivar Spectrozime Xa, un sustrato cromogénico específico para el factor Xa.

Se cultivaron células HUVECs hasta confluencia en placas de cultivo de 6 pocillos. La noche previa al experimento se reemplazó el medio de cultivo por el medio MCDB 110 conteniendo solamente 1% de SFB. Se incubaron los pocillos durante 4 horas a temperatura ambiente con 200 µg/ml de IgG aFL (n = 8), 200 µg/ml de IgG NHS (n = 4), o medio de cultivo. Como controles positivos se utilizaron 100 nM de PMA o 500 ng/ml de LPS. En algunos experimentos las células fueron pretratadas durante 60 minutos con 1, 5 o 10 µM de SB203580 antes del agregado de IgG aFL o IgG SHN. Luego de este período se lavaron las células con PBS a 4°C y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se centrifugaron a 5000 rpm; se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue lisado con 100 µl de PBS-0.1% Triton X y los lisados celulares se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Al momento de medir el FT funcional, las preparaciones se desfrieron rápidamente en un baño de agua a 37°C y luego estas preparaciones se sonicaron. El FT se determinó según el protocolo descrito en el inserto que acompaña al kit

comercial. Se calculó la concentración del FT en pM, mediante la extrapolación de la absorbancia a una curva de absorbancia *versus* concentración, construida con un calibrador de FT activo humano. Los resultados obtenidos se expresan como la media \pm DE concentración pM de FT. Los experimentos se realizaron 3 veces, por duplicado.

4.6.5.- ELISA para la determinación de IL-6 y IL-8

Se cultivaron células HUVECs en placas de cultivo de 96 pocillos hasta llegar a confluencia. Se incubaron las células durante 3 a 4 horas con 200 μ g/ml de IgG aFL, 200 μ g/ml de IgG SHN o medio de cultivo. Como control positivo se incubaron las células con 3 μ g/ml de LPS. Se determinó el nivel de citoquinas en el sobrenadante del cultivo celular utilizando los siguientes Kits de ELISA comercial: IL6 direct ELISA Kit Human e IL8 direct ELISA Kit Human (BioSource International, Camarillo, CA).

Los kits constan de una placa de ELISA cubierta con un anticuerpo monoclonal de captura (Mabs1) anti IL-6 o anti IL-8. Luego de la incubación, se removió el exceso de antígeno, en los pocillos de la placa de ELISA que contienen las muestras diluidas en buffer de muestra o los calibradores, mediante lavados con buffer de lavado. Las placas se incubaron luego con un segundo anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa (Mabs 2-HRP) durante un tiempo establecido para que se forme un sandwich: Mba1-IL6-Mabs2-HRP ó Mba1-IL8-Mabs2-HRP.

Posteriormente las microplacas son lavadas para eliminar el anticuerpo marcado no unido, y el anticuerpo marcado que permanece unido se mide con una reacción cromogénica con TMB que se detiene con H₂SO₄. Las concentraciones de IL-6 y IL-8 en las muestras son determinadas por la interpolación con una curva estándar realizada con los calibradores provistos por el kit comercial.

Los experimentos se realizaron tres veces por duplicado. Los resultados se expresaron como la media \pm DE pg/ml de IL-6 ó IL-8.

4.6.6.- Estudios de Western Blot para la

detección de iNOS y p38MAPK

Se cultivaron células HUVECs en placas de cultivo de 60 mm de diámetro, utilizando como medio de cultivo el MCDB 110 completo y suplementado con 10% de SFB. Cuando las células crecieron hasta su confluencia, el medio de cultivo se reemplazó por un medio igual pero con 1% de SFB, y se incubó durante toda la noche previa al experimento. Las células se incubaron durante 30, 60 y 120 minutos con 200

μ l de IgG aFL (n=6) o con IgG SHN, en una concentración final de IgG de 100 μ g/ml. Como control positivo las células se incubaron con 2 μ g/ml de LPS. Al finalizar las incubaciones se lavaron las placas dos veces con PBS frío (en baño de hielo), y se resuspendieron con 1 ml del mismo buffer de lavado en un tubo de microcentrífuga, luego se centrifugaron a 5000xg durante 5 minutos.

Los pellets celulares fueron resuspendidos en 50 μ l de un buffer de lisis celular (M-PER mammalian protein extraction reagent, Pierce, Rockford, IL). Se cuantificó la concentración de proteínas en el lisado celular utilizando el método de Bradford (252). Las muestras se resolvieron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, y los inmunoblots se realizaron con los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón anti fosfo-p38 MAPK humano, anticuerpo policlonal de conejo anti-NOS2 humana o anticuerpo anti-actina humana.

La banda fosforilada de p38MAPK en cada muestra se normatizó contra su correspondiente valor de banda de actina, y los resultados se expresaron como el incremento relativo sobre el nivel de background (muestra tratadas con IgG SHN).

4.6.7.- Análisis de RNA mensajero para el FT

Se cultivaron células HUVECs en placas de cultivo de 60 mm de diámetro, utilizando como medio de cultivo el MCDB 110 completo y suplementado con 10% de SFB. Cuando las células crecieron hasta confluencia, el medio de cultivo se reemplazó por un medio igual pero con 1% de SFB, y se incubó durante toda la noche previa al experimento. Las células se trataron durante 2 horas con 250 μ g/ml de IgG-aFL o IgG SHN; en cambio en otros experimentos las células se trataron con 1 μ M o 10 μ M de SB203580 antes de la estimulación con los anticuerpos. Como controles de estimulación positivos se utilizaron PMA (100 μ M) y LPS (3 μ g/ml). Las células fueron lavadas dos veces con 3ml de PBS frío (en baño de hielo) y tratadas con 1ml de reactivo TRI (Sigma-Aldrich). El RNA fue tratado con DNasa libre de Rnasa durante 1 hora a temperatura ambiente para remover cualquier potencial de contaminación con DNA genómico. Las DNasas fueron inactivadas durante 30 minutos a 75°C.

El DNA complementario (cDNA) fue generado empleando el sistema de preamplificación de cDNA Superscript II first-strand (Gibco BRL, Rockville, MD) que utiliza primers. La cantidad de RNA mensajero fue medida mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando el GeneAmp 5700 de Perkin Elmer (Emeryville, CA). La PCR se realizó utilizando SYBR Green Master Mix (Perkin Elmer, Wellesley, MA) con primers optimizados (FT mRNA, 5'-CAC-CGA-CGA-GAT-TGT-GAA-GGA-T-3 y 5'-

CCC-TGC-CGG-GTA-GGA-GAA-3'; para actina mRNA, 5'-CGT-CCA-CCG-CAA-ATG-CTT-3' y 5'-TCTGCG-CAA-GTT-AGG-TTT-TGT-C-3'). Los primers fueron sintetizados por el Microchemical facility of the Winship Cancer Center (Emory University School of Medicine, Atlanta, GA). En los experimentos preliminares las pendientes de las curvas de los primer de FT y de actina dieron una diferencia menor a 0.1 entre si (1.4006 y 1.4875, respectivamente). El nivel relativo de RNAm de FT se calculó por el método $\Delta\Delta C_t$, normalizado con actina (260). Los datos se expresaron como las veces en que se incrementó sobre el control no estimulado.

4.6.8.- ELISA para la determinación de ICAM-1

Se cultivaron células HUVECs en placas de 96 pocillos. Cuando las células llegaron a confluencia, se las incubó durante 2 hs con 100 μ de SB203580 (20 μ M) o con medio de cultivo solo. Luego de la incubación las células fueron tratadas con IgG-aFL o IgG-SHN en una concentración final de 200 μ g/ml, diluido en medio de cultivo, durante 4 hs.

Finalizada las incubaciones se lavaron las células dos veces con HBSS-FBS10%, y se fijaron durante 15 minutos con 2% de paraformaldehído. Se lavaron posteriormente dos veces con HBSS y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti cd54 humano diluido en HBSS-FBS 10%. La placa luego fue lavada 3 veces con HBSS-FB10% e incubada con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa durante 1 hora. Finalmente las placas se lavaron tres veces con HBSS-FBS10% y se revelaron con TMB.

Como control se realizó el mismo experimento pero sin la adición del anticuerpo primario.

4.6.9.- Adhesión de monocitos a células endoteliales

El estudio de la adhesión de monocitos THP-1 humanos a células endoteliales HUVECs, fue realizado según el método descrito previamente (261). Se cultivaron células HUVECs en placas de 96 pocillos. Cuando las células llegaron a confluencia se incubaron durante 4 horas con 200 μ g/ml de IgG-aFL ó IgG-SHN, todos diluidos en medio de cultivo de HUVEC en presencia o ausencia de 20 μ M de SB203580. Como control positivo se incubaron las células con 3 μ g/ml de LPS. Al finalizar estas incubaciones, las células se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se

incubaron en estufa de cultivo durante 30 minutos con monocitos THP-1 marcados con el fluorocromo BCECF (10^5 células/pocillo).

Luego de la incubación se lavaron las HUVECs cinco veces, y se leyó la fluorescencia remanente en el lector de fluorescencia para microplaca Cytofluor II (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). El porcentaje de monocitos THP-1 adheridos fue calculado como:

$$\% \text{ monocitos adheridos: } \frac{\text{Fluoresc. de HUVECs con THP-1} - \text{Fluoresc de HUVECs sin THP-1}}{\text{Fluoresc. de HUVECs con THP-1 total} - \text{Fluoresc. de HUVECs sin THP-1}}$$

4.7.- Estudios “*in vivo*”

4.7.1.- Análisis de la dinámica de formación del trombo

Para este estudio se emplearon ratones CD1, en una cantidad de 9 a 10 animales por grupo. Los ratones fueron inyectados dos veces con un lapso de 48 horas entre cada inyección con 500 µg de IgG aFL o con IgG SHN, utilizando la vía intraperitoneal. En los 30 minutos previos a la inyección, los dos grupos de animales, se trataron con el inhibidor SB203580 (25mg/kg de peso del animal) o con la misma concentración del análogo inactivo de este inhibidor y con el SB202474, estas drogas fueron disueltas en una mezcla (1:1) de dimetil sulfóxido y buffer fosfato salino.

A las 72 horas de la primera inyección, los ratones fueron anestesiados con 50 mg/kg intraperitoneal de pentobarbital sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y sometidos a cirugía para el análisis de la dinámica de formación del trombo, según se describió (262).

Se expone la vena femoral izquierda del ratón aislándola del tejido muscular circundante, y mediante un dispositivo denominado transiluminador, se observa el flujo sanguíneo en el interior del vaso sanguíneo, el cual es captado por una cámara de video incorporada a un microscopio para microcirugía (Stemi SV6, Inc, Thornwood, NY). Luego de unos minutos, se procede a la estimulación de la formación del trombo utilizando una pinza especialmente diseñada que permite realizar un pinzamiento o aplastamiento del vaso sanguíneo con una presión fija estandarizada y en un tiempo determinado, el cual también ha sido estandarizado.

Luego de la estimulación con el pinzamiento, se observa la formación del trombo, y se recogen estas imágenes durante varias horas, hasta que el trombo desaparezca totalmente. Posteriormente se procede al análisis de la formación del trombo, como se describió (262).

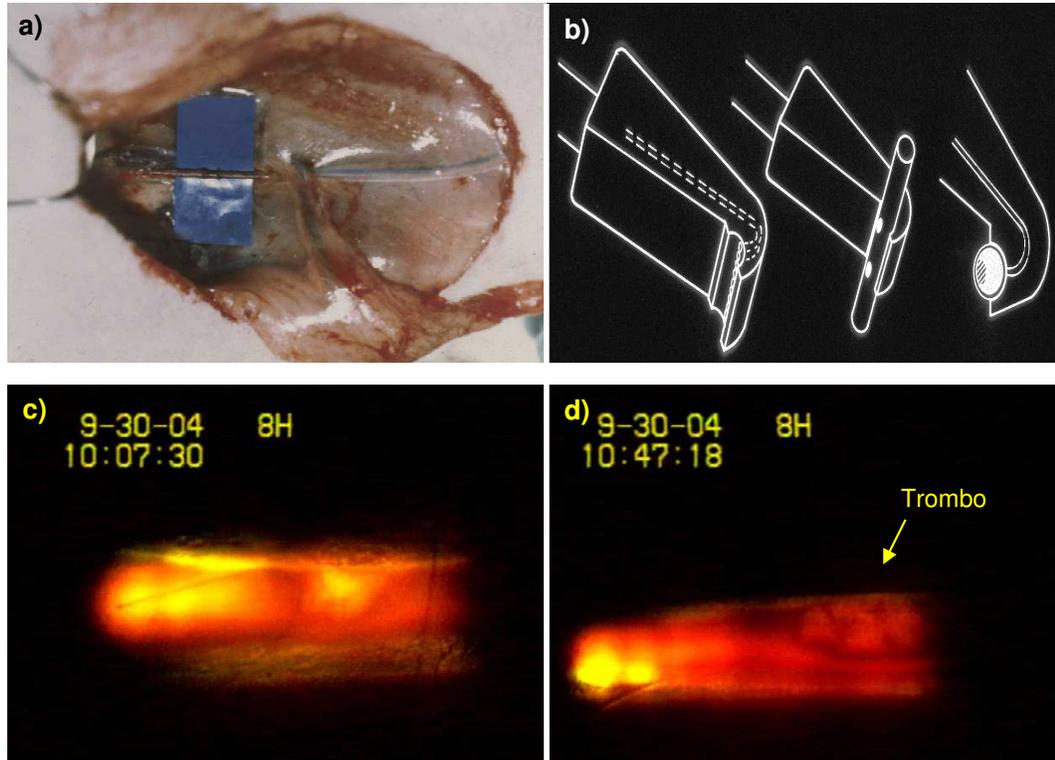


Figura 17. a) Exposición quirúrgica de la vena femoral del ratón, b) aparato de transiluminación, c) y d) Secuencia fotográfica donde se observa el interior de la vena femoral de ratón antes del pinzamiento (sin trombo) y luego del pinzamiento con la formación del trombo.

4.7.2.- Adhesión de leucocitos al endotelio

Este estudio se realizó de acuerdo al protocolo descrito por (263). Ratones machos CD1, fueron anestesiados con 50 mg/kg intraperitoneal de pentobarbital sódico. La anestesia fue mantenida con un tercio de la dosis inicial de acuerdo a lo que se necesitó. La temperatura del cuerpo fue mantenida a 36-37 °C con una lámpara y monitoreada con un sensor de temperatura intragástrico y un termómetro digital (Modelo 8500-40, Cole-Parmer, Chicago, IL).

Utilizando un microscopio de microcirugía (Stemi SV6, Inc, Thornwood, NY), se realizaron dos incisiones paralelas, desde la punta del escroto hasta la parte central del ligamento inguinal. Los dos músculos cremaster fueron expuestos y aislados del escroto. Una vez expuesto el saco del cremaster, se realizó una incisión en el lado ventral del mismo, utilizando un cauterizador térmico. Los testículos se ligaron y removieron. Se colocó el ratón sobre un dispositivo plástico, de 75 x 25 mm, que

permite posicionarlo en la platina del microscopio y transiluminar los músculos. Los músculos cremaster expuestos se estiraron cuidadosamente y se mantuvieron de esta manera mediante varias suturas 5-0 realizadas desde los márgenes externos.

Las bases de los músculos cremaster fueron estiradas y los márgenes medios de los mismos se unieron mediante suturas. De esta manera los dos músculos estuvieron sujetos a las mismas fuerzas de estiramiento. Con excepción de la vena y arteria central de cada músculo cremaster, los demás vasos sanguíneos a nivel de la base del músculos (A1/V1) se ligaron por medio de suturas 11-0. Se empaparon con solución salina y luego se cubrieron con una membrana transparente de polietileno, para minimizar la evaporación y deshidratación de los tejidos expuestos. La plataforma de plástico con el ratón fue transferido a un microscopio intravital para la observación intravascular.

Luego de un periodo de estabilización de 30 minutos se midieron en ambos cremaster, los siguientes parámetros:

- **Número de leucocitos rodantes:** Se definió como aquellas células que se mueven a través de los microvasos a una velocidad inferior a la de los hematíes que atraviesan una sección previamente determinada del vaso en un lapso de 30 segundos. Esto fue realizado en tres diferentes arteriolas A_3 (Arteriola precapilares o de tercer orden, 20 μm de diámetro).
- **Número de leucocitos pegados:** Se definió como aquellos leucocitos que se mantienen pegados al endotelio por un lapso de al menos 30 segundos a lo largo de un segmento de vaso sanguíneo de 400 μm . Esto fue realizado en paredes de vaso de tres diferentes sitios: una arteriola A_3 y una venula V_3 (Venula postcapilar de tercer orden de 20 μm de diámetro).
- **Número de capilares perfundidos:** en dos campos de 330 μm x 200 μm , sin la presencia de un vaso sanguíneo mayor.

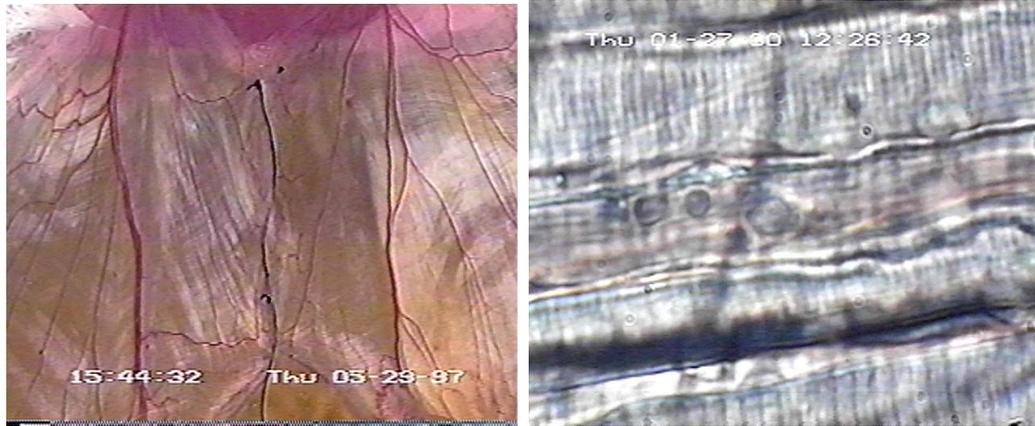


Figura 18. A) Músculos cremaster expuestos, donde se observan las venas y arterias central en cada músculo y pequeños vasos sanguíneos. **B)** Leucocitos adheridos a la pared de una vénula postcapilar.

4.7.3.- Estudio de la agregación plaquetaria en ratón

Luego de los procedimientos quirúrgicos, se recolectó sangre de la vena cava inferior con una aguja 25G x 16 mm en una jeringa de 1 ml conteniendo 0,1 ml de citrato de sodio 3,8%, en una relación sangre anticoagulante (9:1). Se obtuvo el PRP y se ajustó la concentración de plaquetas a 2×10^{11} plaquetas/L con PPP, proveniente de un pool de plasmas de ratones, guardado a -20°C hasta el momento del experimento, de acuerdo a lo descrito por (264). Se colocó alícuotas de 200 μl de PRP en cubetas de agregómetro, de vidrio siliconado y fondo plano, a 37°C , con agitación. Se midió la agregación plaquetaria utilizando un agregómetro Minigator II (Payton Scientific, Buffalo, NY, USA), luego de la adición de 0.005 U/ml de trombina bovina como agonista.

4.7.4.- Determinación de la actividad del FT en células peritoneales de ratón

Luego de la extracción de la sangre, los animales fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos mediante lavado durante 5 minutos de la cavidad peritoneal con 5 ml de PBS.

Luego de obtener una cantidad de células peritoneales de 2×10^7 /L, se lavaron las células dos veces con PBS. Se resuspendieron en 1 ml de Buffer Tris salino 0,1% de Triton X-100, pH: 7,4 y se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces, y finalmente se resuspendió el pellet celular en 50 μl

de TBS, 0,1% de Triton X-100, pH: 7,4 y fue sonicado durante 15 segundos. La actividad de FT se determinó utilizando un ensayo cromogénico comercial (Actichrome TF, American Diagnostica, Inc) como se describió (265).

4.7.5.- Determinación de la actividad del FT en homogenados de arteria carótida de ratón

Inmediatamente después de la obtención de células peritoneales, se realizaron dos incisiones a cada lado del cuello. Se expusieron ambas arterias carótidas y se cortaron piezas intactas de arteria de 5mm de largo en cada lado. Se recolectaron en Buffer Tris salino-0,1 % Triton X-100 a 4°C, conteniendo heparina como anticoagulante. Luego fueron homogeneizados inmediatamente, con un homogenizador manual.

Los homogeneizados de arterias de carótidas de 4 animales se juntaron en un pool, y se lavaron una vez con TBS-0,1 % Triton X-100 conteniendo heparina como anticoagulante y dos veces con TBS-0,1 % Triton X-100 sin heparina. Finalmente el pellet celular se resuspendió en 50 ul del mismo buffer y se sonicó. La actividad de FT se determinó utilizando un ensayo cromogénico comercial (Actichrome TF American Diagnostica) (265).

4.7.6.- Determinación de la expresión de VCAM-1 endotelial en cortes de aorta de ratón

Ratones CD1 en grupo de a dos fueron inyectados dos veces por vía intraperitoneal, con IgG-aFL. Se trataron con el inhibidor SB203580 o su análogo. Como grupo control de la expresión de VCAM-1, algunos ratones, se inyectaron con LPS (1µg/gr de peso corporal). El método para la determinación de VCAM-1 en cortes de aorta, se llevó a cabo según el procedimiento descrito (266). Los animales fueron sacrificados y las aortas fueron profundidas mediante presión y fijadas. Luego las aortas torácico descendentes se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra VCAM-1 de ratón, seguido por lavados y la incubación con F(ab)'2 anti IgG de rata marcado con quantum dot. Las imágenes se recolectaron con un microscopio Zeiss LSM 510 Meta two-photon microscope (Zeiss, Boston, MA, USA) equipado con un laser infrarrojo Titanio-safiro (Mira 900 Ti:S Coherent) a una longitud de onda de 750 nm. La

cuantificación de la fluorescencia de las imágenes confocales se realizó utilizando la función de frecuencia de histogramas del LSM-510 examiner software (Zeiss).

4.8.- Métodos Estadísticos

Para todos los cálculos estadísticos se utilizó el programa winIDAMS.

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (DE) (258, 259). Se utilizó el test "t" de Student para:

- Comparar las medias de las plaquetas tratadas en relación a los controles y
- En los estudios en células endoteliales para muestras no apareadas.

En los experimentos con animales, los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM) o como la media \pm DE (262, 263). Se utilizó el test "t" de Student para:

- Comparar los niveles de anticuerpos en los diferentes grupos de ratones y
- Comparar en muestras no apareadas para los valores de la media del tamaño del trombo y el número de leucocitos adherentes entre los grupos tratados y el grupo control.

La expresión de VCAM-1 fue analizada utilizando ANOVA (261).

En todos los casos se consideró la significación estadística cuando la probabilidad (p) era menor de 0.05.

Resultados y Discusión

1.- Selección de Pacientes e Individuos sanos

1.1.- Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con SAF

Se seleccionaron ocho sueros de pacientes con diagnóstico de SAF según el criterio de Sapporo citado por Miyakis y col (68), a partir de los cuales se purificaron las IgG aFLs que se utilizaron para los estudios *in vitro* y en animales de experimentación.

Tabla 5. Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con SAF seleccionados.

| Paciente | Edad del primer evento | Sexo | Nº y sitio de la Trombosis | Nº de pérdidas fetales | aCL (uGPL) | AL | Anti- β_2 GPI (USG) | SAF |
|----------|------------------------|------|----------------------------|------------------------|------------|----|---------------------------|-----|
| 1 | 45 | F | 1 TVP | 4 | 135 | + | 89 | Si |
| 2 | 47 | F | 4 TVP, 1 ACVI | 6 | 147 | + | 76 | Si |
| 3 | 35 | M | 0 | Ninguna | 198 | + | 123 | Si |
| 4 | 43 | M | TA (femoral y poplitea) | Ninguna | 723.6 | + | 450 | Si |
| 5 | 51 | M | 4 TVP | Ninguna | 345 | + | 235 | Si |
| 6 | 58 | M | 3 TVP | Ninguna | 134 | + | 235 | Si |
| 7 | 35 | F | 1 TVP | Ninguna | 109.4 | + | 156.7 | Si |
| 8 | 32 | F | 3 TVP | 5 | 97.5 | ND | 189.7 | Si |

M: masculino, F: femenino; TVP= Trombosis venosa profunda, ACV= accidente cerebrovascular (arterial), TA: trombosis arterial, ND: no determinado.

1.2.- Caracterización de las IgG-aFL y los fragmentos F(ab')₂

Cuando las preparaciones de IgGs purificadas fueron testeadas a una concentración proteica de 100 µg/ml todas las IgGs-aFL fueron positivas para el test de anticardiolipinas (>100 unidades GPL) y todas las IgGs-SHN fueron negativas (<10 unidades GPL).

Los valores medios \pm DE de unidades de absorbancias (abs) para anticuerpos anti- β_2 GPI fue 0.870 ± 0.218 y 0.140 ± 0.019 unidades netas para IgGs-aFL y para IgGs-SHN, respectivamente.

Excepto el anticuerpo IgG-aFL5, las restantes siete muestras de IgG-aFLs dieron un resultado de anticoagulante lúpico positivo (relación TTPA de la muestra /TTPA de plasma normal: 1.21-1.50).

Todas las muestras F(ab')₂aFL fueron positivas para el test de anticardiolipina (25-186 GPL unidades/100 µg proteína).

El promedio \pm DE de unidades netas de abs para la actividad anti- β_2 GPI fue 0.505 ± 0.111 y 0.068 ± 0.024 , para F(ab')₂aFL y F(ab')₂IgG-SHN, respectivamente (los valores medios muestran una diferencia estadísticamente significativa, $p= 0.0023$).

1.3.- Determinación del nivel de contaminación de las IgGs purificadas

Como se explicó en el capítulo de materiales y métodos, utilizando el ensayo de lisado de Amebocito Limulus, todas las preparaciones de IgGs utilizadas dieron un nivel de endotoxinas <0.03 unidades de endotoxina/ml,

En los experimentos realizados sobre CE donde se midió la expresión del FT, se efectuó en forma paralela un control interno para cada preparación de IgG aFL purificada que consistió en la incubación con la misma preparación pero desnaturalizada (preparaciones calentadas a 100°C durante 10 minutos). Con este procedimiento se produce la desnaturalización de la IgG pero no afecta a las endotoxinas que pudiesen haber en las preparaciones, por lo tanto se inhiben el efecto de los IgGs aFL sobre la expresión del FT pero no el efecto producido por las endotoxinas.

Este procedimiento se realizó con el fin de determinar que el incremento en la expresión del FT en los experimentos realizados en CE fuera inducido solo por las IgGs aFL y no por la acción de endotoxinas contaminantes.

2.- Estudios en Plaquetas

2.1.- Efectos de los aFLs sobre la fosforilación de p38MAPK en plaquetas

El tratamiento de plaquetas lavadas, con diferentes concentraciones de trombina (0.005-5 U/ml) produjo la fosforilación de p38MAPK en una manera dosis dependiente más precoz y con mayor intensidad que la ERK1/ERK2 (Figuras 19a y 19b).

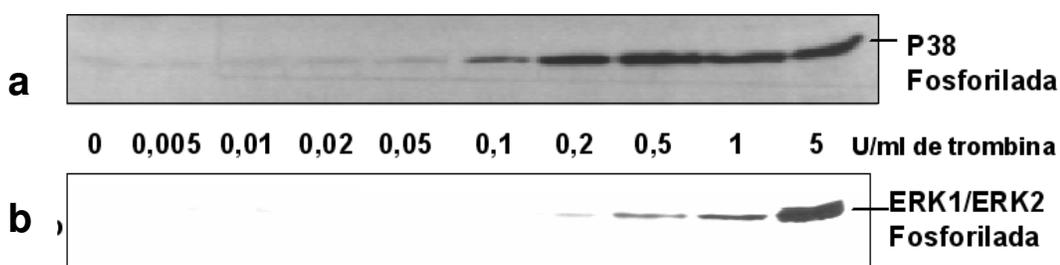


Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones de trombina sobre la fosforilación de a) p38MAPK y b) ERK1/ERK2.

El tratamiento de las plaquetas con IgGSHN y dosis subagregantes de trombina produjo una fosforilación que no difiere de las plaquetas incubadas con BFS y estimuladas con 0.005 U/ml de trombina; mientras que las muestras de plaquetas incubadas con IgGaFL (n=7) a una concentración proteica de 200 μ g/ml y estimuladas con 0.005 U/ml de trombina produjo un significativo incremento en la fosforilación de p38MAPK (4.4, 7.8, 7.4, 5.8, 7.5, 6.3 y 5.0 veces de aumento) cuando son comparadas con plaquetas incubadas con 200 μ g/ml de IgG-SHN y estimuladas con la misma dosis de trombina (Figura 20a). Se observó un incremento de 7.6 veces en la fosforilación de p38MAPK cuando las plaquetas fueron tratadas con 0.2 U/ml de trombina (control positivo).

El efecto fue dependiente de la concentración de anticuerpo aFL utilizado. Por ejemplo: para la IgGaFL1 a una concentración de 50, 100 y 200 μ g/ml de proteína se observa un incremento en la fosforilación de p38MAPK de 1.9, 3.0 y 4.4 veces respecto del control IgGSHN (Figura 20c). En cambio en ausencia de trombina el tratamiento de plaquetas con aFL solo (n=7) no produjo ningún efecto sobre la fosforilación de p38MAPK (Figura 20b).

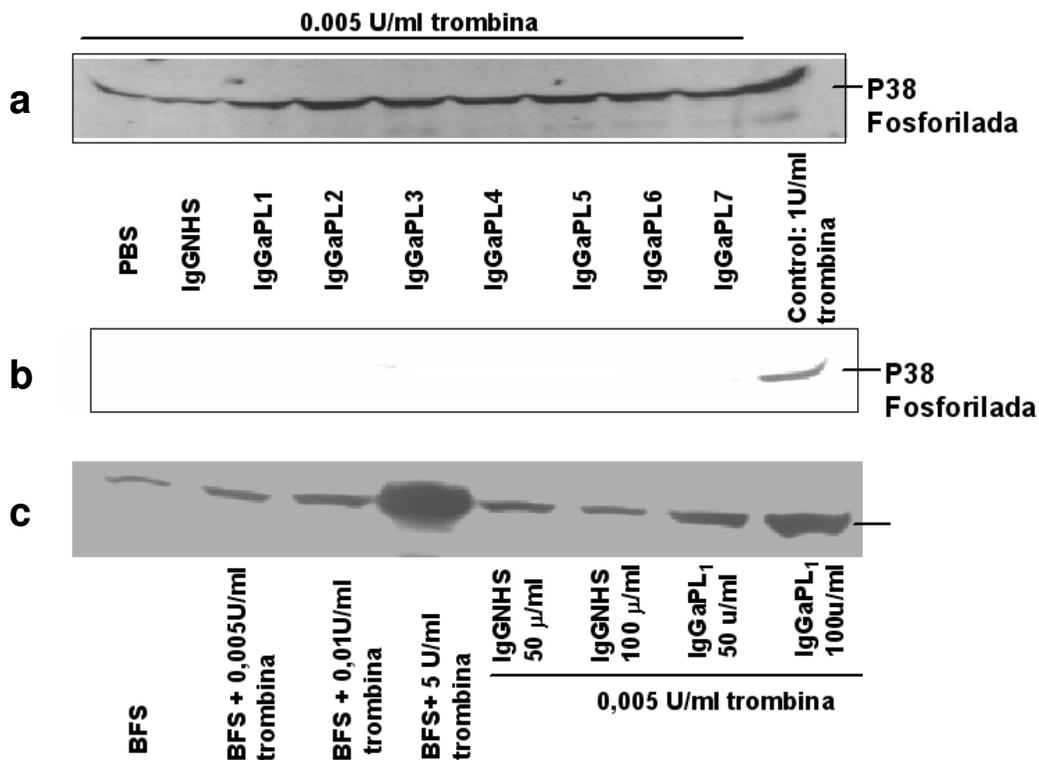


Figura 20. Efectos de IgG-aFL sobre la fosforilación de p38MAPK.

Al incubar los fragmentos $F(ab')_2$ aFL con las plaquetas lavadas y estimuladas con dosis subagregatorias de trombina se determinó que el incremento en la fosforilación de p38 mediado por las IgGs-aFL fueron dados por la interacción de los anticuerpos a través de la porción Fab de estas inmunoglobulinas. Como se muestra en las figura 21a y 21b, cuatro de las cinco preparaciones de $F(ab')_2$ aFL produjeron un incremento significativo de la fosforilación, comparadas con plaquetas incubadas con $F(ab')_2$ SHN y estimuladas con 0.005 U/ml de trombina (12.6, 4.6, 3.7 y 12.6 veces de incremento respectivamente). Cuando las plaquetas fueron incubadas con $F(ab')_2$ SHN o BFS y estimuladas con 0.005 U/ml de trombina no se observó ningún aumento en la fosforilación de p38MAPK

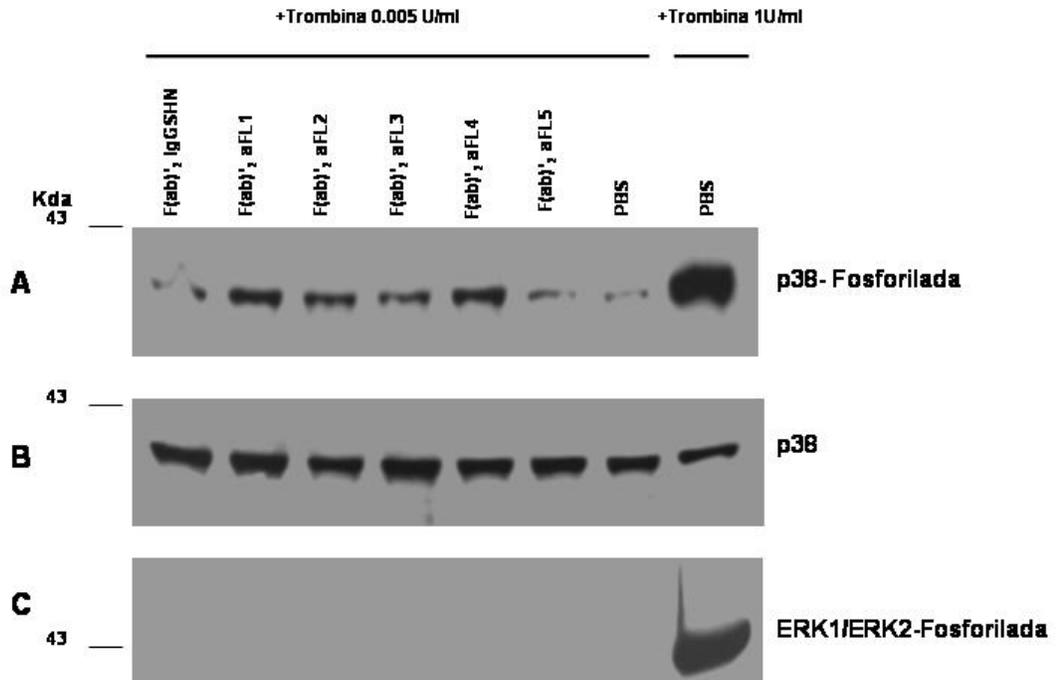


Figura 21. Efectos de los fragmentos $F(ab')_2$ aFL sobre la fosforilación de p38MAPK y ERK1/ERK2. 21A: p38 fosforilada, 21B: p38 total, 21C: fosforilación de ERK1/ERK2

2.2.- Efectos de los aFLs sobre la fosforilación de ERK1/ERK2

El tratamiento de plaquetas con diferentes concentraciones del agonista (0.005-5 U/ml de trombina) induce la fosforilación de ERK1/ERK2 de manera dosis dependiente, de menor intensidad que la observada con p38MAPK y que comienza a visualizarse a una mayor concentración de trombina (0.2 U/ml) comparada con la concentración de trombina necesaria para fosforilar p38MAPK (Figura 19b). No se observó fosforilación de ERK1/ERK2 tanto en las plaquetas incubadas con $F(ab')_2$ aFL o con $F(ab')_2$ SHN a una concentración de 200 μ g/ml y estimuladas con 0.005 U/ml de trombina durante 2 min. (Figura 21c).

2.3.- Efectos de los inhibidores específicos de p38MAPK y ERK1/ERK2 sobre el incremento de la agregación plaquetaria mediado por IgG-aFL

Se realizaron estudios de agregación plaquetaria en presencia o ausencia de inhibidores específicos de p38MAPK o de ERK1/ERK2, como son el SB203580 y PD98059, respectivamente. Esto tuvo como objetivo confirmar si la fosforilación de p38MAPK o de ERK1/ERK2 están involucradas en la activación de las plaquetas mediada por IgG aFL,

Como se muestra en la figura 22, las plaquetas tratadas con IgGaFL y dosis subagregatorias de trombina (0.005 U/ml), producen una agregación del 55% mientras que no se observa agregación de plaquetas incubadas con IgGSHN y estimuladas con 0.005 U/ml de trombina. El pretratamiento de plaquetas con 0.1 μ M o con 1 μ M de SB203580 produjo una inhibición de la agregación mediada por IgGaFL del 89 y del 100 %, respectivamente. El pretratamiento de las plaquetas con una concentración alta de PD98059 (10 μ M) produjo una inhibición parcial del 44%, de la agregación plaquetaria inducida por IgG aFL.

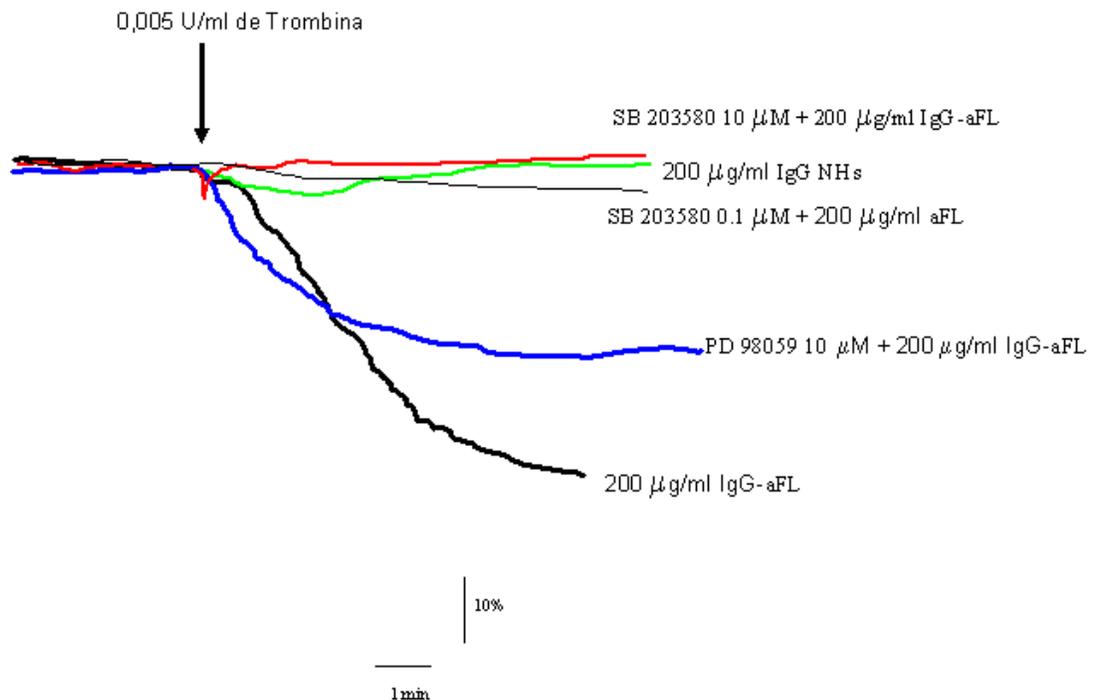


Figura 22. Efectos de inhibidores específicos de p38MAPK y de ERK1/ERK2 sobre el incremento de la agregación mediada por los aFLs.

2.4.- Efectos de los aFLs sobre la fosforilación de FLA2c

El tratamiento de plaquetas lavadas con 1 U/ml de trombina induce una fuerte fosforilación de FLA2c (FLA2c-F) luego de dos minutos de incubación (Figura 23). Cuatro de los cinco fragmentos F(ab')₂aFL inducen una fosforilación significativa de FLA2c en plaquetas previamente tratadas con 0,005 U/ml de trombina.

En ninguna de las muestras incubadas con F(ab')₂SHN (control) o BFS y tratadas con 0.005 U/ml de trombina se observa fosforilación de FLA2c.

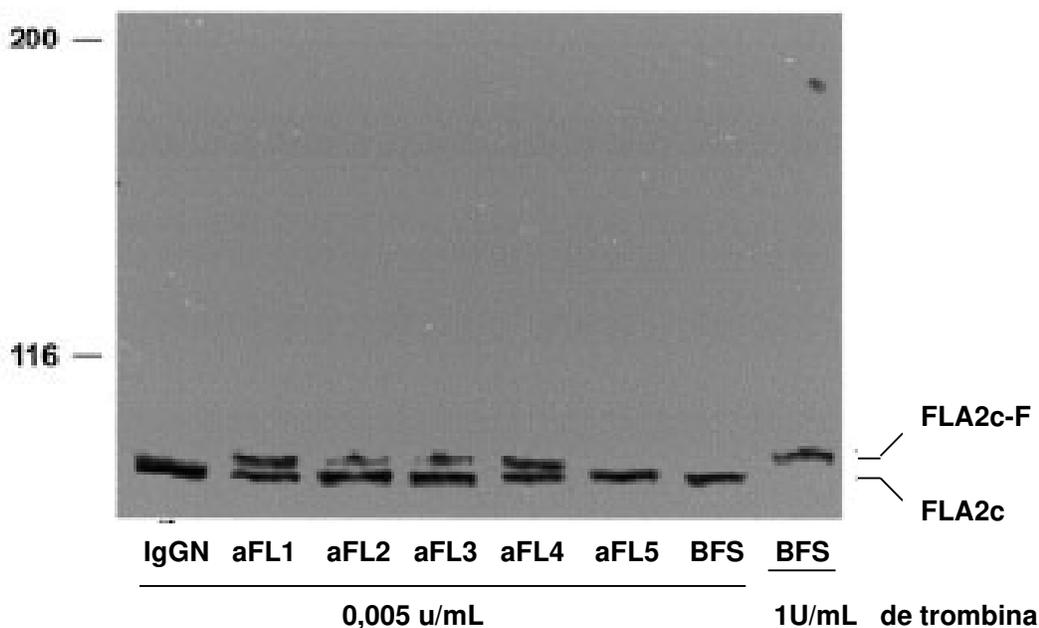


Figura 23. Efecto de los aFL sobre la fosforilación de FLA2c. Las plaquetas purificadas fueron incubadas con los siguientes fragmentos : IgGN: F(ab')₂SHN (control); aFL1: F(ab')₂aFL1; aFL2: F(ab')₂aFL2; aFL3: F(ab')₂aFL3; aFL4: F(ab')₂aFL4; aFL5: F(ab')₂aFL5 y luego estimuladas con trombina (0.005 u/ml concentración final) o fueron incubadas con BFS 5 min y estimuladas con trombina (0.005 o 1 U/ml concentración final). Los lisados fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal de conejo anti-FLA2 y sometidos a electroforesis SDS-PAGE. La forma fosforilada de la FLA2 aparece como una banda de mayor peso molecular FLA2c-F, mientras que la banda no fosforilada de la FLA2 migra más rápido en el gel FLA2c.

2.5.- Efectos de los anticuerpos aFL sobre la producción de TXB₂

La producción de TXB₂ aumentó significativamente en plaquetas tratadas con F(ab')₂IgG-aFL y concentraciones subagregantes de trombina (0.005 U/ml), comparadas con plaquetas tratadas con F(ab')₂ IgG-SHN y trombina (0.005 U/ml), $p < 0.0027$. Los valores medios de TXB₂ producidos por plaquetas tratadas con BFS y trombina (0.005 U/ml) no tuvieron diferencia estadísticamente significativa respecto de las plaquetas tratadas con F(ab')₂ IgG-SHN y trombina (0,005 U/mL) (Tabla 6). Los efectos de F(ab')₂IgG-aFL sobre la producción de TXB₂ fueron completamente inhibidos por el pretratamiento de las plaquetas con 1 μM de SB203580 (280.3 ± 57.0 pg/ml), indicando que la activación de p38MAPK está involucrada en la producción plaquetaria de TXB₂ mediada por los anticuerpos aFL.

Tabla 6. Efectos de los fragmentos F(ab')₂ aFL sobre la producción de TXB₂ en plaquetas.

| Tratamiento | Producción de TXB ₂ (pg/ml) Media ± DE |
|---|--|
| 0.005 U/ml de trombina | 230.0 ± 12,5 |
| F(ab') ₂ IgG-SHN + 0.005 U/ml de trombina | 251.0 ± 12,7 |
| F(ab') ₂ aFL + 0.005 U/ml de trombina | 535.0 ± 50,9* |
| F(ab') ₂ aFL + 0.005 U/ml de trombina + 1 μM SB203580 | 280.3 ± 57.0 (NS) ** |

Las plaquetas fueron tratadas con 0.005 U/mL de trombina y con F(ab')₂IgG-aFL (n=5) o F(ab')₂ IgG-SHN (n=5), y se midió el TXB₂ por un método de ELISA como se describió en el capítulo de Materiales y Métodos. En algunos experimentos las plaquetas fueron pretratadas con 1 μM de SB203580. Los valores representan la media ± DE pg/ml de TXB₂, de 4 experimentos diferentes.

* $p < 0,0027$ respecto a las plaquetas tratadas con F(ab')₂ IgG-SHN y trombina (0.005 U/ml)

** p no significativa (**NS**) respecto a plaquetas tratadas con F(ab')₂ IgG-SHN y trombina (0.005 U/ml).

2.6.- Efectos de los anticuerpos aFLs en la movilización de Calcio intraplaquetario

El tratamiento de plaquetas con diferentes concentraciones de trombina (0.01, 0.1, 1 y 5 U/ml de trombina) produce un aumento significativo del Calcio intracelular en forma dosis dependiente con un pico entre los 2-3 minutos luego de la estimulación (relación G/R: 2.1, 2.8, 3.2 y 5.7; respectivamente). Cuando las plaquetas fueron incubadas con $F(ab')_2$ IgGaFL, $F(ab')_2$ IgGSHN ó BFS y estimuladas con 0.01 U/ml de trombina no obtuvimos diferencias en el incremento de Calcio intracelular (La relación G/R medida a los 3 minutos fue de 2.22; 2.10 y 2.20 respectivamente) como se observa en la Figura 24.

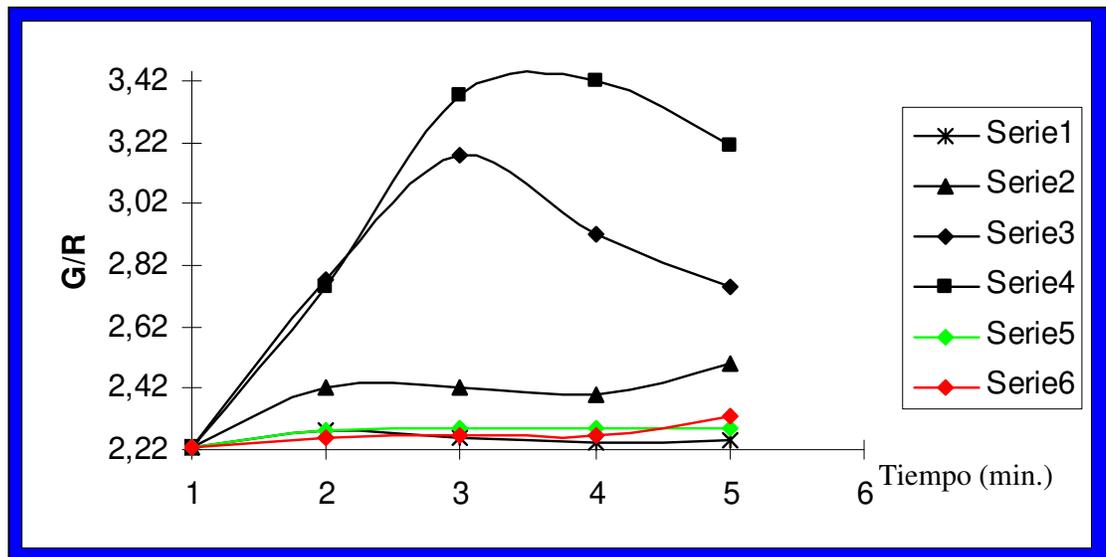


Figura 24. Efecto de los aFLs sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en plaquetas lavadas e incubadas con (200 μ g/ml) de $F(ab')_2$ SHN o $F(ab')_2$ aFL (n=5) durante 5 min. y estimuladas con 0.01 U/ml de trombina. Los cambios en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ fueron evaluados en base al ratio de la intensidad de señal G/R: \blacksquare = 1 U/ml Trombina; \blacklozenge = 0.5 U/ml Trombina; \blacktriangle = 0.1 U/ml Trombina; \ast = 0.01 U/ml Trombina; \blacklozenge = $F(ab')_2$ IgGSHN; \blacklozenge = $F(ab')_2$ aFL.

3.- Estudios en las células endoteliales

3.1.- Resultados de la expresión antigénica del FT en células

HUVECs incubadas con IgG aFL o IgG SHN

Al analizar los niveles del FT antigénico expresados sobre la superficie de las células HUVECs utilizando la técnica de ELISA se observó un incremento estadísticamente significativo en la expresión del FT en las células que fueron incubadas con las ocho IgGs aFL, comparado con las células incubadas con IgG SHN. También se observó un importante aumento de la expresión del FT en células incubadas con los controles de estimulación (PMA y LPS). Por otro lado la incubación de las HUVECs con las cuatro IgGs SHN no tuvo diferencia estadísticamente significativa en los niveles del FT antigénico, comparadas con las células incubadas con medio de cultivo solo (Figura 25).

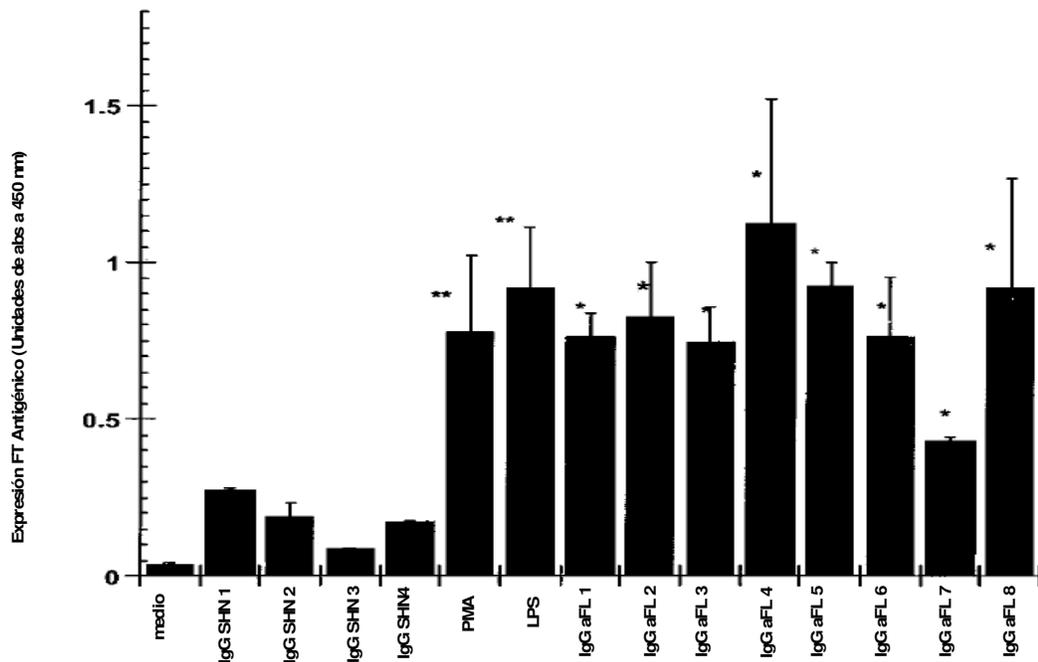


Figura 25. Efecto de los aFL sobre la expresión de FT antigénico en las células HUVECs. Las células HUVECs fueron tratadas con 200 µg/ml de IgG aFL (muestras 1-8), 200 µg/ml de IgG SHN (muestras 1-4), 100 nM PMA, 500 ng/ml de LPS o medio de cultivo solo. Los valores representan la media ± DE de unidades de abs, de 3 experimentos diferentes.

* Diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.004$) de las ocho IgG aFL respecto del valor obtenido con la IgG SHN1. ** Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) de las células tratadas con PMA o LPS respecto de células tratadas con medio de cultivo.

3.2.- Efecto de diferentes inhibidores sobre la expresión del FT inducida por los aFLs sobre las células HUVECs

Como puede observarse en la tabla 7, la incubación de células HUVECs con el inhibidor específico de NF- κ B (MG132) produjo la inhibición del 10.2 al 98 % de la expresión antigénica del FT sobre la superficie celular, cuando fueron incubadas con 3 diferentes IgG aFL respecto a células HUVECs incubadas con IgG aFL.

La incubación de células HUVECs con el inhibidor específico de la p38MAPK (SB203580) produjo la inhibición del 48.9 al 96.8 % de la expresión de FT inducido por tres diferentes IgG aFL.

Estos experimentos indican que tanto la translocación de NF- κ B como también la fosforilación de p38 son parte de la transducción de señales intracelulares en las CE, que están involucradas en la expresión del FT, mediada por los IgG aFLs.

Tabla 7. Efecto de diferentes inhibidores sobre la expresión de FT inducida por los aFLs sobre las células HUVECs

| Muestra | % de inhibición de la expresión del FT sobre las células HUVECs* | |
|-----------|--|----------------|
| | MG132 | SB203580 |
| IgG aFL 1 | 10.2 \pm 3.4 | 48.9 \pm 5.9 |
| IgG aFL 2 | 20.9 \pm 4.5 | 75.0 \pm 7.8 |
| IgG aFL 3 | 98.0 \pm 2.0 | 96.8 \pm 3.4 |

* El FT se determinó por el método de ELISA como se describió en el Capítulo de Materiales y Métodos. Los valores representan la media \pm DE de 3 experimentos diferentes utilizando IgGs aFL purificadas del suero de 3 pacientes diferentes.

3.3.- Efecto de los aFLs sobre la expresión del FT funcional en las células HUVECs

El tratamiento de las células HUVECs con PMA produjo un incremento significativo de la expresión de FT funcional (9.3 veces) comparado con las células incubadas con medio de cultivo (Figura 26A).

Al analizar los resultados obtenidos en las células HUVECs incubadas con las IgGs purificadas, se observó un importante incremento en la expresión del FT funcional con cinco de las seis preparaciones de IgG aFL comparadas con las células tratadas con IgG SHN (1.4 -3.8 veces de incremento), mientras que las células tratadas con IgG SHN no tuvieron un efecto significativo sobre la expresión del FT funcional comparado con las células tratadas con medio de cultivo (Figura 26A).

El efecto de las IgG aFLs sobre la expresión del FT funcional dependió de la concentración de IgG aFL agregada a las células (Figura 26B).

26A

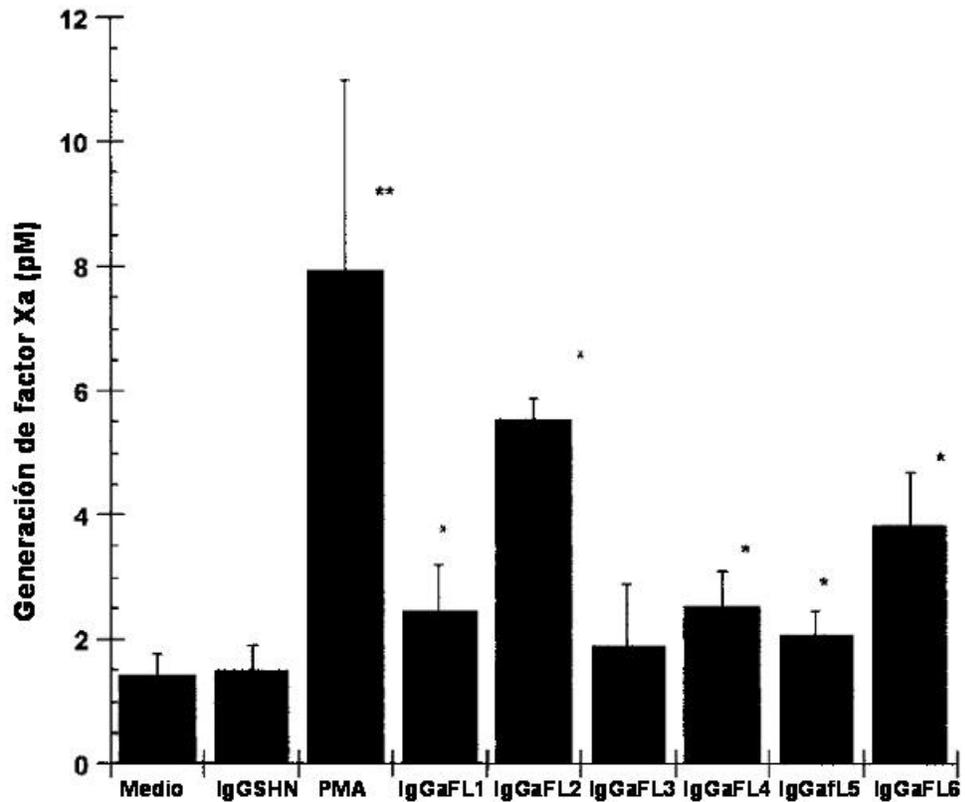


Figura 26 A. Efecto de los aFL sobre la expresión de FT funcional en las HUVECs.

Tratamiento de HUVECs con 200 $\mu\text{g/ml}$ de IgG aFL (muestras 1-6), 200 $\mu\text{g/ml}$ de IgG SHN, 100 nM PMA o medio de cultivo solo.

* Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) respecto de células tratadas con IgG SHN.

** Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) respecto de células tratadas con medio de cultivo.

26B

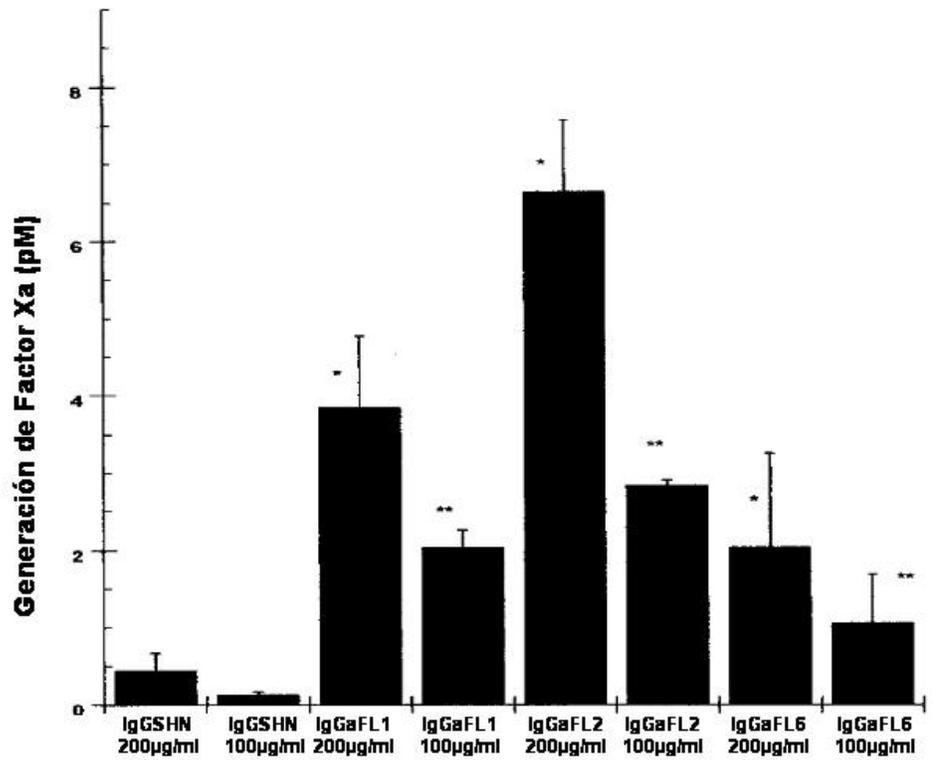


Figura 26 B. Dos diferentes concentraciones (100 y 200 µg/ml) de IgG aFL (Muestras 1,2 y 6) y IgG SHN (muestras 4). Los valores son las medias y DE de 3 determinaciones diferentes.

* Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) respecto de células tratadas con 200 µg/ml de IgG SHN.

** Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) respecto de células tratadas con 100 µg/ml de IgG SHN.

3.4.- Efecto del inhibidor SB203580 sobre el incremento del FT funcional en HUVECs

Cuando las células HUVECs fueron incubadas con 1, 5 ó 10 μM del inhibidor SB203580 de la p38MAPK, se observó una inhibición de la expresión del FT funcional de manera dosis dependiente del inhibidor en aquellas células estimuladas con IgG aFL-2 (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de diferentes concentraciones del inhibidor SB203580 sobre el incremento del FT funcional en células HUVECs incubadas con IgG aFL

| Concentración de SB203580 | % de inhibición del FT funcional sobre las células HUVECs |
|---------------------------|---|
| 1 μM | 22.3 (19.4-25.2) |
| 5 μM | 43.1 (32.6-53.6) |
| 10 μM | 46.2 (30.6-61.8) |

Los resultados están expresados por la media (rango) de 2 experimentos diferentes utilizando IgG aFL purificada de un paciente.

3.5.- Efecto de los aFLs sobre la expresión del ARNm del FT en las HUVECs

Se determinó el RNAm del FT utilizando PCR cuantitativa en tiempo real. Como se muestra en la figura 27, la incubación de las células HUVECs con diferentes IgG aFL (n=6) produjo un incremento de la expresión de RNAm del FT de: 2.1, 5.9, 1.4, 2.3, 14.8 y 15.4 veces de incremento respecto de la concentración de RNAm FT de células HUVECs tratadas con IgGSHN. Los controles positivos que se utilizaron, el PMA y el LPS, produjeron un incremento en la concentración de RNAm de FT de 9.3 y 11.1 veces, respecto de la concentración de RNAm FT de las células HUVECs tratadas con medio de cultivo (Fig. 27).

El incremento en la concentración de RNAm del FT producido por los anticuerpos aFL fue bloqueado de manera dependiente de la dosis en las células que estuvieron pretratadas con 1 μM y 10 μM de SB203580. En la tabla 9 se observa que en las células pretratadas con 1 μM y 10 μM de SB203580 y luego incubadas con las

IgG aFL 1 y 6, se produjo una inhibición de 80.1 y 91.0 %, respectivamente, en la transcripción de RNAm del FT.

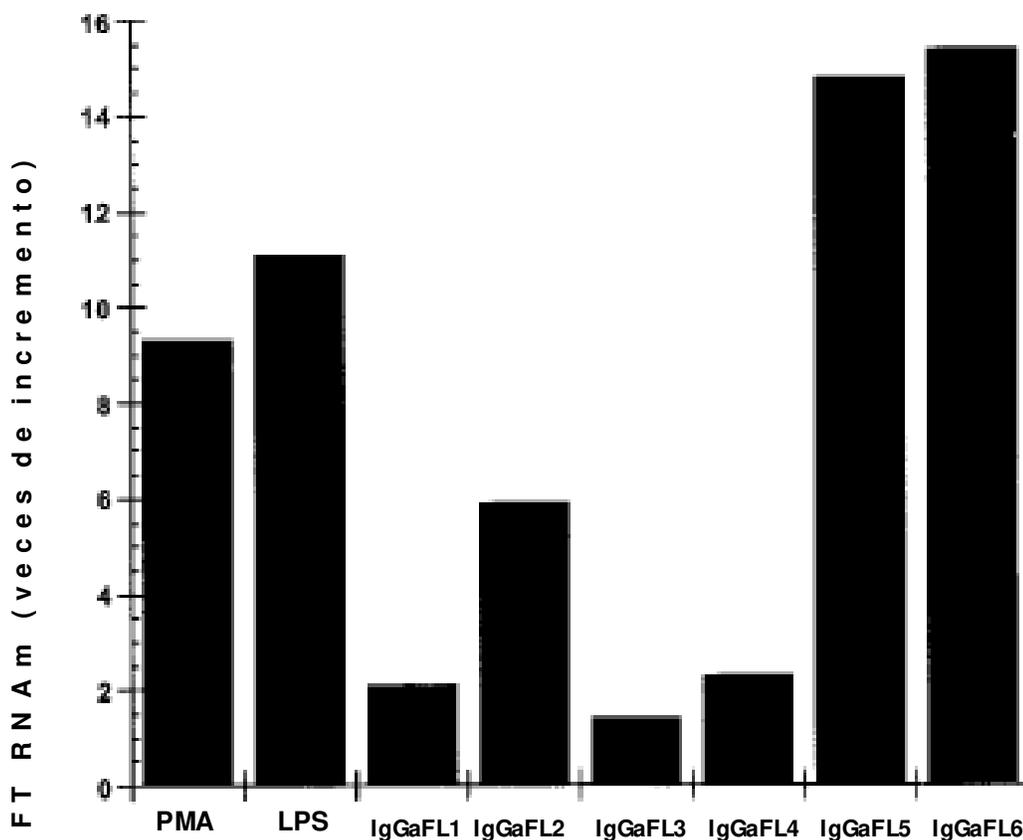


Figura 27. Efecto de diferentes preparaciones de IgG aFL sobre la expresión de RNAm del FT en células HUVECs. Los valores representan la media \pm DE del incremento de RNAm del FT sobre las células tratadas con IgG SHN.

Tabla 9. Efecto de las diferentes concentraciones del inhibidor SB203580 sobre el incremento del RNAm FT en células HUVECs incubadas con IgG aFL.

| Concentración de SB203580 | % de inhibición de RNAm FT sobre las células HUVECs |
|---------------------------|---|
| 1 μ M | 80.1 \pm 12.5 |
| 10 μ M | 91.0 \pm 8.5 |

Los resultados están expresados por la media (rango) \pm DE de 3 experimentos diferentes utilizando IgG aFL purificada de un paciente.

3.6.- Efecto de los aFLs sobre la fosforilación de p38MAPK y la expresión de NOSi en las HUVECs

Al analizar los resultados obtenidos en las células HUVECs incubadas con seis diferentes preparaciones de IgG aFL (n=6), se observó un marcado incremento de la fosforilación de la p38MAPK, que además fue dependiente del tiempo de incubación de las células con los anticuerpos; comenzando a observarse en los inmunoblot a los 30 min. desde el momento de la incubación. A los 120 min. se observó que las células incubadas con el control positivo (LPS) produjeron un incremento de 5.4 veces en la fosforilación de la p38 MAPK, mientras que las IgG aFL produjeron 6.1, 7.3, 9, 5.3, 8.1 y 6 veces comparadas con las células tratadas con IgG SHN. Las dos preparaciones de IgG SHN produjeron una leve fosforilación de la p38MAPK, que se tomó como basal para medir el incremento producido por el control positivo (LPS) y por las diferentes preparaciones de IgG aFL (Figura 28A).

En los experimentos de expresión de NOSi, se determinó que tanto el control positivo como las cuatro preparaciones de IgG aFL, produjeron un incremento significativo de la expresión de NOSi a los 60 min. de incubación, pero no se observó expresión de esta enzima en las células incubadas con IgG SHN (Figura 28B).

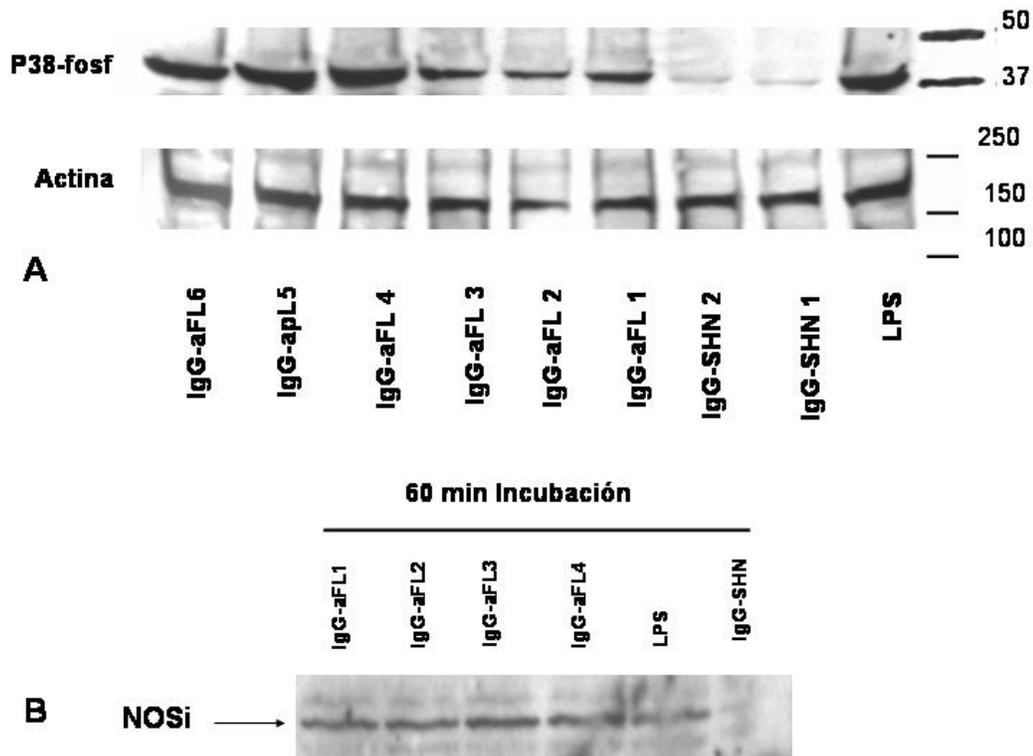


Figura 28. Estudios de western blot donde se observa **A)** el efecto de seis diferentes preparaciones de IgG aFL sobre la fosforilación de p38MAPK comparadas con dos preparaciones de IgG control y **B)** El efecto de los aFLs sobre la expresión de NOSi.

3.7.- Efecto de los aFLs sobre la producción de IL-6 e IL-8 en las HUVECs

En este experimento se utilizaron las preparaciones de IgG aFL 1 y IgG aFL 2. Se observó un incremento significativo en la producción celular de IL-6, cuando las HUVECs se incubaron con LPS o con las dos preparaciones de IgGaFLs respecto a las HUVECs incubadas con medio de cultivo o con IgG SHN. (Figura 29).

Se obtuvo un incremento significativo de la producción de IL-8 cuando las HUVECs se incubaron con LPS o con las dos preparaciones de IgG-aFL, comparado con las HUVECs incubadas con medio de cultivo o IgG SHN (Figura 30).

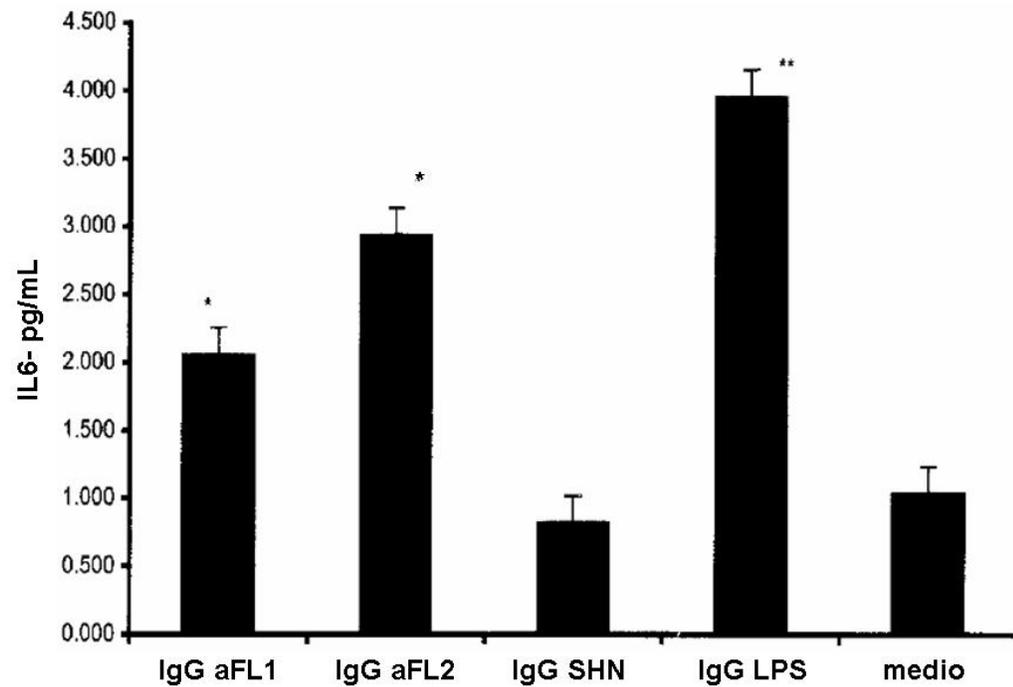


Figura 29. Efectos de los aFLs sobre la producción de IL-6 en las células HUVECs. Las células fueron tratadas con 200 $\mu\text{g/ml}$ de IgG aFL (muestras 1 y 2); 200 $\mu\text{g/ml}$ de IgG SHN (muestra 1); 3 $\mu\text{g/ml}$ de LPS o medio de cultivo solo. Los valores representan la media \pm DE de 3 experimentos diferentes.

* Diferencia estadística significativa respecto a células tratada con IgG SHN.

** Diferencia estadística significativa respecto a células tratadas con medio de cultivo.

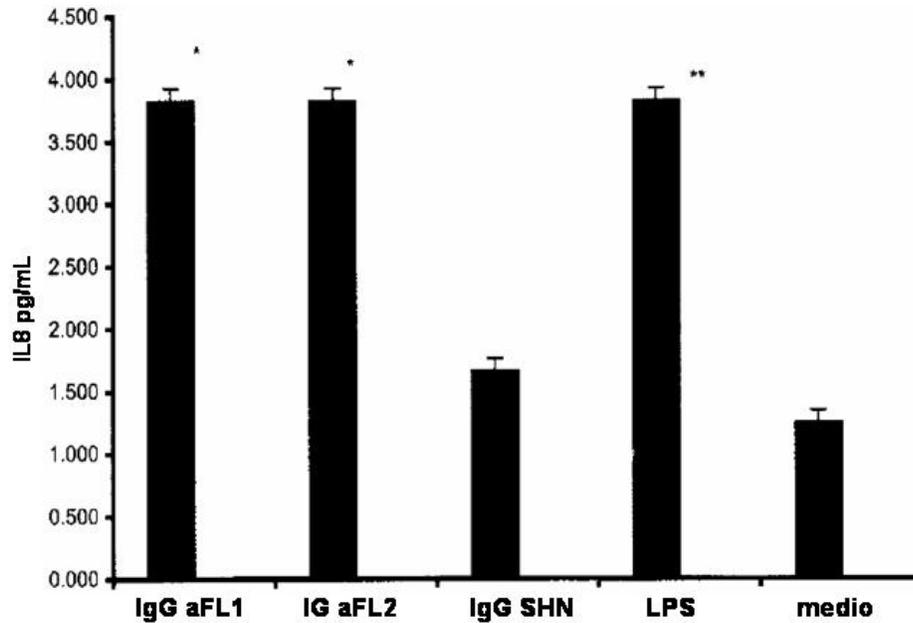


Figura 30. Efectos de los aFLs sobre la producción de IL-8 en las células HUVECs. Las células fueron tratadas con 200 $\mu\text{g/ml}$ de IgG aFL (muestras 1 y 2); 200 $\mu\text{g/ml}$ de IgG SHN (muestra 1); 3 $\mu\text{g/ml}$ de LPS o medio de cultivo solo. Los valores representan la media \pm DE de 3 experimentos diferentes.

* Diferencia estadística significativa respecto a células tratada con IgG SHN.

** Diferencia estadística significativa respecto a células tratadas con medio de cultivo.

3.8.- Estudio de la adhesión de monocitos a CE en presencia de aFLs

Se observó un muy bajo porcentaje de adhesión de monocitos de la línea THP-1 a las células endoteliales HUVECs cuando fueron incubados solamente con medio de cultivo. Luego de 4 hs de exposición de las células HUVECs con las IgGs aFLs se obtuvo un notable incremento del porcentaje de adhesión de los monocitos THP-1 que fué de 5.3 veces respecto de las células HUVECs incubadas con medio de cultivo solo. Como control positivo de la adhesión se incubó a las HUVECs con LPS, lo cual produjo un incremento en la adhesión de los monocitos del 6% al 48%, es decir 7.8 veces de incremento respecto a HUVECs incubadas con medio de cultivo solo, mientras que no se observó diferencia en el porcentaje de adhesión de monocitos a

las HUVECs entre los cultivos incubados con las IgG SHN y aquellos que solo tenían medio de cultivo.

Se produjo una disminución del 34 % en la adhesión de monocitos THP-1 cuando las células HUVECs fueron preincubadas durante 2 hs con el inhibidor SB203580 de p38 MAPK y luego tratadas con IgG aFL durante 4 hs. También la adhesión de monocitos a las células HUVECs se vió disminuída en un 43 % en los cultivos preincubados con el inhibidor SB203580 y estimulados con LPS (Fig. 31).

Asi mismo comprobamos que el DMSO en concentración de 0,008% tal como esta presente en el medio de disolución del inhibidor SB 203580, no afecta la adhesión de monocitos a las HUVECs y no altera la viabilidad de estas células (resultados no mostrados). En otros experimentos observamos tambien que el inhibidor SB203580 produce la disminución de la adhesión de monocitos inducido por las IgG aFL solo si este es incubado durante 2 hs antes de la incubación con los aFLs. Este experimento demuestra que la activación de p38 MAPK está involucrada en el mecanismo de expresión de moléculas de adhesión en las células HUVECs y por lo tanto es una vía de transducción de señales que media el incremento de la adhesión de los monocitos a las CE inducida por los aFLs.

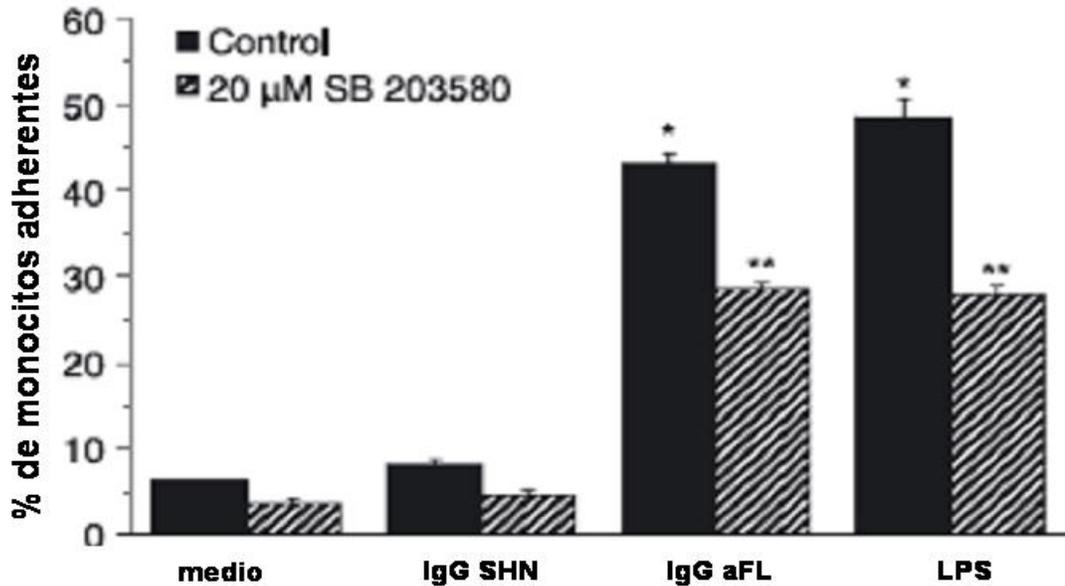


Figura 31. Efectos de la inhibición de la p38 MAPK sobre la adhesión de monocitos a CE inducido por los aFLs. La figura es representativa de 3 experimentos realizados por separado, siendo cada barra la media \pm DE (n = 5) de cada experimento.

* Diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) entre IgG aFL e IgG SHN o entre LPS y medio de cultivo solo.

** Diferencia estadística significativa entre IgG aFLs y IgG aFLs + SB203580 o LPS y LPS + SB203580.

3.9.- Efecto del inhibidor SB203580 sobre el incremento de ICAM-1

mediado por los aFLs en las células HUVECs

La expresión de ICAM-1 en los cultivos de HUVECs se determinó utilizando la técnica de ELISA. Como se muestra en la figura 32, la incubación de las células HUVECs con la IgG aFLs produjo un incremento de la expresión de ICAM-1 de 4.8 veces respecto de la expresión de ICAM-1 en células HUVECs tratadas con IgG SHN. Como control positivo se incubaron las células HUVECs con LPS, el cual produjo un incremento en la concentración de ICAM-1 de 5.5 veces respecto de la expresión de ICAM-1 en células HUVECs tratadas con IgGSHN y de 9.2 veces respecto a las células con medio de cultivo sin inmunoglobulina. No se obtuvo diferencia entre la

expresión de ICAM-1 en células incubadas con IgG SHN o células con medio de cultivo. El nivel de expresión de ICAM-1 en las células HUVECs incubadas con aFL disminuyó en un 25% cuando fueron preincubadas con el inhibidor de la p38 (SB203580) en una concentración de 20 μ M, de la misma forma las células incubadas con este inhibidor y estimuladas con LPS disminuyeron el nivel de expresión de ICAM-1 en un 34.7% comparadas con las que fueron incubadas con LPS solamente.

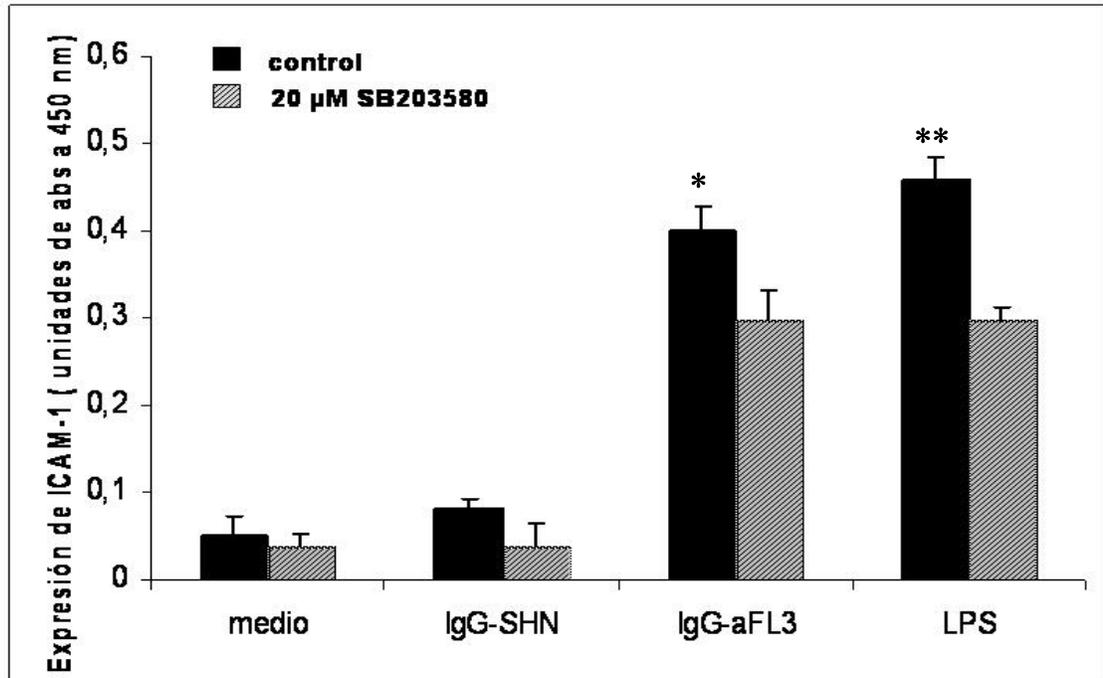


Figura 32. Efectos del inhibidor de la p38 MAPK (SB203580) sobre el incremento en la expresión de ICAM-1 inducido por los aFLs en las CE. Los valores representan la media \pm DE de 3 experimentos diferentes.

* Diferencia estadística significativa ($p < 0.001$) respecto a células tratada con IgG SHN.

** Diferencia estadística significativa ($p < 0.001$) respecto a células tratadas con medio de cultivo.

4.- Estudios “*in vivo*”

4.1.- Estudio de la trombosis y activación endotelial mediada por los aFLs en presencia del inhibidor SB203580

En el suero de los ratones inyectados con IgG-aFL + SB 202474 o con IgG-aFL + SB203580 se hallaron altos títulos de aCL y anti- β_2 GPI que no mostraron diferencia estadística entre los dos grupos. En el suero de los ratones inyectados con IgG-SHN + SB 202474 o con IgG-SHN + SB203580 no se halló actividad de aCL y anti- β_2 GPI como se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Título de anticardiolipinas y anti β_2 Glicoproteína I en el suero de ratones

| Grupo de Ratones | Título aCL (GPL /ml) media \pm DE | Título anti- β_2 GPI (SGU /ml) media \pm DE |
|--------------------|--|--|
| IgG aFL + SB202474 | 169.4 \pm 36.3 | 202 \pm 29.0 |
| IgG aFL + SB203580 | 145.0 \pm 36.0 | 195 \pm 38.0 |
| IgG SHN + SB202474 | < 10 | < 20 |
| IgG SHN + SB203580 | <10 | < 20 |

El valor de corte para el test de aCL fue de 10 unidades fosfolípido IgG (GPL)/ml; el valor de corte para el test de anti- β_2 GPI fue de 20 unidades estandar IgG GPI (SGU)/ml.

El tamaño de los trombos producidos en el grupo de ratones inyectados con IgGaFL + SB202474 fue significativamente mayor que en el grupo de ratones inyectados con IgG-SHN + SB202474. Además los ratones tratados con IgG aFL y el inhibidor de p38MAPK (SB203580), mostraron una disminución del 81% en el tamaño del trombo comparado con los ratones inyectados con IgG aFL y el análogo inactivo (SB202474). El tamaño del trombo producido en los ratones inyectados con IgGSHN + SB202474 no tuvo diferencias estadísticas con el tamaño del trombo producido en los ratones inyectados con IgG SHN + SB203580 o con los ratones inyectados con IgG aFL + SB203580 (Fig 33).

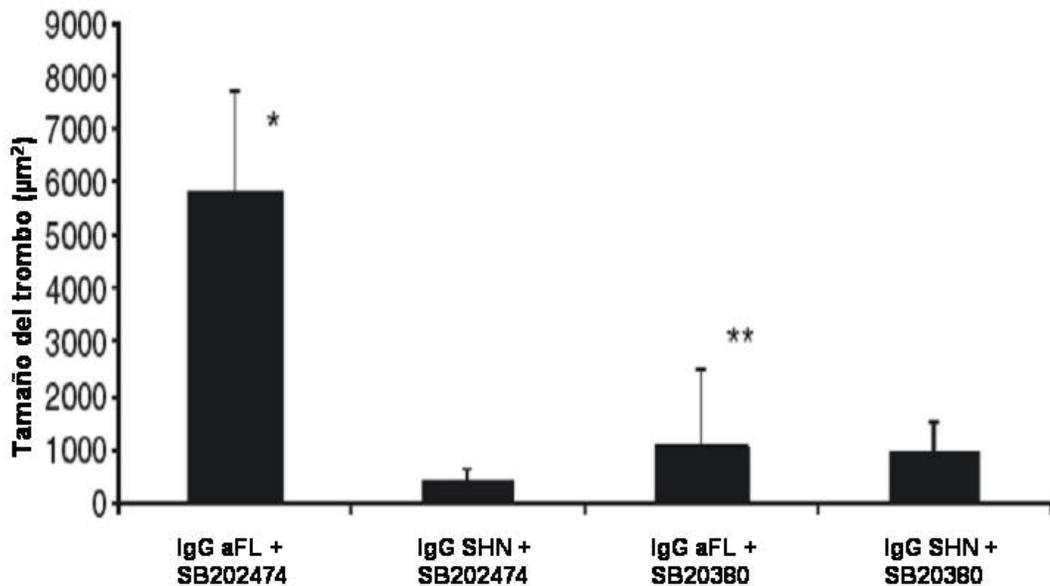


Figura 33. Efectos del inhibidor SB203580 sobre el tamaño del trombo inducido por los aFLs. Ratones CD1 fueron inyectados con IgG aFL + SB202474 o con IgG aFL + SB203580. Como controles se inyectaron con IgG SHN + SB202474 o IgG SHN + SB203580. Las drogas inhibitoras SB 202474 y SB203580 fueron disueltas en una solución de 50 % de dimetil sulfóxido en BFS. En los ratones se midió el tamaño del trombo inducido y los resultados fueron expresados en (μm^2) como la media \pm DE.

*Diferencia estadística significativa respecto al grupo de ratones inyectados con IgG SHN + SB202474.

** Diferencia estadística significativa respecto al grupo de ratones inyectados con IgG aFL + SB202474.

4.2.- Adhesión de los leucocitos a las células endoteliales

La adhesión de los leucocitos a las CE (número de leucocitos adherentes) se midió como un indicador de activación endotelial. Este estudio mostró un aumento estadísticamente significativo de adhesión leucocitaria en el grupo de ratones inyectados con IgG aFL comparado con los ratones inyectados con IgG SHN, mientras que se observa una disminución significativa en los ratones tratados con SB203580 (un 60% de reducción). La adhesión de leucocitos al endotelio no mostró

diferencia significativa entre el grupo de ratones inyectados con IgG aFL + SB203580 comparado con el grupo de ratones tratados con IgG SHN en DMSO:BFS ($P= 0.67$; Fig 34).

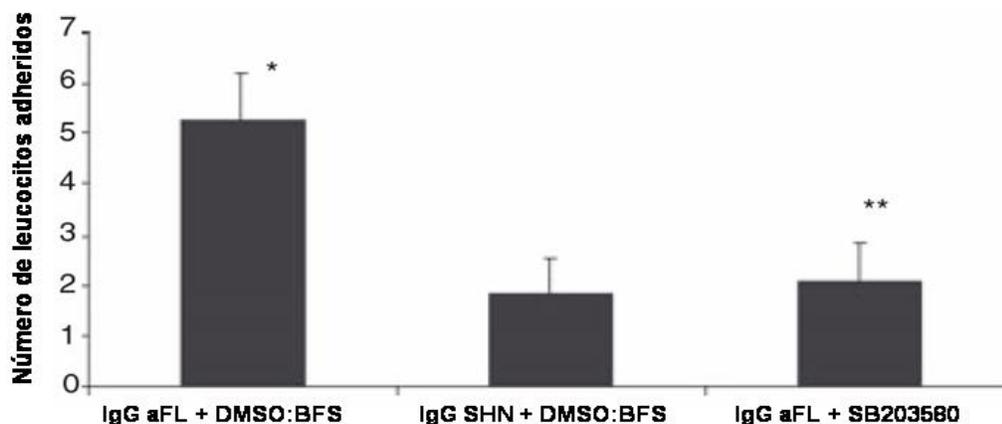


Figura 34. Efectos del inhibidor SB203580 sobre la adhesión de leucocitos al endotelio inducido por los aFLs. Ratones CD1 fueron inyectados con IgG aFL en una solución de DMSO al 50% en BFS (DMSO:BFS) o IgG aFL + SB203580 en (DMSO:BFS), o fueron inyectados con IgG SHN como control en igual solución que los anteriores. El número de leucocitos adheridos se expresó como la media \pm DE.

*Diferencia estadística significativa respecto al grupo de ratones inyectados con IgG SHN + DMSO: BFS.

** Diferencia estadística significativa respecto al grupo de ratones inyectados con IgG aFL + DMSO:BFS

4.3.- Efecto de los aFLs sobre la agregación plaquetaria

Al analizar los datos obtenidos de los estudios de agregación plaquetaria, se observó que las plaquetas aisladas de ratones tratados con IgGaFL mostraron una amplitud en la curva de agregación del 55 % cuando fueron estimuladas con bajas dosis del agonista trombina. Sin embargo, las plaquetas aisladas de ratones tratados con IgG aFL + SB203580, no tuvieron agregación cuando se las estimuló con la misma dosis de agonista que a las anteriores (Fig. 35).

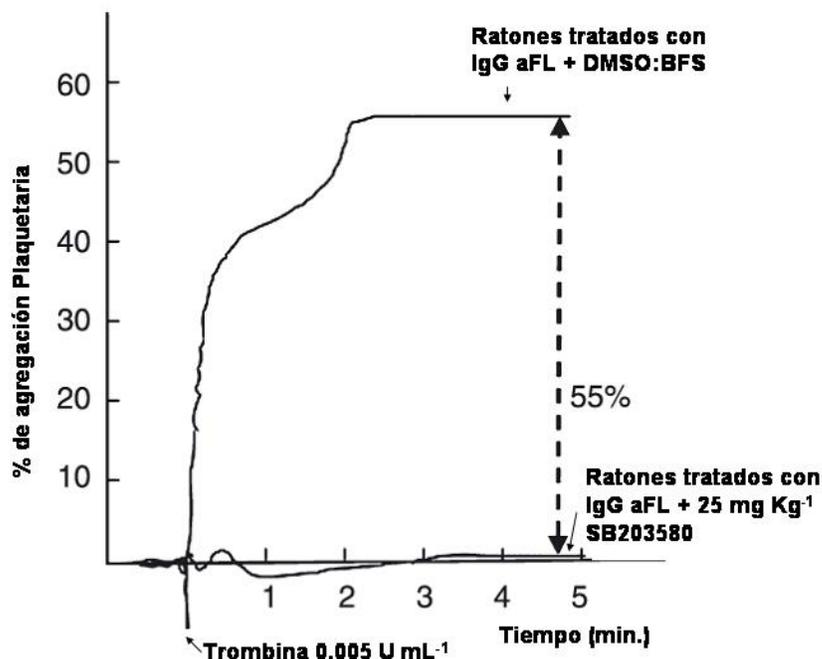


Figura 35. Efectos del inhibidor SB203580 sobre el aumento de la agregación plaquetaria inducida por los aFLs. El plasma rico en plaquetas de ratones fue tratado con IgG aFL + dimetil sulfóxido (DMSO) al 50% en buffer fosfato salino (BFS) o con IgG aFL + SB203580 diluido en DMSO al 50% en BFS, luego fueron estimulados con 0.05 U mL⁻¹ de trombina. La agregación plaquetaria se monitoreó durante 5 min en un agregómetro plaquetario.

4.4.- Actividad del FT en homogenados de arteria carótida y células peritoneales

En estos experimentos se estudió la expresión del FT funcional en homogenados de arteria carótida y en células de peritoneo de ratón inyectados con IgG aFL o con IgG SHN en la presencia de SB203580 o SB 202474. En el grupo de ratones inyectados con IgG aFL + SB202474, se observó un incremento significativo de la expresión de FT funcional en el lisado de células de peritoneo comparado con el grupo de ratones tratados con IgG SHN + SB202474 (media 3.3 vs 0.8 pM mg⁻¹ mL⁻¹) como se observa en la Fig 36 A.

En el grupo de ratones inyectados con IgG aFL + SB202474, se observó un incremento significativo de la expresión del FT funcional en el homogenado de arteria

carótida comparado con el grupo de ratones tratados con IgG SHN + SB202474 (15.3 vs 0.7 pM mg⁻¹ mL⁻¹) como se observa en la Fig 36 B.

Este aumento de la expresión del FT funcional inducido por los IgG aFL que se observó tanto en el lisado de células peritoneales como en el homogenado de arteria carótida disminuyó significativamente por el pretratamiento de los ratones con 25 mg Kg⁻¹ del inhibidor SB203580, como se muestra en las Fig 36 A y 36 B.

Estos datos obtenidos se correlacionan con el incremento de la expresión de FT inducido por los aFL en las CE como se observó en los estudios presentados anteriormente, y que la activación de p38MAPK es un mediador de la vía de activación intracelular estimulada por estos anticuerpos.

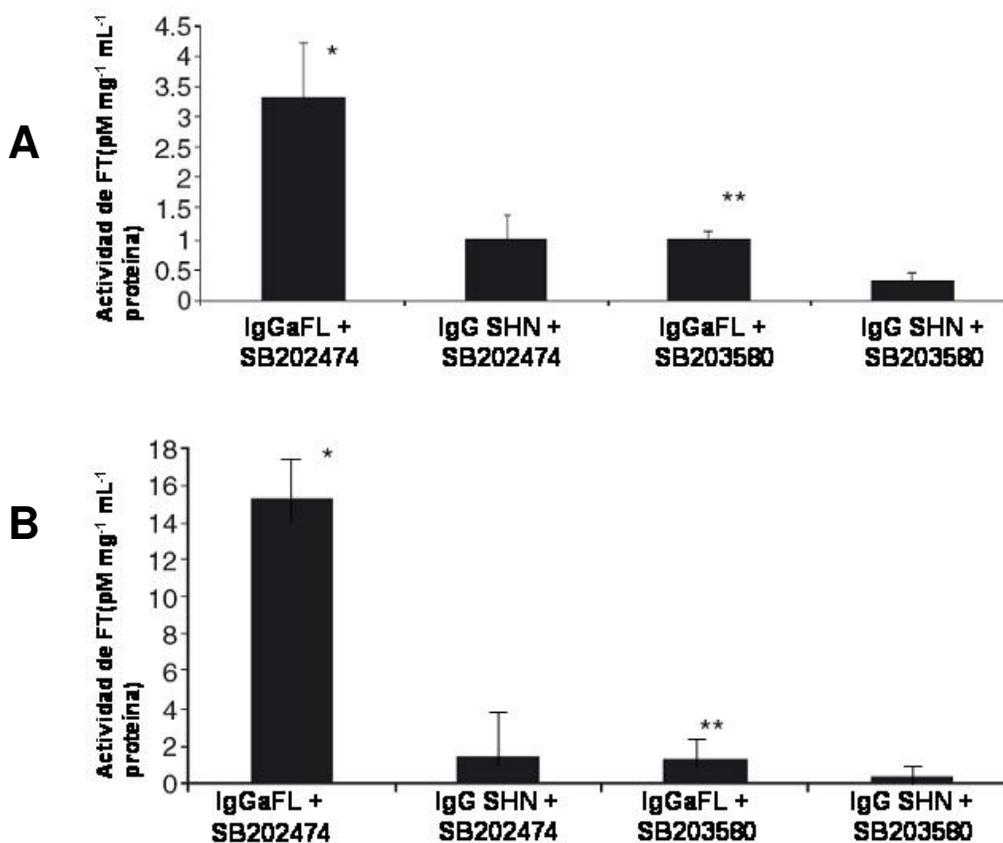


Figura 36. Efectos del inhibidor SB203580 sobre el incremento de la actividad del FT en macrófagos de peritoneo de ratón y en homogenados de arteria carótida de ratón. Los ratones CD1 fueron inyectados con IgG aFL + SB202474 o con IgG aFL + SB203580 o con los controles IgG SHN + SB202474 o IgG SHN + SB203580.

La actividad del FT fue medida en:

A) macrófagos peritoneales; B) Homogenados de arteria carótida de los ratones.

* Diferencia estadística significativa respecto del grupo de ratones inyectados con IgG SHN + SB202474.

** Diferencia estadística significativa respecto del grupo de ratones inyectados con IgG aFL + SB202474.

4.5.- Estudio del efecto del inhibidor de p38MAPK (SB203580)

sobre la expresión de VCAM-1 mediada por los aFLs en

el endotelio de aorta de ratón

El estudio de la expresión de VCAM-1 en preparados de aorta, marcados con el método de inmuno histoquímica de dos pasos que utiliza el bioconjugado quantum dot y un laser con dos fotones de excitación, demostró claramente un incremento significativo de la expresión de VCAM-1 en el endotelio de la aorta torácico descendente de los animales tratados con LPS y con IgG aFL, que fue de 2,4 veces respecto de aquellos ratones tratados con solución salina (Fig 37A). El tratamiento de los ratones con el inhibidor de SB203580, reduce significativamente la intensidad de la fluorescencia de VCAM-1 en las preparaciones de aorta de ratones inyectados con IgG aFL o LPS. No hubo diferencia significativa en la expresión de VCAM-1 en los animales tratados con IgG SHN comparado con aquellos tratados con DMSO:BFS (resultados no mostrados).

En la figura 36B se observa las tinciones de VCAM-1 en los preparados de aorta en los ratones tratados con LPS o IgG aFL.

Aunque la expresión de VCAM-1 fue extremadamente débil en los animales inyectados con solución salina, en estas preparaciones de aorta se confirmó la presencia de células pues se observa tinción nuclear (Fig 37B).

Estos datos se correlacionan con el incremento de VCAM-1 inducidos por los aFL obtenidos en los experimentos con CE, y también se correlacionan con el incremento de la adhesión leucocitaria mediada por estos anticuerpos en los estudios *in vivo* presentados anteriormente. Se confirma además que la activación de p38MAPK es un importante mediador intracelular de la expresión de VCAM-1, ya que disminuye notablemente en presencia del inhibidor SB203580.

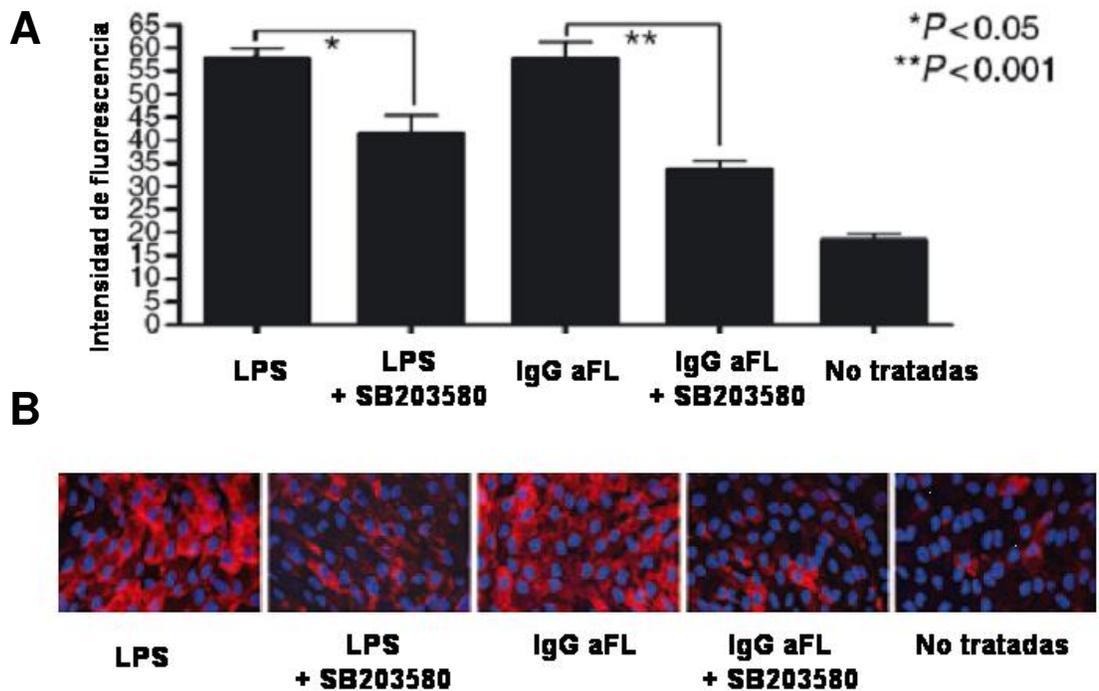


Figura 37. Los efectos del inhibidor de la p38 MAPK (SB203580) sobre la expresión de VCAM-1 en preparados de aorta, marcados con el método de inmuno histoquímica de dos pasos que utiliza el bioconjugado quantum dot y un láser con dos fotones de excitación.

A) Se muestra la expresión cuantitativa de VCAM-1 en unidades de intensidad de fluorescencia (como la media \pm DE de 10 imágenes/ratón siendo 2 ratones por cada grupo)

B) Imágenes representativas de la expresión de VCAM-1 de diferentes grupos tratados.

* Diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) respecto del grupo de ratones tratados con LPS + SB203580.

** Diferencia estadística significativa ($P \leq 0.001$) respecto del grupo tratado con IgG aFL + SB203580.

Conclusiones

1.- Estudios en Plaquetas

En este trabajo de tesis se demostró, en relación a los estudios efectuados en plaquetas, que los aFLs:

- ❖ Producen de manera dosis dependiente y mediado por la porción F(ab), un incremento significativo en la fosforilación de p38MAPK cuando las plaquetas son estimuladas con dosis subagregatorias de trombina.
- ❖ Incrementan la agregación plaquetaria, efecto que es completamente inhibido mediante el pretratamiento de las plaquetas con el inhibidor específico de p38MAPK (SB203580).
- ❖ Originan la fosforilación de la FLA2c.
- ❖ Incrementan la producción de TXB₂, lo cual es completamente abolido por el tratamiento con el inhibidor específico de p38MAPK, confirmando que esta quinasa se encuentra en un paso inicial de la cascada de transducción de señales intracelulares estimulada por estos anticuerpos.
- ❖ No producen incremento en la concentración del Calcio intracelular.
- ❖ No inducen la fosforilación de ERK1/ERK2 a bajas dosis de trombina. Además el pretratamiento de plaquetas con el inhibidor específico de ERK1/ERK2 (PD 98059) inhibe parcialmente el incremento de la agregación mediada por aFLs.

2.- Estudios en células endoteliales

En relación a los estudios efectuados en CE, se demostró que los aFLs:

- ❖ Inducen la producción de RNAm del factor FT lo que se traduce en un aumento de la expresión de este factor activo en la superficie de estas células.
- ❖ Incrementan la expresión del FT activo al estimular la activación de la vía de traducción de señales de la p38MAPK, debido que este incremento es inhibido por la incubación de estas células con el inhibidor específico de p38MAPK (SB203580).
- ❖ Estimulan la fosforilación de la p38MAPK, que es dependiente del tiempo de incubación de las células con los anticuerpos; comenzando a observarse en los inmunoblot después de 30 minutos de incubación.
- ❖ Producen un aumento en: la adhesión de monocitos a las CE y en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en las mismas, efectos que son disminuidos mediante la preincubación con el inhibidor de p38 MAPK (SB203580).
- ❖ Incrementan significativamente la producción de dos citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8.
- ❖ Inducen la expresión de la enzima NOSi en las CE.
- ❖ Generan un aumento del FT al estimular la activación de la vía de transducción de señales que involucran la activación de NF- κ B

3.- Estudios “*in vivo*”

Empleando un modelo animal de síndrome antifosfolípido se demostró que:

- ❖ Los ratones inyectados con IgGaFL + SB202474 generaron un tamaño de trombo significativamente mayor que aquellos ratones inyectados con IgG SHN + SB202474.
- ❖ El tamaño del trombo disminuyó cuando los ratones inyectados con IgGaFL fueron tratados con el inhibidor de p38 (SB203580).
- ❖ En el grupo de ratones inyectados con IgG aFL + SB202474 comparado con el grupo de ratones tratados con IgG SHN + SB202474 se producía un incremento significativo de la expresión del FT funcional en el lisado de células de peritoneo y en el homogenado de arteria carótida. Este efecto disminuyó significativamente por el pretratamiento de los animales con el inhibidor SB203580.
- ❖ Hubo un aumento estadísticamente significativo de adhesión leucocitaria a la pared de las vénulas post capilares del músculo cremaster en el grupo de ratones inyectados con IgG aFL comparado con aquellos inyectados con IgG SHN. Este efecto proinflamatorio inducido por los aFLs disminuyó significativamente cuando los animales fueron tratados con el inhibidor de p38MAPK.
- ❖ Se produce un incremento significativo de la expresión de VCAM-1 en el endotelio aórtico de los animales tratados con IgG aFL, respecto de aquellos

tratados con solución salina. El incremento de esta molécula de adhesión se reduce significativamente mediante el tratamiento de los ratones con el inhibidor de SB203580.

- ❖ Hubo completa inhibición de la agregación plaquetaria en aquellos ratones tratados con IgG aFL y el inhibidor de p38MAPK.

- ❖ La inhibición de la p38MAPK mediante el uso de compuestos piridinilimidazol, como por ejemplo el SB203580 reduce los efectos protrombóticos y proinflamatorios mediado por los aFL sobre la activación plaquetaria, monocitos y de las células endoteliales tanto "*in vitro*" como "*in vivo*".

**Referencias
Bibliográficas**

1. Monroe DM, Hoffman M. What Does It Take to Make the Perfect Clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:41-48.
2. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85:958 -65.
3. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 2003; 16:17-20.
4. Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 2004; 11:272-7.
5. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:6934-8.
6. 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; 383:73-5.
7. 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 USA* 1996; 93:6258-63.
8. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989; 28: 1755-62.
9. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 136-9.
10. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004; 104: 3190 -7.
11. Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M et al. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 2005; 105: 192-8.
12. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 456 - 61.
13. Le DT, Rapaport SI, Rao LV. Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *J Biol Chem* 1992; 267: 15447-54.
14. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13932 – 7.

15. Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ruf W, Hogg PJ. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry* 2006; 45: 12020-8.
16. Versteeg HH, Ruf W. Tissue factor coagulant function is enhanced by protein-disulfide isomerase independent of oxidoreductase activity. *J Biol Chem* 2007; 282: 25416-24.
17. Reinhardt C, von Bruhl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 2008; 118: 1110-22.
18. Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U. Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 25032 -9.
19. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost* 1997; 78: 747-54.
20. Mechtcheriakova D, Schabbauer G, Lucerna M, Clauss M, De Martin R, Binder BR et al. Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF-alpha signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *Faseb J* 2001; 15: 230 -42.
21. Crossman DC, Carr DP, Tuddenham EG, Pearson JD, McVey JH. The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J Biol Chem* 1990; 265: 9782 -7.
22. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg*. 2009; 108:1447-52.
23. Furie B., Furie B.C. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med* 2008; 359:938-49.
24. Adams RL, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* 2009; 14: 462-70.
25. Reininger AJ. Function of von willebrand factor in haemostasis and trombosis. *Haemophilia* 2008; 14 (suppl. 5): 11-26.
26. [http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education discussion/molecule of the month/pdb75_2.html](http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education%20discussion/molecule%20of%20the%20month/pdb75_2.html).
27. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circ Res* 2007; 100:158-73.

28. Engelhardt B, Wolburg H. Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2955-63.
29. Muller WA. Endothelial signalling events during leukocyte Transmigration. *Circ Res* 2009; 105:223-30.
30. Hordijk PL. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *FEBS Journal* 2006; 273:4408-15.
31. Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosniera O. Activated protein C. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5 (Suppl. 1): 73–80.
32. Weitz JI, Hirsh J. new anticoagulant drugs, *chest* 2001; 119: 95-107.
33. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci* 2005; 10: 1754–62.
34. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 959-72.
35. Han X, Fiehler RW, Broze GJ. Characterization of the proteina Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000; 96: 3049-55.
36. Bayston TA, Lane DA. Antithrombin: molecular basis of deficiency. *Thromb Haemost* 1997; 78:39-43.
37. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129: 307–21.
38. Loskutoff DJ, Quigley JP. PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix. *J Clin Invest* 2000; 106: 1441–3.
39. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2003 Oct;1(10):2112-8.
40. Freedman JE, Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost.* 2003 Jun;1(6):1183-8.
41. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J.* 2009; 73:595-601.
42. Iñiguez MA, Cacheiro-Llaguno C, Cuesta N, Díaz-Muñoz MD, Fresno M Prostanoid function and cardiovascular disease. *Arch Physiol Biochem.* 2008; 114:201-9.
43. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ et al. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost.* 2005; 31:234-46.

44. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:403-12.
45. Kerstin Jurk K, Kehrel B. Platelets Physiology and Biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2005; 31:381-92.
46. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX complex: Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21: 130–6.
47. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009; 94:700-11.
48. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1602–12.
49. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* 2008; 112: 3555-62.
50. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 17–20.
51. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto. Basic Principles of Platelet Biology and Clinical Implications. *Circ J* 2010; 74:597-607.
52. Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Berndt MC. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1745–51.
53. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 200–5.
54. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; 104:1606-15.
55. Gawaz M, Langer H, May A. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2006; 115:3378-84.
56. Brass LF, Hoxie JA, Manning DR. Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993; 70: 217-23.
57. Brass LF. More pieces of the platelet activation puzzle slide into place. *J Clin Invest* 1999; 104: 1663-5.
58. Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost* 1995; 74: 111–6.
59. Lévy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis* 1999; 29(1):4-15.
60. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.* 2004; 114:221-33.

61. Shaun PJ The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109:5087-95.
62. Aird WC. Vascular bed-specific thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007;5 (Suppl 1):283-91.
63. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 2008; 61: 122–31.
64. Harris EN. Annotation: antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990; 74:1-9.
65. Shoenfeld Y. Systemic antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2003; 12:497-8.
66. Godfrey T, D’Cruz D. Antiphospholipid Syndrome: General Features. En: khamashta, M. A. ed. *Hughes syndrome: Antiphospholipid Syndrome*; 2000:8-19.
67. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7); 1309-11.
68. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHW, De Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4: 295–306.
69. Bengtsson AA, Sturfelt G, Gullstrand B, Truedsson L. Induction of apoptosis in monocytes and lymphocytes by serum from patients with systemic lupus erythematosus – an additional mechanism to increased autoantigen load? *Clinical & Experimental Immunology* 2004; 135(3):535–43.
70. Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y, et al. Binding of beta 2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. *Blood* 2005; 105(4):1552–7.
71. Blank M, Asherson RA, Cervera R, Shoenfeld Y. Antiphospholipid syndrome infectious origin. *J Clin Immunol*. 2004; 24(1):12-23.
72. Gharavi AE, Pierangeli SS, Harris EN. Viral origin of antiphospholipid antibodies: endothelial cell activation and thrombus enhancement by CMV peptide-induced APL antibodies. *Immunobiology*. 2003; 207(1):37-42.
73. Robertson B, Greaves M. Antiphospholipid syndrome: An evolving story. *Blood Reviews* (2006) 20, 201–12.

- 74.** De Groot PG, Derksen R.H.W.M., de Laat B. Twenty-two Years of Failure to Set Up Undisputed Assays to Detect Patients with the Antiphospholipid Syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008; 34:347-55.
- 75.** Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol* 1987; 26:324–6.
- 76.** Conley CL, Hartmann RC. A haemorrhage disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Lab Clin Invest* 1952; 31: 621–2.
- 77.** Bowie EJW, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med* 1963; 62: 416–30.
- 78.** Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; ii: 1211–4.
- 79.** Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 1–6.
- 80.** Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-7.
- 81.** McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: b2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4.
- 82.** Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa T, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336:177-8.
- 83.** Oosting JD, Derksen RHWM, Entjes HTI, Bouma BN, de Groot PG. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of b2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1992; 67: 499- 502.
- 84.** Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-32.
- 85.** Amengual O, Atsumi T, Koike T. Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 886-95.
- 86.** Bas de Laat H, Derksen RHWM, de Groot PG. b2 glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 2004; 112: 161-8.

- 87.** Vermeylen J, Hoylaerts MF, Arnout J. Antibody-mediated thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 420-6.
- 88.** Forastiero R, Martinuzzo ME. Antigen Specificity and Clinical Relevance of Antiphospholipid Syndrome-Related Autoantibodies. *Current Rheumatology Rev* 2005; 1: 177-87
- 89.** Shoenfeld Y, Twig G, Katz U, Sherer Y. Autoantibody explosion in antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2008; 30:74-83.
- 90.** Chen XX, Gu YY, Li SJ, et al. Some plasmin-induced antibodies bind to cardiolipin, display lupus anticoagulant activity and induce fetal loss in mice. *J Immunol* 2007; 178:5351-6.
- 91.** Cesarman-Maus G, Rios-Luna NP, Deora AB, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin A2, in antiphospholipid syndrome. *Blood* 2006; 107:4375- 82.
- 92.** Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007; 109:422-30.
- 93.** Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 349-60.
- 94.** Harris EN, Asherson RA, Gharavi AE, Morgan SH, Derue G, Hughes GRV. Thrombocytopenia in SLE and related autoimmune disorders: association with anticardiolipin antibody. *Br J Haematol* 1985; 59:227-30.
- 95.** Harris EN, Gharavi AE, Hedge U, et al. Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1985; 59:231-234.
- 96.** Khamashta MA, Harris EN, Gharavi AE, Derue G, Gil A, Vazquez JJ, et al. Immune mediated mechanism for thrombosis: antiphospholipid antibody binding to platelet membranes. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 849-54.
- 97.** Haga HJ, Christopoulos C, Machin SJ, Khamashta M, Hughes GR. Lack of specific binding of anticardiolipin antibodies to intact platelets. *Lupus.* 1992; 1:387-90.
- 98.** Hasselaar P, Derksen RHW, Blokzijl L, deGroot PG. Crossreactivity of antibodies directed against cardiolipin, DNA, endothelial cells and blood platelets. *Thromb Haemost.* 1990; 63: 169-73.
- 99.** Shechter Y, Tal Y, Greenberg A, Brenner B. Platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood Coag Fibrinol* 1998; 9:653-7.
- 100.** Out HJ, deGroot PG, van Vliet M, de Gast GC, Nieuwenhuis HK, Derksen RH. Antibodies to platelets in patients with anti-phospholipids antibodies. *Blood* 1991; 77: 2655-9.

- 101.** Reverter JC, Tassies D, Escolar G, et al. Effect of plasma from patients with primary antiphospholipid syndrome on platelet function in a collagen perfusion system. *Thromb Haemost.* 1995; 73:132-7.
- 102.** Campbell A, Pierangeli SS, Welhausen S, Harris EN. Comparison of the effects of anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome and with syphilis on platelet activation and aggregation. *Thromb haemost* 1995; 73:529-34.
- 103.** Lin YL, Wang CT Lin YL, Wang CT. Activation of human platelets by the rabbit anticardiolipin antibodies. *Blood* 1992;80: 3135-43.
- 104.** Wang L, Su C-y, Chou K-Y, Wang CT. Enhancement of human platelet activation by combination of low concentrations of collagen and rabbit anticardiolipin antibodies. *Br J Haematol* 2002; 118: 1152-62.
- 105.** Galli M, Bevers EM, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Effect of antiphospholipid antibodies on procoagulant activity of activated platelets and platelet-derived microvesicles. *Br J Haematol.* 1993; 83:466-72.
- 106.** Shi W, Chong BH, Chestermen CN. Beta 2-glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus anticoagulants. *Blood.* 1993; 81:1255-62.
- 107.** Vazquez-Mellado J, Llorente L, Richaud-Patin Y, Alarcon-Segovia D. Exposure of anionic phospholipids upon platelet activation permits binding of B2 glycoprotein I and through it that of IgG antiphospholipid antibodies. *Studies in platelets from patients with antiphospholipid syndrome and normal subjects. J. Autoimmunity.* 1994; 7:335-48.
- 108.** Vermeylen J, Hoylaerts MF, Arnout J. Antibody-mediated thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78:420-426.
- 109.** Lutters BC, Derksen RH, Tekelnenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, De Groot PG. Dimers of B2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2. *J Biol Chem* 2003; 278:33831-38.
- 110.** Alarcón-Segovia D, Boffa MC, Branch W, Cervera R, Gharavi A, Khamashta M, Shoenfeld Y, Wilson W and Roubey R. Prophylaxis of the antiphospholipid syndrome: a consensus report. *Lupus* 2003; 12:499-503.
- 111.** Lellouche F, Martinuzzo ME, Said P, Maclouf J, carreras LO. Imbalance of thromboxane/prostacyclin biosynthesis in patients with lupus anticoagulant. *Blood* 1991; 78: 2894-99.

- 112.** Martinuzzo ME, Maclouf J, Carreras LO, Levy-Toledano S. Antiphospholipid antibodies enhance thrombin-induced platelet activation and thromboxane formation. *Thromb Haemost.* 1993; 70: 667-71.
- 113.** Robbins DL, Leung S, Miller-Blair DJ, Ziboth V. Effect of anticardiolipin/B2glycoprotein I complexes on production of thromboxane A2 by platelets from patients with the Antiphospholipid Syndrome. *J Rheumatol* 1998; 25: 51-56.
- 114.** Espinola RG, Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Hydroxichloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2002; 87:518-22.
- 115.** Nosál R, Jancinová V. Cationic amphiphilic drugs and platelet phospholipase A2 (cPLA2). *Thromb Research* 2002; 105:339-45.
- 116.** Nosal R, Jancinová V, Danihelová E. Chloroquine: A multipotent inhibitor of human platelets in vitro. *Thrombosis Research* 2000; 98: 411-421.
- 117.** Arvieux J, Rousell B, Pouzol P, Colomb MG. Platelet activating properties of murine monoclonal antibodies to B2glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1993; 70:336-41.
- 118.** Opara R, Robbins DL, Ziboh VA. Cyclic-AMP agonist inhibits antiphospholipid /B2glycoprotein I induced synthesis of human platelet thromboxane A2 in vitro. *J Rheumatol* 2003; 30:55-59.
- 119.** Van Lummel M, Pennings MT, Derksen RH, Urbanus RT, Lutters BC, Kaldenhoven N, de Groot PG. The binding site in {beta} 2- glycoprotein I for ApoER2 on platelets is located in domain V. *J Biol Chem* 2005; 280: 36729–36.
- 120.** Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, Yu P, Berndt MC, Andrews RK et al. Antibeta2- glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IXV. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2558–67.
- 121.** Pennings MT, Derksen RH, van Lummel M, Adelmeijer J, Vanhoorelbeke K, Urbanus RT et al. Platelet adhesion to dimeric beta2-glycoprotein-I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein Ialpha and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 369-77.
- 122.** Carreras LO, Vermlyen JG. Lupus anticoagulant and thrombosis: possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Haemost* 1982; 48:38-40.
- 123.** Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara P, Borghi MO, Tincani A, et al. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial antibodies III: h2-

glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13:179-86.

124. Del Papa N, Guidali L, Sala A, Buccellati C, Khamashta MA, Ichikawa K, et al. Endothelial cell as target for antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 1997; 40:551-61.

125. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GH, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 1999; 99:1997-2000.

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

127. Simantov R, Lo SK, Gharavi A, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL. Antiphospholipid antibodies activate vascular endothelial cells. *Lupus* 1996; 5:440-1.

128. Meroni PL, Raschi E, Camera M, Testoni C, Nicoletti F, Tincani A, et al. Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15:237-40.

129. Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Hall J, Harris EN, Pierangeli SS. E-selectin mediated pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 843-48.

130. Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, Marin V, Gregoire R, Gatel A, et al. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:55– 64.

131. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104:93– 102.

132. Dunoyer-Geindre S, deMoerloose P, Galve-de Rochemonteiz B, Reber G, Kruihof EKO. NF- κ B is an essential intermediate in the activation of endothelial cells by anti β 2glycoprotein I antibodies. *Thromb Haemost* 2002; 88: 851-57.

133. Lopez-Pedreira C, Buendia P, Cuadrado MJ, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-KappaB/Rel proteins via p38 mitogen activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* 2006; 54:301-11.

- 134.** Simoncini S, Sapet C, Camoin-Jau L, et al. Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the proadhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome. *Int Immunol* 2005; 17: 489-500.
- 135.** Meroni PL, Tincani A, Sepp N, Raschi E, Testoni C, Corsini E, et al. Endothelium and the brain in CNS lupus. *Lupus* 2003; 12:919-28.
- 136.** Rustin MH, Bull HA, Machin SJ, et al. Effects of the lupus anticoagulant in patients with systemic lupus erythematosus in endothelial cell prostacyclin release and procoagulant activity. *J Invest Dermatol* 1988; 90:744-48.
- 137.** Hasselaar P, Derksen RH, Oosting JD, et al. Synergistic effect of low doses of tumour necrosis factor and sera from patients with systemic lupus erythematosus on the expression of procoagulant activity by cultured endothelial cells. *Thromb Haemost* 1989; 62:654-60.
- 138.** Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GRV. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998; 79:276-81.
- 139.** Tannenbaum SH, Finko R, Cines DB. Antibody and immune complexes induce tissue factor production by human endothelial cells. *J Immunol* 1986; 137:1532-37.
- 140.** Jacobsen EM, Sandset PM, Wisloff F. Do antiphospholipid antibodies interfere with tissue factor pathway inhibitor? *Thromb Res* 1999;94:213-20
- 141.** Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of procoagulant microparticles in a patient with myocardial infarction, antiphospholipid antibodies and multifocal cardiac thrombosis. *Thromb J* 2005;3:15
- 142.** Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004; 91:667-73.
- 143.** Branch DW, Rodgers GM. Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of thrombosis. *J Am Obstet Gynecol* 1993; 168:206-10.
- 144.** Quadros NP, Roberts-Thomson PJ, Gallus AS. Sera from patients with systemic lupus erythematosus demonstrate enhanced IgG binding to endothelial cells pretreated with tumour necrosis factor alpha. *Rheumatol Int* 1995; 15:99-105.
- 145.** de Prost D, Ollivier V, Ternisien C, Chollet-Martin S. Increased monocyte procoagulant activity independent of the lupus anticoagulant in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1990; 64:216-21.

- 146.** Kornberg A, Blank M, Kaufman S, et al. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 153:1328-32.
- 147.** Martini F, Farsi A, Gori AM, et al. Antiphospholipid antibodies (aPL) increase the potential monocyte procoagulant activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1996;5:206–211
- 148.** Cuadrado MJ, Lopez-Pedrerera C, Khamashta MA, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome - a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum* 1997;40:834-41
- 149.** Reverter JC, Tassies D, Font J, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1420-27.
- 150.** Dobado-Berrios M, Lopez-Pedrerera C, Velasco F, Aguirre MA, Torres A, Cuadrado MJ. Increased levels of TF mRNA in mononuclear blood cells of patients with primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1999;82: 1578-82
- 151.** Ferro D, Saliola M, Meroni PL, et al. Enhanced monocyte expression of tissue factor by oxidative stress in patients with antiphospholipid antibodies: effect of antioxidant treatment. *J Thromb Haemost* 2003;1:523-31
- 152.** Schved JF, Gris JC, Ollivier V, Wautier JL, Tobelem G, Caen J. Procoagulant activity of endotoxin or tumor necrosis factor activated monocytes is enhanced by IgG from patients with lupus anticoagulant. *J Am Hematol* 1992;41:92-6
- 153.** Zhou H, Wolberg AS, Roubey RAS. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by diltiazem. *Blood* 2004; 104:2353-8.
- 154.** 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; 90:1100-4.
- 155.** Wolberg AS, Roubey RAS. Anti-beta-2 glycoprotein I antibodies do not increase TF activity by de-encryption. *Thromb Res* 2004; 114:67-71.
- 156.** Ma K, Simantov R, Zhang JC, Silverstein R, Hajjar KA, McCrae KR. High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem* 2000; 275: 15541–8.
- 157.** Zhou H, Roubey RAS. Annexin A2 and the upregulation of monocyte tissue factor activity by aPL. *Lupus* 2002; 11: 543 (abstract).

- 158.** Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, Meroni PL. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood* 2003; 10: 3495–500.
- 159.** Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, et al. Toll like receptor 4 is involved in antiphospholipid-mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1327-33
- 160.** Sorice M, Longo A, Capozzi A, et al. Anti-b2glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum* 2007; 56:2687-97.
- 161.** Dong C, Davis RJ, Flavell RA. Map kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:55-72.
- 162.** Hunter T. Signaling and beyond. *Cell* 2000; 100:113-27.
- 163.** Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1:169-78.
- 164.** Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277:1630-5.
- 165.** Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:434-40.
- 166.** Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; 80: 225-36.
- 167.** Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ. Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* 1991; 2:965-78.
- 168.** Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 1997; 9:337-51.
- 169.** Ip YT, Davis RJ. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:205–19.
- 170.** Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* 1997; 16:7054-66.
- 171.** New L, Han J. The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends in Cardiovascular Medicine* 1998;8: 220-8.
- 172.** Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* 1993;268: 25009-14
- 173.** Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 1993; 259: 1760–63.

- 174.** Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch R.J: A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265:808-811
- 175.** Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 1994;78:1039–49.
- 176.** Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares, Zamanillo D et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994; 78:1027–37.
- 177.** Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372:739–46.
- 178.** Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000;12:1–13.
- 179.** Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996;271:17920–6.
- 180.** Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moler NP, Ullrich A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4355–9.
- 181.** Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Comm* 1996;228:334–40.
- 182.** Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:533–8.
- 183.** Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6): comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases, *EMBO J.* 1997; 16: 3563–71.
- 184.** Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M. Activation of stress activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 1997;16: 295–305.
- 185.** Kuma Y, Sabio G, Bain J, Shpiro N, Marquez R, Cuenda A. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2005;280: 19472–79.

- 186.** Eyers PA, Craxton M, Morrice N, Cohen P, Goedert M. Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem. Biol.* 1998; 5: 321–28.
- 187.** Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, Wang Z, Bower MJ, Lee JC, et al. Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 15605–10.
- 188.** Feijoo C, Campbell DG, Jakes R, Goedert M, Cuenda A. Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J. Cell Sci.* 2005; 118: 397–408.
- 189.** Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1997; 409: 57–62.
- 190.** Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M, de Jong N, Lee JC, Foster JF, Sluiter W. p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:44–8.
- 191.** Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 1988;273: 27467–73.
- 192.** Shapiro L, Puren AJ, Barton HA, Novick D, Peskind RL, Shenkar R, et al. Interleukin 18 stimulates HIV type 1 in monocytic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12550–5.
- 193.** Saklatvala J, Rawlinson L, Waller RJ, Sarsfield S, Lee JC, Morton LF, et al. Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem* 1996;271: 6586–9.
- 194.** Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W, Grinstein S. Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J Biol Chem* 1997;272:937–44.
- 195.** El Benna J, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys* 1996;334:395–400.
- 196.** Foltz IN, Lee JC, Young PR, et al. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1997; 272:3296–301.

- 197.** Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* 1997; 7: 353 – 60.
- 198.** Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol. Rev.* 2001; 81: 807–869.
- 199.** Bellon S, Fitzgibbon MJ, Fox T, Hsiao HM, Wilson KP. The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* 1999; 7: 1057–65.
- 200.** Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 1997;90: 859 – 69.
- 201.** Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M. Activation of stressactivated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 1997; 16: 295–305.
- 202.** Cuenda A, Alonso G, Morrice N, Jones M, Meier R, Cohen P, Nebreda AR. Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells, *EMBO J.* 1996;15: 4156–64.
- 203.** Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267 (1995) 682–685.
- 204.** Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogenactivated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 1247–1255.
- 205.** Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, et al. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 2003; 17: 1969–78.
- 206.** Bergmann M, Hart L, Lindsay M, et al. I κ B α degradation and nuclear factor- κ B DNA binding are insufficient for interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α - induced κ B-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *J Biol Chem* 1998;273:6607–10.
- 207.** Nick JA, Avdi NJ, Young SK, et al. Selective activation and functional significance of p38 α mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 1999;103:851–8.
- 208.** Perregaux DG, Dean D, Cronan M, Connelly P, Gabel CA. Inhibition of interleukin-1 β production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence. *Mol Pharmacol.* 1995 Sep;48(3):433-42.

- 209.** Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen- activated protein kinase pathway *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):12901-8.
- 210.** Badger AM, Cook MN, Lark MW, Newman-Tarr TM, Swift BA, Nelson AH, Barone FC, Kumar S. SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J Immunol.* 1998;161(1):467-73.
- 211.** Da Silva J, Pierrat B, Mary JL, Lesslauer W. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes *J Biol Chem.* 1997;272:28373-80.
- 212.** Read MA, Whitley MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis RJ et al. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997; 272:2753-61.
- 213.** Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M, de Jong N, Lee JC, Koster JF et al. p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230:44-8.
- 214.** Goebeler M, Kilian K, Gillitzer R, Kunz M, Yoshimura T, Brocker EB, et al. The MKK6/ p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor-alpha-induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *Blood* 1999;93:857-65.
- 215.** Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol.* 1998;161(7):3225-36.
- 216.** Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, et al. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:1453-61.
- 217.** Kramer RM, Roberts EF, Striffler BA, Johnstone EM. Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem.* 1995;270: 27395 - 98.
- 218.** Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Levy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M. Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood.* 1999;94:3800-05.

- 219.** Papkoff J, Chen RH, Blenis J, Forsman J. p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:463-72.
- 220.** Hackeng CM, Relou IA, Pladet MW, Gorter G, van Rijn HJ, Akkerman JN. Early platelet activation by lipoprotein via p38MAP Kinase. *Throb Haemost* 1999; 82:1749-56.
- 221.** Relou IAM, Gorter G, van Rijn HJM, Akkerman J-W N. Platelet activation by the apo B/E receptor-binding domain of LDL. *Thromb Haemost* 2002; 87:880-87.
- 222.** Buchbeck M, Ghomashchi F, Gelb MH, Watson SP, Borsh-Haubold AG. Stress stimuli increase calcium-induce arachidonic acid release through phosphorylation of cytosolic phospholipase A2. *Biochem J* 1999; 344:359-66.
- 223.** Garcia A, Shankar H, Murugappan S, Kim S, Kunapuli SP. Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *Biochem J* 2007; 404: 299–308.
- 224.** Borsch-Haubold AG, Kramer RM, Watson SP. Cytosolic phospholipase A2 is phosphorylated in collagen- and thrombin- stimulated human platelets independent of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 25885-92.
- 225.** Panagiotis F, Zhenyu L, Guoying Z, Yi Z, Junling L, Xiaoping D. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel. Rac1-MAPK–dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood* 2009;113:893-01.
- 226.** Adam F, Kauskot A, Rosa PJ, Bryckaert M. Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb and Haemost* 2008; 6: 2007-16.
- 227.** Nadal F, Levy-Toledano S, Grelac F, Caen JP, Rosa JP, Bryckaert M. Negative regulation of mitogen-activated protein kinase activation by integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ in platelets. *J Biol Chem.* 1997;272: 22381- 84.
- 228.** Li Z, Xi X, Du X. A mitogen-activated protein kinase dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *J Biol Chem.* 2001. 276:42226-32.
- 229.** Li Z, Zhang G, Feil R, Han J, Du X. Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMPdependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *Blood.* 2006; 107:965-72.
- 230.** Kramer R, Roberts M, Manetta EF, Hyslop JV, Jakubowski JA. Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca^{2+} -sensitive cytosolic phospholipase A2 in human platelets. *J Biol Chem* 1993; 268:26796-26804.

- 231.** Lin LL, Wartman M, Lin A Y, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993; 72: 269-278.
- 232.** Borsch-Haubold AG, Bartoli F, Asselin J, Dudler T, Kramer RM, Apitz-Castro R, Watson SP, Gelb MH. Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLA cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 4449-58.
- 233.** Borsch-Haubold AG, Kramer RM, Watson SP. Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen-stimulated human platelets. *Eur J Biochem* 1997; 245: 751-9.
- 234.** Canobbio I, Reineri S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 2004; 91: 102-10.
- 235.** Borsch-Haubold AG. Regulation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 1998; 26: 350-4.
- 236.** Mazharian A, Roger S, Maurice P, et al. Differential involvement of ERK2 and p38 in platelet adhesion to collagen. *J Biol Chem*. 2005;280: 26002 - 10.
- 237.** Sakurai K, Matsuo Y, Sudo T, Takuwa Y, Kimura S, Kasuya Y. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in thrombus formation. *J Recept Signal Transduct Res* 2004; 24: 283–96.
- 238.** Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1995; 270:27489-94.
- 239.** Dudley DT, Pang L, Decker SJ, et al. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7686-9.
- 240.** Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998; 273:18623-32.
- 241.** Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999; 5:810-16.
- 242.** Mori T, Wang X, Jung JC, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:444-52.
- 243.** Gu Z, Jiang Q, Zhang G. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal protein kinase in ischemic tolerance. *Neuroreport* 2001; 12:3487-91.
- 244.** Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, Lee JC, Adama JL, Griswold DE. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive

binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1996; 279:1453-61.

245. Cuenda A, Rouse J, Doza Y N, Meier R, Cohen P, Gallagher TF et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stress and interleukin-1. *FEBS* 1995; 364: 229-33.

246. Evers PA, Craxton M, Morrice N, Cohen P, Goedert M. Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol* 1998; 5: 321-28.

247. Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, Wang Z, Bower MJ, Lee JC et al. Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J Biol Chem* 1998 273:15605-10.

248. Wilson KP, McCaffrey PG, Hsiao K, et al: The structural basis for the specificity of pyridinylimidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chem Biol* 1997; 4:423-31.

249. Wang Z, Canagarajah BJ, Boehm JC, Kassisà S, Cobb MH, Young PR et al. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* 1998; 6: 1117-28.

250. Galli M. Clinical Utility of Laboratory Tests Used to Identify Antiphospholipid Antibodies and to Diagnose the Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:329 - 34.

251. Pierangeli S, Harris N. A protocol for determination of anticardiolipin antibodies by ELISA. *Nature Protocos* 2008; 3:840-48.

252. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

253. Palomo I, Pereira J, Alarcon M, Larrain AM, Pinochet C, Vasquez M, Velez MT, Leon M, Espinola R, Pierangeli S. Antiphospholipid antibodies in Chilean patients with systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 2002; 140:336-41.

254. Hackeng CM, Relou IA, Pladet MW, Gorter G, van Rijn HJ, Akkerman JW.. Early platelet activation by low density lipoprotein via p38MAP kinase. *Throb Haemost* 1999; 82:1749-56.

255. Relou IAM, Gorter G, van Rijn HJM, Akkerman J-W N. Platelet activation by the apoB/E receptor-binding domain of LDL.. *Thromb Haemost* 2002; 87:880-87.

256. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 168:178-95.

- 257.** Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S, and Yoshioka A. Cytosolic calcium changes in a process of Platelet adhesion and cohesion on a von willebrand factor-coated surface under flow conditions. *Blood* 1999; 94 (4) : 1149-55.
- 258.** Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Hall J, Harris EN, Pierangeli SS. E-selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2003; 1:843-8.
- 259.** O'Reilly FM, Casper KA, Otto KB, Sexton SA, Swerlick RA. Regulation of tissue factor in microvascular dermal endothelial cells. *J Invest Dermatol* 2003; 120:489–94.
- 260.** Yuan JS, Wang D, Stewart CN Jr. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J*. 2008; 3(1):112-23.
- 261.** Colden-Stanfield M, Gallin E. Modulation of K⁺ currents in monocytes by VCAM-1 and E-selectin on activated human endothelium. *Am J Physiol* 1998; 275: C267–77.
- 262.** Pierangeli SS, Liu XW, Barker JH, Anderson G, Harris EN. Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1995; 74(5):1361-7.
- 263.** Liu X, Peter FW, Barker JH, Pierangeli SS, Harris EN, Anderson GL. Leukocyte-endothelium interaction in arterioles after ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 1999; 87(1):77-84.
- 264.** Farrehi PM, Ozaki C. K, Carmeliet P, Fay WP. Regulation of Arterial Thrombolysis by Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Mice. *Circulation* 1998; 97:1002-8.
- 265.** Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakefield TW, Mackman N, Fay WP. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 2005; 105: 192-8.
- 266.** Ferrara DE, Weiss D, Carnell PH, Vito RP, Vega D, Gao X, Nie S, Taylor WR. Quantitative 3D fluorescence technique for the analysis of en face preparations of arterial walls using quantum dot nanocrystals and two-photon excitation laser scanning microscopy. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2005; 290: 114-23.

Abreviaturas

AA: ácido araquidónico
aCL: anticuerpos anticardiolipinas
AL: anticoagulante lúpico
Anti- β_2 GPI: anticuerpos anti β_2 glicoproteína I
APTT: tiempo de tromboplastina parcial activado
ASA: ácido acetil- salicílico
aFL: anticuerpo antifosfolípido
CL: cardiolipina
cPLA₂: fosfolipasa A₂ citoplasmática
DE: desviación estándar
DMSO: dimetilsulfóxido
DO: densidad óptica
dRVVT: Tiempo de veneno de víbora Russel diluído
ELISA: enzimoimmunoensayo
FT: factor tisular
HUVEC: células de vena de cordón umbilical humano
HB: buffer Heppes
HBSS: solución salina balanceada de Hanks
IgG: inmunoglobulinas G
KCT: tiempo de coagulación con Caolín
LPS: lipopolisacárido bacteriano
MG132: inhibidor específico de NF κ B
NOS2: oxido nítrico sintetasa 2
PBS: buffer fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
PD 98059: inhibidor específico de ERK1/ERK2
PGE1: Prostaglandina E₁
PRP: plasma rico en plaquetas
PFG: plaquetas filtradas por gel
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PMA: forbol miristato acetato
SB203580: inhibidor específico de p38MAPK
SB 202474: análogo inactivo de SB 203580
SBA: suero bovino adulto
SAF: síndrome antifosfolípido

SAB: seroalbúmina bovina

SEM: error estándar de la media

SFB: suero fetal bovino

SHN: suero humano normal

TBS: buffer tris salino

TBS-T: buffer tris salino, 0,1% de Tween 20

TMB: solución de tetrametil benzidina

TXB₂: tromboxano B₂

Artículos Originales

Artículos originales que forman parte de este trabajo de tesis

1. Ferrara D, Swerlick R, Casper K, Meroni P, Vega-Ostertag M, Harris E, Pierangeli S. Fluvastatin inhibits upregulation of tissue factor expression by antiphospholipid antibodies on endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2004; 2:1558-63.
2. Vega-Ostertag M, Harris E, Pierangeli S. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheumatol* 2004; 50(9): 2911-9.
3. Pierangeli S, Vega-Ostertag M, Harris EN. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Research* 2004; 114 (5-6): 467-76.
4. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris E, Pierangeli S. Involvement of p38 mapk in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheumatol* 2005; 52 (5):1545-54.

Artículos originales que forman parte colateral de este trabajo de tesis

1. Gharavi A, Vega Ostertag M, Espinola R, Liu X, Cole L, Cox N, Romagnoli P, Labat k, Pierangeli S. Intrauterine fetal death in mice caused by cytomegalovirus-derived peptide induced by aPL antibodies. *Lupus* 2004; 13(1): 17-23.
2. Vega-Ostertag M, Liu X, Henderson V, Pierangeli S. A peptide that mimics the vth region of beta2glycoprotein-I reverses antiphospholipid-mediated thrombosis in mice. *Lupus*. 2006; 15(6):358-65.