



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEFICIENCIA ADQUIRIDA DE CD55 Y CD59 EN
ERITROCITOS DE PACIENTES CON LUPUS
ERITEMATOSO GENERALIZADO.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA**

SUSTENTA

DRA. ALMA BELÉN RODRÍGUEZ GALLEGOS

Puebla, Invierno de 2002



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Deficiencia adquirida de CD55 y CD59 en eritrocitos de
pacientes con lupus eritematoso generalizado**

Dra. Alma Belén Rodríguez Gallegos

Asesor: Dr. Alejandro Ruiz Argüelles

Tabla de Contenido

- 1. Resumen**
- 2. Introducción**
- 3. Material y Métodos**
- 4. Resultados**
- 5. Discusión**
- 6. Agradecimientos**
- 7. Bibliografía.**

**Lo que queda detrás nuestro y lo que se extiende
ante nosotros son pequeñeces comparado con lo
que existe dentro de nosotros.**

Ralph W. Emerson

**Con admiración, gratitud y profundo respeto a mis
padres y maestros.**

RESUMEN:

Los antígenos CD55 y CD59 son glicoproteínas ancladas en moléculas de glicosil-fosfatidilinositol en la membrana eritrocitaria, que expresan propiedades inhibitorias del sistema de complemento. La anemia hemolítica autoinmune (AHA) ha sido asociada con anticuerpos antifosfolípidos (APLA). El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de APLA y su posible asociación con disminución del anclaje de CD55 y CD59 en eritrocitos de pacientes con AHA con o sin lupus eritematoso generalizado (LEG).

Se realizó el análisis de la densidad de la expresión de CD55 y CD59 en eritrocitos mediante citometría de flujo en 19 pacientes con AHA y 20 sujetos sanos. La detección de los anticuerpos antifosfolípidos de isotipo IgG e IgM se realizó por inmunoanálisis enzimático de fase sólida (ELISA). El suero y las inmunoglobulinas G y M, purificadas de 7 pacientes que presentaron títulos elevados de anticuerpos antifosfolípidos, fueron empleados para interferir *in vitro* con el anclaje de CD55 y CD59 en eritrocitos normales tratados con bromelina,

La mayoría de los pacientes con lupus eritematoso generalizado y algunos con AHA mostraron una deficiencia adquirida de CD55, CD59 o de ambos, que no estuvo asociada con APLA. La inhibición *in vitro* de la unión de CD55 y CD59, por anticuerpos séricos, se observó solo en una fracción de los pacientes con LEG, sin relación con su actividad contra fosfatidilinositol.

Aunque el estudio demostró, sin precedente en la literatura internacional, que existe deficiencia adquirida de los antígenos CD55 y CD59 en AHA primaria o secundaria a lupus eritematoso generalizado, parecería que este defecto juegue un papel facilitador, más que disparador, del proceso hemolítico. La participación de anticuerpos antifosfatidilinositol como causa de este defecto adquirido es muy cuestionable.

INTRODUCCIÓN.

Los antígenos CD55 y CD59 son proteínas ancladas a glicosil-fosfatidilinositol expresadas en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Actúan como reguladores de la actividad del complemento. CD55, también llamado factor acelerador del decaimiento (Decay Accelerating Factor o DAF), inhibe la activación del complemento en estados tempranos, a través de la disociación de C3 convertasa, lo que evita la amplificación de la cascada del complemento. CD59 regula los pasos finales de la cascada del complemento al bloquear la unión de C9, impidiendo así la consolidación del complejo de ataque de membrana. La deficiencia congénita en la expresión de estas proteínas, como en el caso de la hemoglobinuria paroxística nocturna, provoca un aumento en la sensibilidad a la citólisis mediada por el complemento, lo que da como resultado anemia hemolítica.

La anemia hemolítica autoinmune es consecuencia de la lisis de eritrocitos mediada por anticuerpos y complemento o por su opsonización a través de los receptores Fc γ en las células del sistema fagocítico mononuclear. La AHAI se ha asociado, en diversos estudios clínicos, con una gran variedad de anticuerpos antifosfolípidos (9), al punto de que se ha sugerido que la presencia de tales anticuerpos pueda considerarse como un marcador de esta patología. Sin embargo, los anticuerpos antifosfolípidos "autoinmunes" deben ser diferenciados de aquellos que resultan del daño a tejidos o secundarios a infecciones, amén de que se ha descrito una prevalencia considerable de APLA en individuos de edad avanzada y niños. Por ello, es cuestionable y discutible si la presencia de APLA es causa o consecuencia de ciertos procesos inmunopatológicos o, aún más, si juegan acaso algún papel de relevancia en la fisiopatología de los mismos (15-19).

El objetivo de este estudio fue evaluar la densidad de expresión de los antígenos CD55 y CD59 en la membrana de los eritrocitos de pacientes con AIHA, primaria o secundaria a lupus eritematoso, y su posible relación con la presencia de APLA, amén de explorar la

hipótesis de que los anticuerpos antifosfolípidos pudiesen impedir el anclaje de CD55 y CD59 en la superficie del eritrocito y contribuir de esta manera al mecanismo de hemólisis en estos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES.

Se estudiaron un total de 19 pacientes con AHAI (prueba directa de Coombs positiva, hemoglobina menor de 10 gr/L y mas de 3% de reticulocitos). Once de ellos cumplieron de manera completa los criterios de clasificación para LEG del Colegio Americano de Reumatología (20). Ninguno de los pacientes presentaba hemólisis aguda al momento del estudio; sus características más relevantes se resumen en la tabla 1. Se incluyeron además 20 voluntarios sanos (edad media de 35 años, 85% mujeres) como grupo de control. Todos los participantes dieron su consentimiento escrito para participar.

Tabla 1. Características de los pacientes

	Edad (Años)	Sexo	Años enfermos	Eventos Hemolíticos	APLA Positivos/7	C3 (mg/dL)**	C4 (mg/dL)**	Tratamiento
AHAI								
1	34	F	12	2	5	105	16	Ninguno
2	37	F	4	Crónicos	0	59	12	Ninguno
3	42	F	4	6	4	91	9	PDN/AZA
4	43	F	7	5	3	87	17	Ninguno
5*	57	M	1	5	7	ND [§]	ND	PDN
6*	36	F	7	Crónicos	6	ND	ND	Ninguno
7*	32	M	13	Crónicos	6	96	13	Acido Fólico
8*	38	F	2	Crónicos	0	75	23	PDN/Danazol
LEG								
1	37	F	10	8	6	39	5	PDN
2	38	F	5	1	5	84	15	AZA/ASA
3	40	F	4	1	6	73	10	PDN
4	43	F	1	1	4	91	10	PDN/AZA
5	35	F	12	1	7	ND	ND	PDN/ASA
6	32	F	15	1	3	64	10	PDN/AZA
7	40	F	6	2	1	77	ND	PDN/AZA
8	33	F	8	1	2	92	5	PDN/AZA
9	37	F	4	2	3	50	6	AZA/CLQ
10	31	F	6	1	2	96	15	PDN/AZA
11	28	F	7	1	4	105	10	PDN/AZA

* Pacientes esplenectomizados; **Valores de referencia: C3: 52-120 mg/dL; C4: 15-40 mg/dL; [§]ND = No determinado; PDN = prednisona; AZA = azatioprina; ASA = ácido acetil salicílico; CLQ = cloroquina

ESTUDIOS SEROLÓGICOS

De todos los sujetos se obtuvieron 3 mL de sangre completa y el suero fue almacenado a -80°C hasta el momento de su análisis. Se determinaron anticuerpos de isotipo IgG e IgM contra fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosofatidiletanolamina, fosfatidilinositol, $\beta 2$ -glicoproteína-1, $\beta 2$ -glicoproteína-1+cardiolipina y cardiolipina libre de $\beta 2$ -glicoproteína-1, por inmunoanálisis enzimático de fase sólida (ELISA), siguiendo las recomendaciones del fabricante de los estuches de reactivos.

ANÁLISIS DE LOS ANTÍGENOS CD55 Y CD59 EN ERITROCITOS

Se procesaron de manera simultánea pacientes y controles, incubando 5 μL de sangre completa obtenida con EDTA_{K_3} con 5 μL de una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos contra CD59 marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y contra CD55 marcados con ficoeritrina (PE). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron diluidas con 0.5 mL de solución salina amortiguada con fosfatos a pH 7.4 (PBS) y analizadas por citometría de flujo en un instrumento FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). La excitación de ambos fluorocromos se llevó a cabo con una longitud de onda de 488 nm y la emisión fue detectada a 525 (FITC) y 575 (PE) nm. La media de la intensidad de la fluorescencia para CD55 (PE) y CD59 (FITC) de todas las muestras fue registrada en histogramas uniparamétricos (22-23).

DETECCIÓN DE IgG E IgM EN LA MEMBRANA ERITROCITARIA

La detección de IgG e IgM en la superficie de los eritrocitos fue realizada por citometría de flujo, como se ha descrito previamente. Brevemente, los eritrocitos de pacientes y controles fueron lavados en tres ocasiones con PBS y posteriormente expuestos, por separado, a conjugados monoespecíficos contra IgG e IgM humana marcados con FITC; luego de 30 minutos de incubación, las células ya teñidas fueron lavadas dos veces más con

PBS y analizadas en el citómetro de flujo para detectar y registrar la fluorescencia que emiten las células a 525nm. Se consideraron como resultados positivos aquellos casos en los que la media de fluorescencia fue mayor a los límites superiores ($\mu+2\sigma$) establecidos a partir del análisis del grupo de sujetos sanos.

AI SLAMIENTO DE IgG E IgM SÉRICAS

La fracción gammaglobulina del suero de 7 pacientes adicionales con LEG, con títulos altos de anticuerpos antifosfatidilinositol, y de dos individuos normales (todas ellas obtenidas del banco de sueros del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán) fue obtenida por triple precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio (24) y posteriormente equilibrada con solución salina isotónica en microcolumnas de Sephadex G-25. Las fracciones IgM e IgG se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna TSK G4000SW de 7.5 x 600mm (LKM, Bromma, Sweden) con ayuda de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. (LKB) (25-26). Se utilizaron anticuerpos de cabra monoespecíficos para cada uno de los isotipos para descartar la contaminación cruzada de las fracciones cromatográficas por doble inmunodifusión.

INHIBICIÓN *IN VITRO* DEL ANCLAJE DE CD55 Y CD59 EN ERITROCITOS NORMALES

Se lavaron eritrocitos de sujetos normales 3 veces con PBS y se ajustaron a una densidad de 3 % con la misma solución. Alícuotas de 50 μ L fueron mezcladas con volúmenes iguales de una solución comercial de bromelina (GammaZyme-B, Gamma Biologicals Inc, Houston, TX), e incubadas por 60 minutos a 37°C; muestras de 20 μ L de los eritrocitos tratados con bromelina fueron lavados, separados por centrifugación y expuestos a 5 μ L del suero de los 7 pacientes con títulos altos de anticuerpos contra fosfatidilinositol (vide supra) y

de dos sujetos controles, o a $\approx 20 \mu\text{g}$ de las fracciones IgG e IgM obtenidos de 5/7 pacientes mencionados y los dos sujetos sanos. Después de incubarse por 60 minutos a temperatura ambiente, los eritrocitos fueron lavados y expuestos durante 30 minutos a $100 \mu\text{L}$ de un hemolisado obtenido por ultrasonificación de eritrocitos normales en presencia de monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitan (Tween) al 1% y cromatografía de exclusión en Sephadex G-25. Las células fueron lavadas nuevamente y resuspendidas en $100 \mu\text{L}$ de PBS. Treinta μL de esta suspensión fueron transferidos a tubos de poliestireno y tratados con anticuerpos monoclonales para CD55 y CD59 marcados con isocianato de fluoroseína y ficoeritrina respectivamente. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo EPICS Elite ESP (Coulter, Hialeah, FLA) equipado con un láser de argón enfriado por agua. La excitación fue realizada a 488 nm y la emisión detectada en forma de señales logarítmicas de longitud de onda de 525 y 575 nm. La media de la intensidad de fluorescencia de cada señal fue registrada en histogramas uniparamétricos. Alícuotas de eritrocitos no tratados con bromelina y/o no expuestos al hemolisado ni a los anticuerpos humanos sirvieron como controles. Todos los experimentos fueron realizados en un mínimo de dos repeticiones y el resultado fue expresado como la media del duplicado o triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba t de Student para comparar los valores de las medias. Para el análisis de las diferencias en distribución se usó la prueba de Chi-cuadrada (χ^2). Para ambos estadísticos se definió un valor de P igual a 0.05 como límite para la toma de decisiones.

RESULTADOS

DENSIDAD DE LOS ANTÍGENOS CD55 Y CD59 EN ERITROCITOS DE PACIENTES Y CONTROLES

La intensidad relativa de la fluorescencia de CD55 estuvo disminuida (2 desviaciones estándar por de bajo de la media de los sujetos normales) en 6 de 11 pacientes con lupus eritematoso generalizado y en 4 de 8 pacientes con AHAI. El promedio de fluorescencia para CD59 se encontró disminuido en todos los pacientes con LEG y en 4 pacientes con AHAI. Tanto CD55 y CD59 estuvieron disminuidos en 6 pacientes con LEG (54%) y en 3 pacientes con AHAI (37%). (Tabla 2). No hubo correlación entre la densidad de CD55 y CD59 y la presencia de anticuerpos anti- fosfolípidos (datos no mostrados). Mas aún, de todos los pacientes incluidos, en cualquiera de las dos clasificaciones clínicas, se encontraron anticuerpos antifosfatidilinositol en solamente 5 (26%) de ellos al momento del estudio. Cuatro de estos pacientes tenían disminuido el CD55, mientras que en los restantes 3 pacientes con disminución de CD55 no se detectaron anticuerpos antifosfatidilinositol. Por su parte, solamente 3 de los 5 pacientes con anticuerpos antifosfatidilinositol tuvieron disminución de CD59, mientras que hubo 6 pacientes sin estos anticuerpos y densidad baja de CD59.

Tabla 2. Expresión disminuida de CD55 y CD59 en eritrocitos de pacientes con Lupus eritematoso generalizado (LEG) y anemia hemolítica autoinmune (AHAI)

	CD55	CD59	CD55 y CD59
LEG	6/11	10/11	6/11
AHAI	4/8	4/8	3/8
CONTROLES	0/20	0/20	0/20

Las diferencias en distribución son estadísticamente significativas
($P_{\chi^2} < 0.0025$ en todos los casos)

El análisis estadístico no mostró diferencia significativa en la media de fluorescencia de la expresión de CD55 entre los pacientes y los sujetos sanos; sin embargo, la expresión de CD59 en el grupo de pacientes con LEG fue significativamente menor que en el grupo control. ($P_t = 0.0297$).

INHIBICIÓN ALOSTÉRICA DEL ANCLAJE DE CD55 Y CD59 EN ERITROCITOS POR ANTICUERPOS ANTIFOSFATIDILINOSITOL.

El suero completo de 4 de los 7 pacientes adicionales con LEG con títulos altos de anticuerpos antifosfatidilinositol, así como la fracción IgM -pero no la IgG- de 3 de 5 de esos sueros, inhibieron significativamente el anclaje de CD55 y CD59 en la membrana de eritrocitos normales tratados con bromelina. Los sueros normales no fueron capaces de causar dicha inhibición, como tampoco lo fueron sus respectivas fracciones IgG o IgM. Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2.

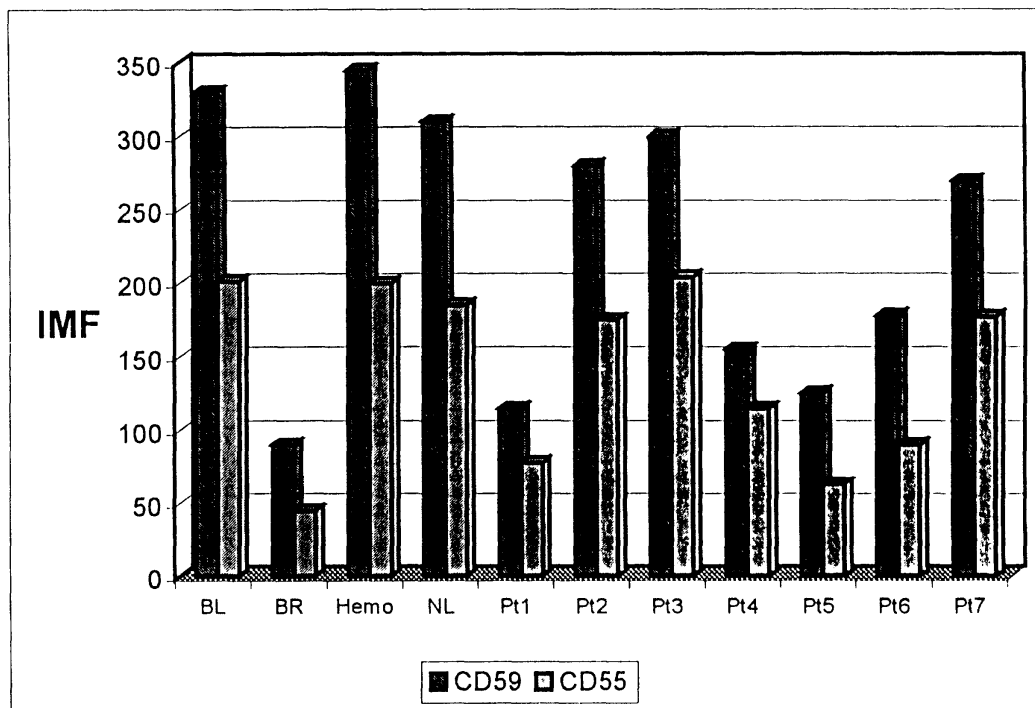


Figura 1. Inhibición *in vitro* del anclaje de CD55 y CD59 a eritrocitos normales tratados con bromelina, por la exposición a suero humano normal y sueros de siete pacientes con títulos altos de anticuerpos contra fosfatidilinositol. BL = Expresión basal de CD55 y CD59; BR = Expresión de CD55 y CD59 en eritrocitos bromelinizados; Hemo = Anclaje de CD55 y CD59 después de la adición del hemolisado en ausencia de suero; NL= Anclaje de CD55 y CD59 después de la adición del hemolisado en presencia de una mezcla de sueros de 5 individuos normales; Pt 1-7 = Anclaje de CD55 y CD59 después de la adición del hemolisado en presencia de los sueros de los pacientes 1 a 7. El suero de los pacientes con LEG 1, 4, 5 y 6 interfirieron con el anclaje de CD55 y CD59. IMF corresponde a la intensidad media de fluorescencia registrada en los detectores de 525nm (CD59) y 575nm (CD55).

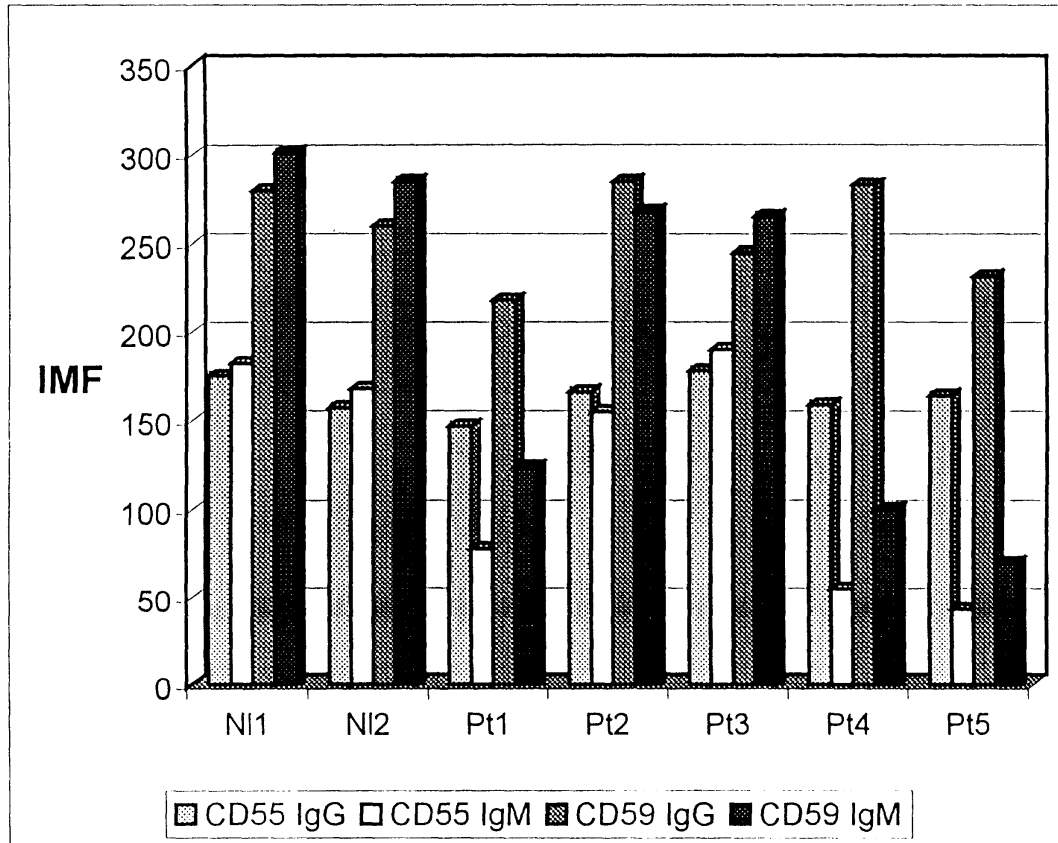


Figura 2. . Inhibición *in vitro* del anclaje de CD55 y CD59 a eritrocitos normales tratados con bromelina, por exposición a las fracciones IgG e IgM del suero de dos individuos normales y cinco pacientes con LEG y títulos altos de anticuerpos contra fosfatidilinositol. NI1-2 = Anclaje de CD55 y CD59 después de la adición del hemolisado en presencia de las fracciones IgG e IgM del suero de los sujetos normales; Pt1-5 = Anclaje de CD55 y CD59 después de la adición del hemolisado en presencia de las fracciones IgG e IgM del suero de los pacientes 1 a 5. Las fracciones IgM del suero de los pacientes con LEG 1, 4, y 5 interfirieron con el anclaje de CD55 y CD59. IMF corresponde a la intensidad media de fluorescencia registrada en los detectores de 525nm (CD59) y 575nm (CD55).

DISCUSIÓN

Los antígenos CD55 y CD59 son moléculas con función reguladora de la activación del sistema de complemento. Su deficiencia conduce a procesos hemolíticos mediados por complemento, como ocurre en la hemoglobinuria paroxística nocturna [27]. Este trabajo puso en evidencia la disminución de la expresión de CD55 y CD59 en los eritrocitos de muchos pacientes con LEG y AHAI y en una menor proporción de pacientes con AHAI primaria. Se investigó en los pacientes la presencia de anticuerpos contra diversos fosfolípidos y contra β_2 glicoproteína-I, para tratar de dilucidar si la presencia de dichos anticuerpos pudiese mostrar alguna asociación con la disminución de la densidad de expresión de CD55 y CD59 y, por ende, con el mecanismo hemolítico autoinmune. Aunque la mayoría (73%) de los pacientes estudiados mostraba anticuerpos séricos contra al menos 3 de los 7 antígenos probados (fosfolípidos y β_2 -glicoproteína-I), no hubo correlación entre la presencia de ninguno de los anticuerpos –ya sea que fuesen de tipo IgG, IgM, o de ambos- y la expresión de CD55 o CD59 en los eritrocitos.

Estos hallazgos son discordantes con la hipótesis original de que la presencia de grandes cantidades de APLA pudiese estar relacionada con la disminución de CD55 y CD59, desempeñando un papel central en los procesos hemolíticos de la AHAI. Dado que estas dos proteínas ancladas a glicosil-fosfatidilinositol, por una parte tienen una amplia distribución celular, y por otra son inhibidores naturales de la citólisis mediada por complemento, es más razonable proponer que son los anticuerpos dirigidos específicamente contra antígenos eritrocitarios –más que los que reaccionan con fosfolípidos o con β_2 -glicoproteína-1- los primariamente responsables de disparar la activación del complemento o la opsonización de

los eritrocitos a través de los receptores Fc γ en fagocitos. La disminución del anclaje de CD55 y CD59 a la membrana del eritrocito pudiera únicamente facilitar el proceso de hemólisis.

A favor de esta postura fue el hallazgo de que diversos sueros, o sus fracciones IgG o IgM, provenientes de pacientes con LEG y títulos elevados de anticuerpos contra fosfatidilinositol, no fueron capaces de inhibir el anclaje de CD55 o CD59 a eritrocitos normales tratados con bromelina. Si bien lo opuesto se observó con otros sueros –o sus fracciones IgM- es necesario mencionar que 4 de los 7 pacientes de quienes se obtuvieron estos sueros se encontraban en remisión clínica, amén de que no se observó asociación alguna entre los títulos de anticuerpos anti-fosfatidilinositol, los niveles de complemento (C3 y C4) y el tratamiento. Esta aparente discrepancia sugiere que, si los anticuerpos anti-fosfatidilinositol tienen *per se* un papel fisiopatogénico en la AHA, los métodos actualmente empleados para su detección no permiten discriminar a aquellos verdaderamente “autoinmunes” de los de la poza circulante normal [28]. A pesar de ello, a los anticuerpos que reaccionan con fosfolípidos se les ha implicado, por muchos años ya y como consecuencia de asociaciones estadísticas derivadas de estudios epidemiológicos, como anticuerpos con capacidad patogénica, principalmente en enfermedades autoinmunes órgano inespecíficas, a pesar de su elevada prevalencia en procesos infecciosos y en sujetos sanos [11-13, 29]. Por ello, no ha sido sorprendente que, cuando se ha investigado su capacidad para reproducir algún supuesto mecanismo fisiopatológico, los resultados han sido en términos generales, más que desalentadores. Desafortunadamente, a pesar de que múltiples evidencias apuntan a la imprecisión de los métodos para la detección de los anticuerpos antifosfolípidos, en la práctica médica se toman decisiones críticas con base en sus resultados. [30].

En conjunto, los datos obtenidos de este trabajo pueden ameritar algunas consideraciones:

i) Puede concluirse que algunos pacientes con enfermedades autoinmunes, en las que la hemólisis es un dato frecuente, tienen una forma adquirida de deficiencia de proteínas

ancladas a glicosil-fosfatidilinositol que, a su vez, aumenta la susceptibilidad a la citólisis mediada por complemento y podría contribuir con el proceso hemolítico.

ii) La deficiencia adquirida de CD55 y CD59 se observó con mayor consistencia en pacientes con LEG, que en aquellos con AHA primaria. La razón por la que estas moléculas se expresan con menor densidad en los eritrocitos de estos pacientes merece explorarse con mayor detalle.

iii) La presencia de anticuerpos reactivos con fosfolípidos no necesariamente se asocia con procesos fisiopatológicos en las enfermedades autoinmunes. Ya se ha propuesto que estos anticuerpos podrían no solo no ser patogénicos sino, por el contrario, ser inhibidores fisiológicos de la expresión de otros autoanticuerpos a través de circuitos anti-idiotípicos [31]; ser la consecuencia de exposición a agentes infecciosos; funcionar como transportadores de productos metabólicos o catabólicos, o participar en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica [12, 32].

iv) Cualquiera que sea el caso, no debe imputarse un verdadero papel patogénico a los anticuerpos antifosfolípidos, en tanto no existan métodos definitivos y totalmente confiables para su detección y, posiblemente, su disección. Entretanto, el significado fisiopatológico de los APLA en enfermedades autoinmunes deberá permanecer como hipotético.

Estos hallazgos pueden contribuir a revelar el verdadero papel patogénico –si acaso tienen alguno- de los APLA, y enfatizar la idea de que dada la expresión tan ubicua de fosfolípidos y fosfodiésteres en diversos tejidos, células y moléculas, la interferencia funcional de los anticuerpos antifosfolípidos puede ser múltiple y, hasta el momento, impredecible.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por la provisión de muestras de pacientes y por su colaboración en la realización de algunos de los experimentos contenidos en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rosse WF. The glycolipid anchor of membrane surface proteins. *Semin Hematol* 1993;30:219-231
2. Loveland BE, Szokolai K, Johnstone RW, McKenzie IFC. Coordinate functions of multiple complement regulating molecules, CD46, CD55, and CD59. *Trans Proc* 1994; 26:1070-1071.
3. Nicholson-Weller A, Burge J, Fearon DT, Weller PF, Austen KF. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J Immunol*. 1982; 129:184-189.
4. Walsh LA, Tone M, Thiru S, Waldmann H. The CD59 antigen – a multifunctional molecule. *Tissue Antigens* 1992; 40:213-220.
5. Nicholson-Waller A, March JP, Rosenfeld ST, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 60:5066-5070.
6. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80:5430-5434.
7. Holguin MH, Frederick IR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989; 84:7-17.
8. Piedras J, López-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry* 2000; 42: 234-238
9. Dacie JV. Autoimmune hemolytic anemia. *Arch Intern Med*. 1975; 135:1293-308.
10. Sthoeger Z, Sthoeger D, Green L, Geltner D. The role of anticardiolipin auto antibodies in the pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1993; 20:2058-2061.
11. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, Pange PJE, Goudevenos J, Moutsopoulos HM. High prevalence of anti-cardiolipin and other auto antibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol*. 1987; 69:557-565.
12. Richaud-Patin Y, Cabiedes J, Jakez-Ocampo J, Vidaller A, Llorente L. High prevalence of protein-dependent and protein-independent antiphospholipid and other auto antibodies in healthy elders. *Thrombosis Res* 2000; 99:129-133.

13. Avčin T, Ambrožič A, Kuhar M, Kveder T, Rozman B. Anticardiolipin and anti- β_2 glycoprotein I antibodies in sera of 61 apparently healthy children at regular preventive visits. *Rheumatology*. 2001; 40:565-573.
14. Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Ruiz-Argüelles GJ, Vázquez-Prado J, Alarcón-Segovia D. The presence of serum antibodies to coagulation protein C in patients with systemic lupus erythematosus is not associated with antigenic or functional protein C deficiencies. *Am J Hematol* 1993; 44:58-61
15. Ruiz-Argüelles A, Anglés-Cano E, Pérez-Romano B, Ruiz-Argüelles GJ, Delezé M, Alarcón-Segovia D, Gaussem P. Serum antibodies to distinct epitopes of the tissue type plasminogen activator (t-PA) in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 1995; 49:109-114
16. Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Alarcón-Segovia D, Drenkard C, Villa A, Cabiedes J, Presno-Bernal M, Delezé M, Ortiz-López R, Vázquez-Prado J. Natural anticoagulants in systemic lupus erythematosus. Deficiency of protein S bound to C4bBP associates with recent history of venous thrombosis and the antiphospholipid syndrome *J Rheumatol* 1991;18:552-58
17. Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Lobato-Mendizábal E, Díaz-Gómez F, Pacheco-Pantoja A E, Drenkard C, Alarcón-Segovia D. Disturbances in the tissue type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor (t-PA/PAI) system in systemic lupus erythematosus *Am J Hematol* 1992; 37:9-13
18. Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Alarcón-Segovia D. Protein S deficiency associated to anti-protein S antibodies in a patient with mixed connective tissue disease and its reversal with danazol *Acta Haematol* 1993;89:206
19. Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Alarcón-Segovia D. Possible mechanisms on the relationship of antiphospholipid antibodies and deficiencies of the protein C/S system *Br J Haematol* 1991;77:568-569.
20. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-1277.
21. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J. Phospholipid specificity and requirement of β_2 -glycoprotein-I for reactivity of antibodies from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity* 1992; 5:787-801.
22. Ruiz-Argüelles A: Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Clin Chim Acta* 1992;211:S13-S27
23. Orfao A, Ruiz-Argüelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: Its applications in hematology. *Haematologica* 1995;80:69-81,
24. Harlow E, Lane E. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory; 1988

25. Page M, Thorpe R. IgG Purification. In: Pound JD, editor, ***Immunochemical Protocols***. New Jersey; Humana Press; 1998. P 95-111
26. Page M, Thorpe R. Purification of monoclonal antibodies. In: Pound JD, editor, ***Immunochemical Protocols***. New Jersey; Humana Press; 1998. P 113-119
27. Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. ***Medicine*** 1997; 76:63-93
28. Favaloro EJ, Silverstrini R, Mohamed A. Clinical utility of anticardiolipin antibody assay: High interlaboratory variations and limited consensus by participants of external quality assurance program signals a caution approach. ***Pathology*** 1999; 31:142-147
29. Shoenfeld Y, Blank M, Krause I. The relationship of antiphospholipid antibodies to infections. Do they bind to infecting agents or may they even be induced by them? ***Clin Exp Rheumatol*** 2000; 18:431-432
30. Gharavi AE, Pierangeli SS, Wilson WA. Anticardiolipin antibodies: Importance, controversies, discrepancies; the need for guidelines and calibrators. ***Clin. Exp. Rheumatol*** 2001; 19:237-239
31. Ruiz-Argüelles A. The anti-idiotypic role of autoantibodies. In: Miyai K, Kanno T, Ishikawa E, editors, ***Progress in Clinical Biochemistry*** Tokyo: Elsevier Science Publishers; 1992. p 555-557
32. Coriën IR, Cooke A. Natural autoantibodies might prevent autoimmune disease. ***Immunol Today*** 1986; 7:363-364