

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio molecular de los anticuerpos anti-fosfolípidos/cofactores de un paciente con síndrome de anti-fosfolípidos primario, mediante la presentación de los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L en fagos filamentosos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

Q.F.B. MARISOL LANGUREN SÁNCHEZ

Director de Tesis: Dr. Javier Cabiedes Contreras.

México, D.F.

Enero, 2004



INCMNSZ



COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Marisol Languren
Sánchez
FECHA: 28 - ENERO - 2004
FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de octubre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Languren Sánchez Marisol, con número de cuenta 501048604, con la tesis titulada: "Estudio molecular de los anticuerpos anti-fosfolípidos/cofactores de un paciente con síndrome de anti-fosfolípidos primario, mediante la presentación de los re-arreglos VHDJH y VLJL en fagos filamentosos", bajo la dirección del(a) Dr. Javier Cabiedes Contreras.

Presidente:	Dr. Jorge Alcocer Varela
Vocal:	Dr. Javier Cabiedes Contreras
Secretario:	Dr. Baltazar Becerril Luján
Suplente:	Dra. Clara Espitia Pinzón
Suplente:	Dr. Karen Manoutcharian

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de octubre de 2003.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán y en el Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la dirección del Dr. Javier Cabiedes Contreras. Para el desarrollo del trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el proyecto número 34750-N.

Agradecimientos.

Quiero agradecer especialmente al:

Dr. Javier Cabiedes Contreras

Dr. Jorge Alcocer Varela

Dra. Clara I Espítia Pinzón

Por su enseñanza y asesoramiento que me brindaron durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Baltazar Becerril Luján:

Por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme su apoyo y confianza, así como todo lo necesario para la terminación de este trabajo.

A la M en C. Luisa E. Fernández Alatuna

Por apoyarme no sólo con sus conocimientos y su valiosa ayuda participando en la realización de este proyecto, sino porque en ella encontré una valiosa amistad.

Y a todas aquellas personas que estuvieron interesadas con mi trabajo e influyeron determinadamente en mi formación académica, especialmente a la Dr. Consuelo García, Ernesto Ortiz, Lidia Riaño y Timoteo Olamendi.

Dedicatoria.

A mi esposo con muchísimo amor...

*Por compartir su vida conmigo, apoyándome y
enseñándome a ver la vida de la mejor manera
al brindarme todo su amor
Gracias.*

Índice.

1. Resumen.....	1
2. Abreviaturas.....	3
3. Índice de figuras.....	5
4. Introducción.....	6
5. Marco teórico.....	8
5.1 Antecedentes históricos del síndrome de anti-fosfolípidos (SaF).....	8
5.2 Manifestaciones clínicas asociadas al síndrome de anti-fosfolípidos primario (SaFP).....	9
5.3 Epidemiología del SaF.....	9
5.4 Heterogeneidad de los anticuerpos aFL.....	10
5.5 Factores proteicos asociados a los aFL.....	11
5.6 Análisis molecular de los aFL.....	13
5.7 Estructura del bacteriofago filamentoso.....	19
5.8 Ciclo de infección del fago M13.....	19
5.9 Características de los fagos filamentosos.....	21
5.10 Fagémido pHEN1.....	23
6. Hipótesis.....	24
7. Objetivos.....	24
8. Material y métodos	
8.1 Sujeto de estudio.....	25
8.2 Determinación de los anticuerpos anti- β_2 GP-I.....	25

8.3	Purificación de células mononucleares.....	25
8.4	Purificación del ácido ribonucleico.....	25
8.5	Obtención del DNA complementario.....	26
8.6	Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa de los re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L	26
8.7	Obtención del fragmento unidor.....	26
8.8	Obtención de los anticuerpos en formato scFvs.....	27
8.9	Introducción de los sitios de restricción en los scFvs.....	31
8.10	Digestión de los scFvs.....	32
8.11	Ligación de los scFvs en pSyn2.....	32
8.12	Transformación.....	33
8.13	Propagación del fago ayudador M13/KO7.....	33
8.14	Rescate de las bibliotecas como fagos/anticuerpos.....	33
8.15	Caracterización de las bibliotecas por "fingerprinting" y secuenciación....	35
8.16	Selección.....	35
8.17	Análisis mediante ELISA de los anticuerpos seleccionados.....	36

9. Resultados.

9.1	Actividad anti- anti- β_2 GP-I.....	37
9.2	Análisis del RNA total.....	37
9.3	Amplificación de los re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L	37
9.4	Ensamble de los re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L	38
9.5	Digestión y ligación.....	39
9.6	Variabilidad de las secuencias.....	39
9.7	Selección.....	41
9.8	Actividad anti- β_2 GP-I.....	42
9.9	Actividad anti-protrombina.....	44
9.10	Ensayos de reactividad cruzada.....	46
9.11	Análisis de las secuencias Beta1, Beta2 y Prot1.....	48
	Clona Beta1.....	48
	Clona Beta2.....	50
	Clona Prot1.....	53

10. Discusión.....	55
11. Conclusiones.....	58
12. Perspectivas.....	59
13. Bibliografía.....	60

1. Resumen.

Estudio molecular de los anticuerpos anti-fosfolípidos/cofactores de un paciente con síndrome de anti-fosfolípidos primario, mediante la presentación de los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L en fagos filamentosos.

Introducción: El síndrome de anti-fosfolípidos primario (SaFP) se caracteriza por manifestaciones trombóticas y hemocitopénicas en pacientes con títulos altos de auto-anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos (aFL). El estudio molecular de los aFL se ha realizado a partir de anticuerpos monoclonales, los cuales no representan realmente el repertorio autoinmune. Por medio de expresión en fagos filamentosos ó phage display se pueden estudiar los re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L de anticuerpos que reconocen antígenos específicos. **Objetivo:** Estudiar el repertorio de genes V que codifican las regiones variables $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L de los anticuerpos que reconocen fosfolípidos en pacientes con SaFP. **Material y métodos:** A partir de RNA de células mononucleares de sangre periférica de un paciente con SaFP, el cual presentó títulos altos de anticuerpos β_2 GP-I, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) y se amplificaron los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L (κ y λ). Los fragmentos de cadena pesada y ligera se unieron para formar los re-arreglos lineales V_HDJ_H -conector- V_KJ_K y V_HDJ_H -conector- V_LJ_L obteniéndose dos anticuerpos en formato variable de cadena sencilla (scFv). Los scFv fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sfi I* y *Not I* y ligados al vector pSyn2 para transformar *E. coli* XL1-Blue. Los cultivos se co-infectaron con el fago M13/KO7 para rescatar los anticuerpos en formato de fago/anticuerpo. A los fago/anticuerpo se les realizó cuatro rondas de tamizado contra los antígenos β_2 GP-I y Protrombina (Pt). La diversidad de las bibliotecas se determinó amplificando los scFvs de varias clonas seleccionadas al azar y digiriéndolos con la enzima de restricción de corte frecuente *Bst*VI. Para determinar la especificidad de los fago-anticuerpos obtenidos de la 4ª ronda de selección se hicieron ensayos inmunoenzimáticos. Las clonas positivas fueron secuenciadas en un equipo ABI Prism de Applied Biosystems y analizadas con los programas ABI Prism Sequencing Análisis, V Base y DNASAR. **Resultados:** Se obtuvieron dos clonas positivas contra β_2 GP-I (Beta1 y Beta2). Los genes V_H de ambas clonas pertenecen a la familia V_H4 . El re-arreglo de beta1 tiene un 96.7 % de homología con el gen VHSP/VH4.22, no se detectó gen D y porta el producto del gen J_H5 con una homología del 98.03 %. La cadena ligera esta compuesta del gen 1b.366F5/DPL5, el cual pertenece a la familia V_L1 , con un 99.4 % de homología, no se identificó gen J_L . La clona Beta2 tiene un 98.97% de homología con el gen VIV-4/4.35+, no se detectó gen D y porta el producto del gen J_H4b con una homología del 81.25 %. La cadena ligera esta formada por el producto del gen V2-14+ de la familia V_L3 con 88.88% de homología y el gen J_L3b . Obtuvimos una tercera clona (Prot1) la cual fue recuperada por su reactividad contra protrombina. Porta el producto del gen DP-47/V3-23...+ que pertenece a la familia V_H3 con una homología del 98.6%, no se identificó gen D y el gen J_H fue el J_H4b con una homología del 87.5%. La cadena ligera esta formada por el gen 1b.366F5/DPL5...+ el cual pertenece a la familia V_L1 con una homología de 93.6% y el gen J_L3b con una homología del 89.47%. La reactividad de las clonas Beta1 y Beta2 fue específica contra β_2 GP-I. Prot1 mostró reactividad contra β_2 GP-I y Pt. y ninguna mostró reactividad contra proteínas irrelevantes (neuroaminidasa, colagenasa, ribonucleasa A y RNAsa). **Conclusiones:** Por el número de mutaciones somáticas se infiere que los re-arreglos son el producto de clonas estimuladas por antígeno. Los scFv parecen ser representativos de los anticuerpos patogénicos presentes en pacientes con SaF. Las tres clonas fueron oligo-reactivas. El papel patogénico de los anticuerpos está en estudio.

1. Summary.

Molecular Study of the antiphospholipid antibodies/cofactors of a patient with primary antiphospholipid syndrome, through the presentation of the rearrangements V_HDJ_H y V_LJ_L in filamentous phages.

Introduction: Anti-phospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by thrombotic and hemocytopenic manifestations in patients with high titers of auto-antibodies directed against phospholipids (aPL). Molecular studies of the aPL has been done on monoclonal autoantibodies obtained from EBV transformed B cells, which do not represent the repertoire of the autoimmune aPL. Using phage display technology is possible the study of a wide repertoire of $V_H(D)J_H$ and V_LJ_L rearrangements that recognize specific antigens. **Objective:** To study the repertoire of V genes that codify the variable regions of the antibodies that recognize phospholipids in patients with APS. **Material and methods:** We studied a patient with Primary APS that presented high titers of β_2 GP-I antibodies. We synthesized cDNA from RNA obtained from peripheral blood mononuclear cells. The V_HDJ_H and V_LJ_L (κ γ λ) rearrangements were amplified. Heavy and light chains fragments were linked to obtain single chain format variable (scFv) fragments. The scFv were digested with *Not I* and *Sfi I* restriction enzymes and ligated to a pSyn2 vector. *E. coli* XL1-Blue were transformed with the products of the ligation. The cultures were co-infected with the M13/KO7 phage to rescue the antibodies in the format phage/antibody. Four rounds of selection were done against β_2 GP-I and Prothrombin (Pt). The diversity of the libraries was determined by amplification of the scFvs clones randomly selected and digested with the frequent-cutting enzyme *Bst*VI. The reactivity of the phage/antibodies obtained was tested by ELISA against β_2 GP-I, neuroaminidase, collagenase, ribonuclease A y RNase. Positive clones were sequenced and analyzed with the V Base and DNASTAR software. **Results:** Two positive clones that recognized β_2 GP-I (Beta1 and Beta2) were obtained. The V_H genes of both clones belong to the V_H4 family. The β_1 rearrangement has 96.7 % of homology with the VHSP/VH4.22 gene, no gene D was identified and the J_H gene used was the product of the J_{H5} gene with 98.03 of homology. The light chain is composed by the product of the 1b.366F5/DPL5 gene that belongs to the V_L1 family, with an homology of 99.4 %, no J_L gene was identified. The Beta2 clone has an homology of 98.97% with the VIV-4/4.35+ gene, no gen D was identified and it is arranged with the product of the J_{H4b} gene with an homology of 81.25 %. The light chain used the product of the gene V2-14+ which belong to the V_L3 family with an homology of 88.88% and it is arranged with the product of the J_{L3b} gene. The third clone obtained (Prot1) recognized human prothrombin. It carries the product of the DP-47/V3-23...+ gene that belongs to the V_H3 family with an homology of 98.6%, no D gene was identified and the J_H gene identified was the product of the J_{H4b} with an homology of 87.5%. The light chain the product of the 1b.366F5/DPL5...+ gene, that belongs to the V_L1 family with 93.6 % of homology it was re-arranged with the product of the J_{L3b} gene, and shows an homology of 89.47%. The reactivity of the Beta1 and Beta2 clones was specific against β_2 GP-I. Prot1 showed reactivity against β_2 GP-I and Pt and none showed reactivity against irrelevant proteins (neuroaminidase, collagenase, ribonuclease A y RNase). **Conclusions:** The number of somatic mutations found in the three clones, suggest that the rearrangements are the product of antigen driven clones. Immunological and molecular characteristics of the scFv antibodies obtained from a patient with PAPS represent the pathogenic antibodies detected in patients with APS. All three clones generated were oligo-reactives. Further studies are necessary to identify the pathogenic capacity of the scFv antibodies reported here.

2. Abreviaturas.

aa	Amino ácido	NEG	New England BioLabs.
aCL	Anticuerpos anti-cardiolipina.	ng	nanogramos.
AcMo	Anticuerpos monoclonales.	OriM13	Origen de replicación del fago M13.
ADP	Difosfato de adenosina	Pb	Pares de bases.
AL	Anticoagulante lúpico.	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
aFL	Anticuerpos anti-fosfolípidos.	PEG	Polietilenglicol.
amp	Ampicilina	PM	Peso molecular.
β_2 GP-I	Beta2glicoproteína I.	pmol	Picomoles.
aB2GpI	Anticuerpos anti- β_2 GP-I	pII	Proteína II del fago filamentoso.
CDR 's	Regiones determinantes de complementariedad.	pIII	Proteína III del fago filamentoso.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.	pV	Proteína V del fago filamentoso.
DNAs	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla.	pVI	Proteína VI del fago filamentoso.
DO	Densidad óptica.	pVII	Proteína VII del fago filamentoso.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático. (Enzyme linked immuno-sorvent assay)	pVIII	Proteína VIII del fago filamentoso.
FL	Fosfolípidos.	pX	Proteína pX del fago filamentoso.
FR	Forma replicativa del DNA.	pXI	Proteína pXI del fago filamentoso.
FTC	Fosfatidilcolina.	RNA	Ácido ribonucleico.
IG	Región intergénica de un vector.	rpm	Revoluciones por minuto.
IgG	Inmunoglobulina G.	SaF	Síndrome de anti-fosfolípidos.
		SaFP	Síndrome de anti-fosfolípidos primario.
		ScFv	Fragmento variable de cadena

IgM	Inmunoglobulina M.	sencilla.	
KD	Kilodaltones.	TTP	Tiempo de tromboplastina Parcial activada.
LEG	Lupus eritematoso generalizado.		
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.	UFC	Unidades formadoras de colonias.
M	Molaridad.	V _K	Región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo.
mL	Mililitros	V _L	Región variable de la cadena ligera lambda del anticuerpo.
μL	Microlitros.	V _H	Región variable de la cadena pesada del anticuerpo.
mM	Milimoles.		
N	Normalidad.		
Nm	Nanomoles.		

3. Índice de figuras.

Figura I. Representación esquemática del fago filamentoso.....	21
Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida del bacteriofago M13.....	22
Figura 3. Fagémido pHEN1.....	23
Figura 4. Construcción de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs).....	31
Figura 5. Construcción y clonación de las bibliotecas de scFvs.....	34
Figura 6. Análisis del RNA total.....	37
Figura 7. Amplificación de los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L y del fragmento unidor.....	38
Figura 8. Ensamble de los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L	39
Figura 9. Patrón de digestión de las clonas positivas de la biblioteca $V_HDJ_H-V_KJ_K$	40
Figura 10. Patrón de digestión de las clonas positivas de la biblioteca $V_HDJ_H-V_{\lambda}J_{\lambda}$	41
Figura 11. Reactividad contra anti- β_2GP-I	43
Figura 12. Patrón de digestión de las clonas Beta1 y Beta2.....	43
Figura 13. Actividad anti-protrombina.....	44
Figura 14. Patrón de digestión de las clonas reactivas contra protrombina.....	45
Figura 15. Reactividad contra β_2GP-I	46
Figura 16a. Reactividad contra antígenos irrelevantes.....	47
Figura 16b. Reactividad contra fosfolípidos.....	47
Figura 17a. Secuencia de los re-arreglos V_HDJ_H de la clona Beta1.	49
Figura 17b. Secuencia del re-arreglos V_LJ_L de la clona Beta1.....	50
Figura 18a. Secuencia de los re-arreglos V_HDJ_H de la clona Beta2.....	51
Figura 18b. Secuencia del re-arreglo V_LJ_L de la clona Beta2.....	52
Figura 19a. Secuencia de los re-arreglos V_HDJ_H de la clona Prot1.....	53
Figura 19b. Secuencia del re-arreglos V_LJ_L de la clona Prot1.....	54

4. Introducción.

Las enfermedades autoinmunes son de gran interés en México, ya que se cuenta con muy poca información acerca de su etiología; esto se debe básicamente a que son enfermedades cuyo origen está relacionado principalmente con genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se sabe que los padecimientos autoinmunes comprenden un grupo heterogéneo y complejo de trastornos cuya cascada de sucesos inmunológicos se inicia y es perpetuada por diversos factores que traen como consecuencia la pérdida de la tolerancia. Se caracterizan por presentar títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra diversos auto antígenos y se presentan generalmente entre la 2da y 3ra década de la vida, afectando preferentemente a mujeres. Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir en dos grupos: 1) enfermedades autoinmunes órgano específicas en las cuales las alteraciones están confinadas a un órgano en particular y 2) enfermedades órgano inespecíficas en donde las lesiones afectan varios tejidos. El prototipo de éste último grupo es el Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) cuyas manifestaciones clínicas son muy diversas. El LEG es una enfermedad donde se ven afectados los sistemas músculo-esquelético, cutáneo, renal, hematológico y neurológico y se caracteriza por la presencia de auto-anticuerpos que reconocen componentes del citoplasma y núcleo, además algunas de las manifestaciones clínicas del LEG, se han asociado a la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL).

En la década de los 60's se describieron 4 casos de pacientes con LEG, en los que la presencia de anticuerpos anti-cardiolipina y anticoagulante lúpico (AL) se asoció con ciertas manifestaciones clínicas como trombosis arterial y/o venosa, pérdida fetal recurrente, desordenes neurológicos y trombocitopenia. La noción de que las diversas manifestaciones clínicas y pruebas de laboratorio podrían estar relacionadas dio origen al llamado síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SaF). Actualmente el SaF se define como una enfermedad autoinmune de carácter multifactorial, que se caracteriza por la presencia de anticuerpos aFL como causantes de daño a diferentes componentes del organismo. El SaF puede presentarse solo denominándose primario o asociado a alguna otra enfermedad autoinmune, principalmente el LEG. Los anticuerpos aFL son inmunoglobulinas que reconocen fosfolípidos y/o proteínas plasmáticas unidas a FL. Los anticuerpos que se unen directamente a FL pueden subdividirse en aquellos que se unen a FL de carga y neutra y los que se unen a FL de carga negativa. Los anticuerpos aFL que no están dirigidos contra el FL propiamente dicho, reconocen complejos formados por proteínas plasmáticas (también llamadas cofactores), las cuales sufren cambios conformacionales que les permite exponer epítopos

que pueden ser reconocidos por los aFL. Estas proteínas plasmáticas incluyen a la proteína C, proteína S, protrombina y β_2 GP-I entre otras, esta última ha sido la más estudiada. La presencia de los anticuerpos aFL no solamente se ha encontrado en pacientes con enfermedades autoinmunes, también se han encontrado en individuos sanos, pacientes con enfermedades infecciosas o malignas. En estas condiciones los anticuerpos aFL no se asocian con el desarrollo de las manifestaciones clínicas del SaF y son conocidos como aFL no-patogénicos difiriendo de aquellos encontrados en los pacientes con SaF. Los anticuerpos aFL no patogénicos son generalmente de isotipo IgM, no reconocen a la β_2 GP-I (ya sea sola o en combinación con los FL) y se unen a FL de carga negativa o neutra con baja afinidad. A diferencia de los anticuerpos aFL de isotipo IgG, los cuales se asocian con diversas manifestaciones clínicas del SaF, reaccionan contra FL de carga negativa unidos a la β_2 GP-I (u otros cofactores) y se les conoce como anticuerpos aFL patogénicos.

Durante la última década los avances en el desarrollo de técnicas de Biología Molecular han permitido entender algunos trastornos genéticos, y han ayudado a explorar los mecanismos patogénicos asociados a la enfermedad. Al inicio de los años 80's, en un intento de identificar las características que diferencian a los anticuerpos aFL patogénicos de aquellos anticuerpos que se unen a FL, pero que no causan el SaF, se empezaron a estudiar los genes que codifican para los aFL y se analizaron las secuencias derivadas de varios anticuerpos aFL monoclonales, encontrándose que algunos de los anticuerpos estaban dirigidos contra un sinnúmero de antígenos, desafortunadamente dichos anticuerpos derivaban de una amplia variedad de sujetos, algunos con manifestaciones clínicas del SaF, otros con LEG pero sin SaF y otros de individuos sanos. Esto ha dificultado su comparación debido particularmente a que los ensayos usados para definir las características de unión no son homogéneos. En la última década del siglo pasado, una nueva técnica revolucionó la forma de obtener anticuerpos, esta técnica conocida como phage display o expresión en fagos filamentosos ha permitido la obtención de anticuerpos contra prácticamente cualquier antígeno, a partir de fuentes diversas las cuales incluyen células humanas que son de gran potencial en las aplicaciones terapéuticas. En el SaF, debido a las metodologías que se han empleado para el estudio de los aFL en el humano, los reportes de los genes que codifican para dichos anticuerpos parecen no representar a los aFL patogénicos, por lo que el propósito de esta investigación, fue encontrar que genes codifican las regiones variables $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L de los anticuerpos que reconocen fosfolípidos en un paciente con SaF primario. Para cumplir con el propósito señalado se utilizó la técnica de presentación en fagos filamentosos que nos permitió crear un gran repertorio de anticuerpos.

5. Marco teórico

5.1. Antecedentes históricos del Síndrome de anti-fosfolípidos.

En 1948, Conley y cols publicaron por primera vez la presencia de anticuerpos anticoagulantes circulantes con reactividad contra fosfolípido en un paciente con LEG con prueba serológica para sífilis falsa/positiva. Este anticuerpo al que llamaron "Anticoagulante Lúpido" (AL), por tener la propiedad de interferir "in vitro" con las pruebas de coagulación en donde participan fosfolípidos, estaba relacionado con la formación de trombos, en lugar de producir sangrado como se esperaría por su efecto anti-coagulante. La primera evidencia de que el AL tenía relevancia clínica se dio en 1963 cuando Bowie y cols, reportaron la presencia de AL en 4 pacientes con LEG, que presentaron trombosis y prueba VDRL falsa/positiva; condiciones que se asociaron a la presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos (aFL).

En contraste con este estudio varios años después, en 1980 Soulier y Boffa describieron a 3 pacientes sin LEG, pero que presentaban eventos trombóticos, pérdida fetal recurrente y anticoagulante circulante. En ese mismo año otro grupo de investigadores encabezados por el Dr. Harris, describieron una técnica sensible y específica para detectar anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) en suero, esta prueba fue realizada a los 3 pacientes reportados por Soulier y Boffa quienes resultaron ser positivos, por lo que las manifestaciones clínicas descritas fueron asociadas una vez más con los anticuerpos aFL. En 1983, Huhges y cols estudiaron a un grupo de pacientes con LEG, los cuales presentaron un síndrome complejo caracterizado por trombosis, pérdida fetal recurrente, trombocitopenia y presencia de anticuerpos aCL. Debido a la asociación de los anticuerpos aCL con las manifestaciones clínicas, propusieron por primera vez llamarle Síndrome de anti-cardiolipina. Sin embargo 3 años más tarde, este mismo grupo encontró las mismas manifestaciones clínicas en pacientes sin evidencias clínicas de LEG, el estudio del suero reveló que no sólo existía la presencia de aCL, sino también estaban presentes otros anticuerpos capaces de reaccionar contra diferentes fosfolípidos de carga negativa. Este hallazgo determinó que se cambiara el nombre de Síndrome de anti-cardiolipina por el de Síndrome de anti-fosfolípidos (SaF).

En 1989, Alarcón-Segovia y Sánchez-Guerrero propusieron los criterios clínicos de clasificación para pacientes sin evidencia de presentar LEG, pero con manifestaciones del Síndrome, denominando a esta entidad clínica Síndrome de anti-fosfolípidos primario (SaFP)

para diferenciarlo del Síndrome de anti-fosfolípidos secundario o asociado que se presenta en otras enfermedades del tejido conjuntivo principalmente LEG.

5.2. Manifestaciones clínicas asociadas al Síndrome de anti-fosfolípidos primario (SaFP).

El Síndrome de anti-fosfolípidos (SaF) es una enfermedad autoinmune de carácter multifactorial en la que intervienen elementos genéticos, inmuno-rreguladores y ambientales que pueden interaccionar entre sí y producir un estado patológico. Dentro de las manifestaciones clínicas que se han correlacionado con la presencia de los anticuerpos aFL en el suero de pacientes con SaF se encuentran: trombosis venosa y/o arterial, trombocitopenia, pérdida fetal recurrente, anemia hemolítica, entre otras. Para definir mejor las diferentes manifestaciones clínicas Alarcón-Segovia y cols, en 1989, estudiaron los aCL en 500 pacientes con LEG. Los autores usaron dos estrategias, una de ellas fue el estudio de un número grande de pacientes con manifestaciones clínicas asociadas al SaF (fuera del grupo de los 500 pacientes) y la otra fue investigar la presencia de las manifestaciones en pacientes con LEG. Algunas manifestaciones clínicas como trombosis venosa, pérdida fetal recurrente, y trombocitopenia se asociaron preferentemente con los anticuerpos aFL de isotipo IgG, mientras que los anticuerpos de isotipo IgM se asociaron con anemia hemolítica y mielitis transversa.

Otro trabajo donde se estudiaron las manifestaciones clínicas y serológicas del SaF fue el realizado por Cervera y cols, quienes detectaron la presencia de anticuerpos aCL de isotipo IgG e IgM en presencia de β_2 GP-I por medio ELISA, y la actividad AL por ensayos de coagulación, en un grupo de 1000 pacientes europeos. El trabajo mostró que 87.9% de pacientes presentaban anticuerpos aCL y 53.6% AL, las manifestaciones clínicas que se asociaron con mayor fuerza a la presencia de dichos anticuerpos fueron: trombosis venosa profunda, trombocitopenia, livedo reticularis, accidente cerebral vascular, tromboflebitis superficial, embolismo pulmonar, pérdida fetal, ataque isquémico transitorio y anemia hemolítica.

5.3. Epidemiología del SaF.

A pesar de los numerosos estudios que se tienen sobre el SaF, no se conoce la prevalencia de la enfermedad. Esto se debe básicamente a que en distintos estudios se reportan datos

muchas veces discordantes, probablemente debido a diversas causas como son: diferencias entre los métodos de laboratorio utilizados y la sensibilidad de cada método, diferencia entre los valores considerados como positivos o negativos, diferencia en los criterios de diagnósticos, así como también estudios influenciados por la producción transitoria de anticuerpos anti-fosfolípidos (Gharavi AE, 1987 y Hughes G, 1996). Teniendo en cuenta estas variaciones, la prevalencia de anticuerpos anti-fosfolípidos en personas normales, no embarazadas y menores de 60 años es de aproximadamente 2-5%, incrementándose entre 12-50% en personas mayores de 60 años de edad. (Galli M, 1996; Muir K, 1994 y Brey R, 1993). Así mismo se ha visto cierta asociación con el Complejo principal de Histocompatibilidad principalmente con el alelo DR 7 (Alarcón-Segovia y cols., 1994; Asherson y cols., 1992).

5.4. Heterogeneidad de los anticuerpos aFL.

En relación con las manifestaciones clínicas asociadas a los isotipos de los anticuerpos; en 1986, Harris EN y cols publicaron que los anticuerpos aCL de isotipo IgG provenientes de pacientes con LEG, se asociaban con trombosis arterial y/o venosa, pérdida fetal recurrente, trombocitopenia y desordenes neurológicos. En un estudio realizado en 98 pacientes con LEG, se observó una alta prevalencia de anticuerpos aFL de isotipo IgG, dirigidos no sólo contra CL, sino también contra otros FL (fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico), observándose que existía una fuerte correlación de estos auto-anticuerpos con trombosis y trombocitopenia.

En 1988, se reportó que los anticuerpos aCL de isotipo IgM se asociaban fuertemente con anemia hemolítica (Deleze M y cols., 1988). Un año más tarde, se realizó un estudio para ver las manifestaciones clínicas más fuertemente asociadas con la presencia de aCL en 500 pacientes con LEG, encontrándose una fuerte asociación de los anticuerpos aFL IgG con trombosis venosa, trombocitopenia, pérdida fetal recurrente e IgM con anemia hemolítica, livedo reticularis, úlceras en piernas, oclusiones arteriales, hipertensión pulmonar y mielitis transversa (Alarcón-Segovia D, 1989). El mecanismo de acción de los anticuerpos aFL, es aún desconocido, aunque se piensa que los aCL IgM reconocen la FTC que se expone en los eritrocitos, al ser tratados con bromelina y en presencia de complemento se puede causar la hemólisis del eritrocito. (Cabral y cols., 1990). Ese mismo año, se realizó un estudio para ver la distribución de los isotipos de los anticuerpos y la frecuencia de las cadenas ligeras lambda y kappa de los anticuerpos aFL, en el suero de 20 pacientes con LEG y 16 pacientes

con sífilis con títulos altos de anticuerpos aCL. Los anticuerpos IgG2 e IgG4 con uso predominante de cadenas ligeras lambda fueron más frecuentes en pacientes con LEG, en tanto que los anticuerpos IgG1 e IgG3 con uso predominante de cadenas ligeras Kappa fueron más frecuentes en pacientes con sífilis (Levy A y cols., 1990).

En 1990, se reportó que los anticuerpos aFL que reaccionaban con FL aniónicos requerían de un cofactor, identificado como β_2 GP-I para su detección *in vitro* y se vio que no todos los anticuerpos requerían de la β_2 GP-I para su reactividad, con en el caso de los anticuerpos encontrados en pacientes con Sífilis (Matsuura y cols. 1990), mientras que otros auto anticuerpos reaccionaban con esta proteína, pero en ausencia de FL (Galli y cols., 1990 y Cabiedes y cols., 1995)

5.5. Factores proteicos asociados a los aFL.

Los fosfolípidos son estructuras poco antigénicas y aunque tradicionalmente se consideró que los fosfolípidos aniónicos eran los blancos de los aFL la situación es más compleja. El paradigma actual es que los aFL pueden reaccionar contra una gran variedad de proteínas plasmáticas, las cuales sufren cambios conformacionales al unirse a estructuras con carga negativa, formando un complejo fosfolípido/proteína. Dentro de las proteínas plasmáticas reportadas se encuentran la protrombina, proteína C, proteína S, quinínogeno, anti-trombina III y otras proteínas unidoras de fosfolípidos como la anexina V y la β_2 GP-I, hoy en día se ha visto que cada una de estas proteínas juega un papel importante en el SaF (Roubey, 1996).

β_2 glicoproteína I.

La β_2 GP-I es una proteína sérica que se encuentra presente en todas los individuos sanos, interviene en algunos procesos de coagulación/anticoagulación. El estudio de esta proteína en la patogenia del SaF despertó gran interés en 1990, cuando tres grupos de investigadores de manera independiente y prácticamente simultánea reportaron, que los anticuerpos aFL requerían de una proteína con afinidad por estructuras aniónicas para su detección *in vitro*, la proteína fue identificada como β_2 -glicoproteína-I (β_2 GP-I). La identificación se basó en la observación de que al purificar los anticuerpos aFL (mediante cromatografía de intercambio iónico o de afinidad a fosfolípidos), estos no se unían a los fosfolípidos a menos que adicionara plasma, suero humano o suero bovino (Galli M y cols., McNeil HP y cols. y

Matsuura E y cols.,1990). Actualmente es el cofactor de los aFL más estudiado. Uno de los fosfolípidos con el que la β_2 GP-I forma complejos es la cardiolípin (CL). En un estudio en el que se determinó la estructura de la β_2 GP-I, en presencia de diferentes FL por medio de dicroísmo circular se observó que la molécula se modificó cuando interactuó con CL ó fosfatidíserina, también se demostró que ésta interacción produce cambios conformacionales importantes en ambas moléculas (Subang R y cols. 2000). Hoy en día se piensa que la unión de los anticuerpos aCL a la β_2 GP-I, ocurre a través de epítopes conformacionales que se exponen en esta molécula cuando se une a fosfolípidos aniónicos o a superficies oxidadas ó que reaccionan directamente con la molécula nativa de β_2 GP-I, en cuyo caso necesita estar en altas concentraciones debido a la baja afinidad de los anticuerpos a β_2 GP-I. (Matsuura E y cols., 1994 y Tincani A y cols., 1996).

En 1992, se observó que los aFL asociados a infecciones (sífilis, malaria, hepatitis A y tuberculosis, etc.) no requieren la presencia de la β_2 GP-I para unirse a los FLs de carga negativa, como los encontrados en pacientes con LEG y SaF, lo que generó mucho interés ya que estos últimos son los que se han relacionado con los fenómenos tromboembólicos (Hunt JE y cols., 1992). Ese mismo año, la capacidad inmunogénica y patogénica de la β_2 GP-I se vio sustentada por los estudios de Gharavi en modelos animales, en los que se demostró que la inmunización de ratones NZW/NZBF1 con β_2 GP-I indujo no sólo la producción de anticuerpos anti- β_2 GP-I sino también de anticuerpos aCL y que estos ratones presentaron además prolongación del TTP, trombosis y resorción fetal.

La β_2 GP-I humana fue identificada en 1961. Es una proteína de 50 kD, está altamente glicosilada y tiene un alto contenido de prolina (Sheng Y y cols., 1998), también se le conoce como apolipoproteína H pues activa la lipasa de la lipoproteína *in vitro*. Su concentración en plasma es de 200 ug/mL y en un 40% se encuentra asociada con lipoproteínas. En el humano el gene que codifica para la β_2 GP-I se localiza en el cromosoma 17 (Haagerup A y cols., 1991). La proteína esta formada por 326 aminoácidos (aa) precedida de una secuencia "líder" de 19 aa. La secuencia de aa es compartida en un 84% entre humanos y otras especies de mamíferos (murinos y bovinos). Su estructura se parece a la superfamilia de proteínas de control del complemento, posee cinco dominios repetidos homólogos conocidos como segmentos cortos repetidos (SCRs, del inglés *short consensus repeats*), cada uno tiene aproximadamente 60 aminoácidos con puentes disulfuro inter e intra-regiones, el 5º dominio tiene una región carboxiterminal aberrante y es altamente catiónico por su gran contenido

de lisina y arginina (Medhi H y cols., Steinkasserer A y cols. y Kato H y cols., 1991; Bendixen E y cols., 1992). La sustitución de los residuos de cisteína o del quinto dominio anula la unión de la β_2 GP-I a los fosfolípidos aniónicos. En este dominio se encuentra el sitio de unión a los fosfolípidos y cuando menos un epítoto reconocido por los aCL (Reid KBM y Day AJ 1993; Wang M-X y cols., 1995).

Aunque su papel fisiológico no se conoce con exactitud se sabe que tiene actividad de anticoagulante natural ya que inhibe la vía intrínseca de la cascada de la coagulación, inhibe la actividad de protrombinasa, y la agregación plaquetaria dependiente de ADP y se une a sustancias con carga negativa como fosfolípidos, heparina, lipoproteínas y plaquetas activadas (Schousboe I, 1985 y Nimpf J y cols., 1987).

5.6. Análisis molecular de los aFL.

No obstante los intensos trabajos sobre la caracterización de los auto-anticuerpos aFL, las bases celulares de su producción y la fuerte asociación con el Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II, muy poco se sabe acerca del uso de los genes de la región variable de los aFL. La creación y el desarrollo de anticuerpos anti-fosfolípidos monoclonales ha permitido estudiar a los FL como inductores o blancos antigénicos e investigar a nivel molecular la estructura y genes $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L que codifican para dichos anticuerpos.

También se sabe que un alto grado de diversidad de las regiones IgV es generado durante el desarrollo de la célula B por un proceso llamado recombinación somática, donde las secuencias que codifican las regiones variables son re-arregladas a partir de 3 tipos de segmentos génicos diferentes V_H , D y J_H que codifican para la cadena pesada y 2 segmentos génicos V_L y J_L que codifican para las cadenas ligeras de los anticuerpos. Además de la diversidad generada por este proceso, pueden haber una alteración en el uso de los arreglos de los genes de la región variable, lo que puede jugar un papel importante en la producción de los auto-anticuerpos debido a que en el proceso de recombinación somática puede existir un uso preferencial de ciertos genes $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L que podrían llevar a la generación de un repertorio de células B enriquecidas con receptores que reconocen auto-antígenos.

Recientemente Giles P y cols realizaron un análisis de las secuencias de aFL publicadas hasta 1999. De 36 aFL monoclonales estudiados, 22 fueron de isotipo IgM y 14 de isotipo IgG. En el trabajo de Giles los anticuerpos IgM fueron divididos en 2 grupos; 1) grupo A.

Esta formado por 15 anticuerpos polirreactivos; y 2) grupo B. Formado por 7 anticuerpos IgM los cuales tienen probablemente más relevancia en la patogénesis del SaF (Tabla I). El grupo A incluye los AcMo que fueron seleccionados por su unión a DNA e incidentalmente se encontró que tenían reactividad cruzada contra FL. La mayoría provienen de linfocitos de individuos sanos y solo 4 (m18/2, m1/17, C119 y C471) de pacientes con LEG. En el grupo B la mayoría de los AcMo mostraron especificidad por FL con excepción del anticuerpo REN el cual además reconocía DNACs. Tres anticuerpos que mostraron actividad de AL (BH1, B9421 y B9427) provenían de pacientes con SaF.

En relación con los AcMo IgG, 7 provenían de pacientes con LEG, 1 de un pacientes con SAFS y 2 fueron de pacientes con SaFP. La mayoría mostraron especificidad contra FL o β_2 GP-I. Los AcMo 516 y 519 mostraron ser patogénicos al inducir resorción fetal y una reducción significativa en el peso fetal y placentario después de transferencia intravenosa en ratones BALB/c (Tabla 2).

El análisis de los anticuerpos mostró que 28 de las secuencias publicadas usaron las familias VH1, VH3 y VH4. De estas familias el gen más usado fue el V3-23, el cual se re-arregla con mayor frecuencia en células B secretoras de IgM. Otros genes re-arreglados fueron V3-30, V3-07, V4-34, V4-39, V4-59, V1-18, V1-69 y V5-51. Por otro parte los genes JH que se identificaron en 26 AcMo fueron JH3, JH4 y JH6, los cuales son los genes que se re-arreglan con mayor frecuencia en células B periféricas.

En cuanto a las cadenas ligeras, todos los AcMo IgM polireactivos e IgG y 5 de los 7 aFL IgM específicos usaron genes que pertenecen a las 3 familias más re-arregladas en sujetos sanos: VK (I-III) o VL (1-3). Los genes VK re-arreglados fueron: A3, A17, A20, O2/12, L8, L12, L6, A27, L2 y B3, mientras que los V λ que mostraron una mayor frecuencia en los re-arreglos fueron lb, lc, le, 2^a2, 2b2, 2c, 3h y 3r. Los genes V λ se re-arreglaron con los segmentos J λ 2, J λ 3, mientras que los genes V κ se re-arreglaron con los segmentos J κ 2, J κ 3 y J κ 4.

El análisis de las mutaciones mostró que los aFL monoclonales IgG contenían un gran número de mutaciones somáticas en las regiones variables específicamente en los CDR'S, en comparación con los anticuerpos IgM (Shlomchik y cols., 1990 y Menon S y cols., 1997). Además se observó que los aFL presentan una acumulación de los amino ácidos de Arg, Lys y Asn en los sitios de contacto. La evidencia más fuerte de esta acumulación se observó en los anticuerpos anti-DNA (Radic MZ y cols., 1994 y Isenberg DA y cols., 1997). El alto grado de mutaciones somáticas en los CDR's de los anticuerpos de isotipo IgG, probablemente se debe al cambio del isotipo del anticuerpo o a la hipermutación somática ya que los aFL de isotipo IgM del grupo B mostraron muy pocas mutaciones somáticas.

Tabla 1. Características de las secuencias de los aFL IgM polireactivos, mono-u oligoreactivos.

AcMo	Origen	Gen V _H	D _H	J _H	Familia V _L	Gen V _L	J _L	Antígeno	Ref.
Grupo A									
M18/2	CMSP LEG	V3-23	NI	NI	NP	NP	NP	DNAcS, plaq, poly-I/dT	Dersimonian H.
M1/17	CMSP LEG	V3-23	NI	NI	NP	NP	NP	DNAcS, plaq. Vimentina	Dersimonian H.
C6B2	Cel. Bazo	V4-61	D3-10	J _H 3b	NP	NP	NP	Poly-G/I/U, DNAcS/cd, Poli-dA-dT, CL	Hoch S y cols.
Kim4.6	Amígdala	V3-30	D3-10	J _H 6a	VA1	1b	NI	RNA, CL, DNAcS/cd, poli-dA-dT, dG-dC	Siminovitch K.A.
A10	CMSP SS	V6-01	NI	J _H 6a	NP	NP	NP	DNAcS/cd, CL, PdT, LYH	Logtenberg T.
A431	CMSP SS	V6-01	NI	J _H 6a	NP	NP	NP	DNAcS/cd, PdT, Cit-C, CL	Logtenberg T.
L16	Hígado fetal	V6-01	NI	J _H 6a	NP	NP	NP	DNAcS, CL, poly dT	Logtenberg T.
C119	CMSP LEG	V3-23	NI	NI	Vk3	L6	Jλ4	DNAcS, plq, CL DOPE	Rioux J.D. y cols.
B122	CMSP SS	V1-18	NI	NI	Vk1	L12a	NI	DNAcS, plq, CL, DOPE	Rioux J.D. y cols.
B6204	CMSP SS	V3-23	NI	NI	Vk3	A27	NI	DNAcS, plq, CL, DOPE, FR	Rioux J.D. y cols.
C471	CMSP LEG	V3-64	NI	NI	Vk3	L2	Jλ2	DNAcS, plq, DOPE	Rioux J.D. y cols.
H3	CMSP SS	V1-46	D6-13	J _H 4	Vk3	31	Jλ2/3 a	CL, FTS, FTE, TD, TT	Hohmann A. y cols.
H5	CMSP SS	V4-30	DIRL	J _H 4	NP	NP	NP	CL, TD, TT	Hohmann A. y cols.
A5	CMSP SS	V3-23	DHF16	J _H 6	VA3	3p	Jλ2/3 a	CL, TD, TT, DNAcS	Hohmann A. y cols.
Bou53.6	Amígdala	V3-23	D4	J _H 6	Vk1	L12	Jλ2	CL, polirreactivo	Hohmann A. y cols.

Grupo B

Kim13.1	Amígdala	1-e	NI	J _H 5b	Vk3	L6	Jλ4	CL, FR	Siminovitch K.A.
REN	CLL	V4-61	NI	J _H 3b	Vλ8	8a	Jλ3b	CL, DNACs	Mariette X. y cols.
BH1	CMSP SaFP	V3-30	NI	NI	Vλ3	3r	Jλ3b	FL aniónicos	Harmer I.J. y cols.
STO 103	Amígdala	V4-61	D3-30	J _H 4a	VkIV	B3	Jλ2	Plq, FL aniónicos	Denomme G.A. y cols.
RSP 4	CMSP LEG	V3-30	D4-23	J _H 4b	Vλ1	1e	Jλ1	CL	Demaison C y cols
B9421	CMSP SaF	V3-72	D21-9	J _H 3	Vλ2	2a2	Jλ3b	AL	Lai C.J. y cols.
B9427	CMSP SaF	V3-15	D21-9	J _H 4	Vλ2	A17	Jλ3	AL	Lai C.J. y cols

Abreviaturas: CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; LEG: Lupus eritematoso generalizado; SS: Sujeto sano; NI: No identificado; NP: No publicado; LYH: Lisosima de yema de huevo; Cit-C: Citocromo-C; DOPE: Dioleifosfatidiletanolamina; FR: Factor reumatoide; TD: Toxoide diftérico; TT: Toxoide tetánico; DIRL: Gen D con espaciadores irregulares; DNACs: DNA de cadena doble; DNACs: DNA de cadena simple; FTS: Fosfatidilserina; FTE: Fosfatidiletanolamina; CL: Cardiolipina; Plq: Plaquetas; AL: anticoagulante lúpico; Poli-dA-dT: Sal sódica del polideoxiadenilato-timidilato; Poli dG-poli dC: polideoxiguanilato-polideoxicitidilato. Poli-dT: Poli deoxitimidilato; Poli G: Ácido poliguanólico; Poli U: Poliuracilo.

Tabla 2. Características de los aFL de isotipo IgG

AcMo	Origen	Gen V _H	D _H	J _H	Familia V _L	Gen V _L	J _L	Antígeno	
R149	CMSP LEG	V1-69	NI	J _H 6a	Vk2	A19	Jk2	DNACs	Van Es J.H. y cols.
LJ-1	CMSP LEG	NP	NP	NP	Vλ3	3h	Jλ2/Jλ3a	Histonas	Menon S y cols.
AH2	CMSP LEG	V5-51	D4-23	J _H 6a	Vλ1	le	Jλ3b	No	Menon S y cols.
DA-3	CMSP LEG	V5-51	D3-09	J _H 6a	Vλ1	le	Jλ3b	Histonas	Menon S y cols.
UK-4	CMSP LEG	V3-74	NI	J _H 4a	Vλ2	2a2	Jλ2/Jλ3a	No	Menon S y cols.
516	CMSP SaFP	V1-69	D3-10	J _H 6a	Vk1	L19	Jk4	DNACsrh, insulina, TT, Tirh, ASB	Ikematsu W. y cols.
519	CMSP SS	V4-34	NI	J _H 5a	Vk3	L2	Jk4	No	Ikematsu W. y cols.
B941 6	CMSP SaFS	V3-23	NI	J _H 4b	Vk1	012/0 2	Jk1	No	Lai C.J. y cols.
HL-5B	CMSP SaFP	V3-53	NI	NI	NP	NP	NP	oxLDL	von Landenbe rg C. y cols.
RR- 7F	CMSP LEG	V3-24	NI	NI	NP	NP	NP	oxLDL	von Landenbe rg C. y cols.
B14	PF sano	V3-23	D2-15	J _H 4b	Vk1	A20	Jk2	No	Chukwu cha R.U. y cols.
B22	PF sano	V6-01	NI	J _H 4a	Vk1	A20	Jk3	No	Chukwu cha R.U. y cols.
B27	PF sano	V6-01	NI	J _H 4a	Vk1	L15	Jk4	No	Chukwu cha R.U. y cols.
P11	PF sano	V4-30	D3-03	J _H 4b	Vk1	L8	Jk3	PT, DNACs, OVA	Chukwu cha R.U. y cols.

Abreviaturas: CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; LEG: Lupus eritematoso generalizado; SS: Sujeto sano; NI: No identificado; NP: No publicado; TT: Toxoide tetánico; DNACs: DNA de cadena simple; oxLDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas; PT: Protrombina; ASB: Albúmina sérica bovina; Tirh: Tiroglobulina humana; DNACsrh: DNA de cadena simple recombinante humano; OVA: Ovalbúmina.

Fagos filamentosos.

5.7. Estructura del bacteriófago filamentosos.

Los bacteriófagos son virus capaces de infectar una gran variedad de bacterias Gram-negativas utilizando el pilus como receptor. Existen tres tipos de bacteriófagos: f', fd y M13, cuya secuencia de DNA muestra un 98% de homología entre ellos y tienen la característica de no lisar a la célula hospedera durante la infección. Tienen forma de fibras largas de aproximadamente 930 nm de longitud y 6.5 nm de diámetro. Su masa es de 16.3 mD, de los cuales el 87% se atribuye a una serie de proteínas reunidas en forma cilíndrica que conforman la cápside del virión. Esta cápside encierra un DNA circular de cadena sencilla (cadena +) cuyo genoma se conoce por completo (Van Wezenbeek y cols., 1980; Beck y Zink, 1981 y Hill y Petersen, 1982). El DNA esta formado por 6407 pares de bases y codifica para 11 genes (Tabla 3), los cuales están agrupados en el genoma de acuerdo a su función en el ciclo de vida del fago. Cinco genes codifican para las proteínas estructurales del virión (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX), tres se requieren para la síntesis del DNA (pII, pV y pX) y tres interactúan en las funciones de ensamblaje (pI, pIV y XI). Además hay una secuencia corta llamada región intergénica (IG) que no codifica para proteínas, pero contiene secuencias importantes para que se lleve a cabo la síntesis del DNA (origen + y origen -), la iniciación de la formación de la cápside y de la terminación de la síntesis del RNA. La cápside del fago se encuentra conformada por aproximadamente 2710 copias de la proteína pVIII. En uno de los extremos del virión se encuentran cinco copias de cada una de las proteínas minoritarias pVI y pIII, ésta última es la responsable del reconocimiento del pili F' por la *Escherichia coli* para iniciar la infección (Gramatikoff y cols., 1994 y Grany y cols., 1981). En el otro extremo del fago se encuentran las proteínas minoritarias pVII y pIX, esta parte del virión es la última en penetrar a la célula durante la infección y la primera en emerger durante la morfogénesis (Fig. I)

5.8. Ciclo de infección del fago M13.

El ciclo inicia con el reconocimiento del fago mediante el amino terminal de la proteína pIII (producto del gen III) por el pili (factor F') de la bacteria macho F+ (*E. coli*). Una vez unido, el fago es atraído a la superficie de la bacteria, las proteínas de la cápside se disocian en la membrana interna y el DNA del virus, que es circular y de cadena sencilla (cadena +) penetra a la bacteria (Gramatikoff y cols., 1994). La replicación del DNA del fago ocurre en tres fases principales, en todas ellas participa la región intergénica

(IG). En la primera, la RNA polimerasa y la maquinaria de síntesis del DNA del hospedero interactúan con la cadena positiva (+) para crear un DNA de cadena doble o forma replicativa (FR), al sintetizarse la cadena negativa (-), este paso no requiere la participación de ninguna de las proteínas codificadas por el genoma viral.

Tabla 3. Genes que codifican para las proteínas estructurales del virión.

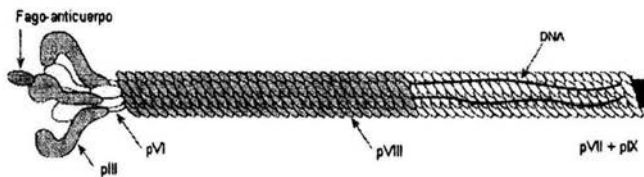
Gene	Función	No. de amino ácidos	PM
II	Replicación del DNA	410	46,137
X	Replicación del DNA	111	12,672
V	Unión al DNACs	87	9,682
VIII	Proteína mayoritaria de la cápside	50	5,235
III	Proteína minoritaria de la cápside	406	42,522
VI	Proteína minoritaria de la cápside	112	12,342
VII	Proteína minoritaria de la cápside	33	3,599
IX	Proteína minoritaria de la cápside	32	3,650
I	Ensamblaje	348	39,502
IV	Ensamblaje	405	43,476
XI	Ensamblaje	108	12,424

La molécula inicial de doble cadena sirve como templado para la replicación, transcripción y síntesis de las diez proteínas del fago (pI-pX). Una de las proteínas expresadas por el fago (gen II) hace un corte específico en la cadena (+) del DNA de doble cadena y el extremo 3' resultante es elongado por la maquinaria de síntesis del DNA de la bacteria hasta que alcanza el doble de la longitud unitaria. La cadena desplazada es cortada y circularizada de forma concertada para dar una cadena sencilla de DNA circular la cual se empaqueta en una nueva partícula de fago. El proceso de ensamblaje del virus inicia con la acumulación del producto del gen V (pV), el cual es una proteína de unión a DNA de cadena sencilla que se junta a lo largo del proceso y que secuestra al DNA recién sintetizado, impidiendo la generación de más DNA en forma replicativa y lo moviliza hacia la membrana de la bacteria donde se da el ensamblaje del virus maduro, por el intercambio de pV que cubre al DNA con el producto del gen VIII (pVIII) el cual se acumula en la membrana por medio de una pequeña cola hidrofóbica que la inserta. Posteriormente se pierde la cola hidrofóbica al

intercambiarse por pV y empezar a cubrir al DNA. Este mismo proceso de sustitución elimina el virus hacia el exterior de la membrana al mismo tiempo que se agregan los demás componentes del virus maduro que son el producto del gen III, que es la proteína de unión al pili y los productos de los genes VI, VII y IX los cuales forman la punta del otro extremo del virus maduro (Fig. 2).

El control metabólico de la producción del virus se da por competencia entre el producto del gen II que induce la forma replicativa y el producto del gen V que secuestra al DNA de cadena sencilla para formar virus maduros. (Model y Russel, 1988). La producción del fago se da hasta que eventualmente la célula muere por la acumulación de componentes tóxicos del fago (pIII) o productos de desecho de la célula.

Fig. I Representación esquemática del fago filamentoso.



Los fagos filamentosos miden aprox. 930 nm de longitud y 6.5 nm de diámetro, está formado por aprox. 2710 copias de la proteína mayoritaria pVIII reunidas en forma cilíndrica. En uno de los extremos se encuentran cinco copias de cada una de las proteínas minoritarias pVI y pIII y en el otro extremo se encuentran las proteínas minoritarias pVII y pIX.

5.9. Características de los fagos filamentosos.

Los fagos filamentosos son buenos vectores de expresión de péptidos debido a las siguientes características:

Tiene una estructura bien conocida.

Son fáciles de manejar

La superficie del virión es de baja complejidad.

El procesamiento de las proteínas de su cápside se conoce bien.

Su genoma es pequeño y expandible, el virión es capaz de aceptar 40,000 nucleótidos extra dentro de su genoma sin que esto afecte su infectividad.

Se conoce su secuencia genómica.

El virión es físicamente resistente al calor, frío, urea, pH bajo y concentración alta de sales.

Es fácil de secuenciar.

Permite la clonación de casetes de resistencia.

Es sencillo de cultivar y almacenar.

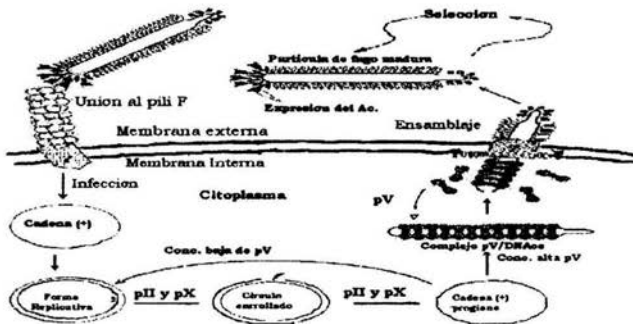
Produce de 100-1000 viriones M13 por célula.

No lisa las células.

Se pueden insertar genes extra dentro de su genoma y permanece estable.

Todas estas características han hecho posible la expresión de proteínas, dominios de proteínas y péptidos en la superficie del fago M13, iniciándose con la clonación del gen externo (polipéptido) al extremo 5' del gene III, de ésta manera la fusión le permite al fago exponer la proteína híbrida en el exterior de su cápside (Smith, 1985).

Fig. 2 Representación esquemática del ciclo de vida del bacteriofago M13.



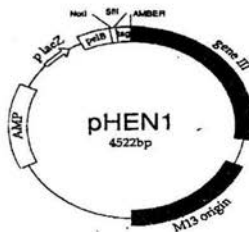
El fago filamentos M13 reconoce el F' de las células macho (F+), mediante el amino terminal de la proteína pIII. Al penetrar la cadena (+) las proteínas II y X interactúan en la replicación del DNA. La cadena (+) funciona como templado para la formación de la forma replicativa (FR). Cuando el complejo es dirigido hacia la membrana de la bacteria las proteínas I y IV ayudan en el proceso de morfogénesis y la liberación del virión.

5.10. Fagémido pHEN 1.

El fagémido pHEN1 es un vector de 4522 pb que cuenta con 2 orígenes de replicación los cuales provienen del fago M13 y de la *E. coli*. Se construyó a partir del plásmido pUC119 (Hoogenboom y cols., 1991). Este vector permite la clonación de polipéptidos y su expresión en la cápside del fago filamentoso M13 en forma de una proteína híbrida (péptido-pIII), siempre y cuando el hospedero sea una cepa de *E. coli* supresora (TG1). El proceso se puede llevar a cabo gracias a que la cepa TG1 reconoce el codón ámbar (situado entre el gen externo y el gen de la pIII) como si fuera el codón que codifica una glicina; en el caso de una cepa no supresora de *E. coli* (HB2151) los péptidos son secretados en su forma soluble, ya que el codón de paro es respetado y por lo tanto el péptido clonado es liberado.

Entre sus características importantes se encuentran: un casete de resistencia a ampicilina (amp), un promotor LacZ (*PlacZ*) y una secuencia líder (*pelB*) que se encarga de dirigir a la proteína hacia el espacio periplásmico. Los sitios de restricción SfiI y NotI, son usados para clonar péptidos. Cuando se encuentra en *E. coli* se replica como doble cadena y cuando se adiciona un fago ayudador (VSC-M13) es encapsulado en una partícula viral debido a que la proteína II del fago ayudador reconoce el sitio de replicación para el fago M13 (*oriM13*), de esta forma el proceso termina en el encapsulamiento del material genético en su forma de cadena sencilla. (Fig. 3)

Fig. 3 Fagémido pHEN 1



Representación esquemática del vector pHEN1 donde se muestran los sitios de restricción usados (Sfi I/Not I) para la clonación de los genes re-arreglados $V_H(D)J_H$ y V_L , para que pueda ser expresada la proteína híbrida scFv-pIII, gIII del fago filamentoso fd, *placZ*, promotor *lacZ*, amp gen de resistencia a ampicilina, *pelB* secuencia líder c-myc tag.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores y en un intento por conocer los genes que codifican para los auto-anticuerpos aFL nuestra hipótesis y objetivos son:

6. Hipótesis:

Los anticuerpos anti-fosfolípidos/cofactores presentes en sujetos sanos y en pacientes con SaFP son diferentes, en consecuencia los genes que codifican para dichos anticuerpos son diferentes y sufren mayor grado de hipermutación somática en los pacientes que en los individuos sanos.

7. Objetivo general:

Estudiar el repertorio de genes V , que codifican las regiones variables $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L de los anticuerpos que reconocen fosfolípidos en pacientes con SaF primario.

Objetivos específicos:

- 1) Construir dos bibliotecas de re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L provenientes de un paciente con SaFP por medio de la técnica de presentación en fagos filamentosos.
- 2) Caracterizar ambas bibliotecas.
- 3) Seleccionar cada biblioteca contra un panel de antígenos específicos (β_2 GPI y protrombina).
- 4) Caracterizar los anticuerpos seleccionados atendiendo a su secuencia y especificidad

8. Material y métodos.

8.1. Sujeto de estudio.

Paciente con Síndrome de anti-fosfolípido primario que se atiende en el departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, que reúne los criterios de clasificación para el diagnóstico de SaF, propuestos en 1992 por Alarcón- Segovia y colaboradores y que presenta títulos altos de anticuerpos anti- β_2 GP-I.

8.2. Determinación de los anticuerpos anti- β_2 GP-I.

Los anticuerpos anti- β_2 GP-I se determinaron por la técnica de ELISA utilizando β_2 GP-I como antígeno. El método usado fue el descrito en nuestro laboratorio por Cabral y cols, 1995.

8.3. Purificación de células mononucleares.

Se tomó una muestra de 60 mL de sangre periférica por punción venosa, para la obtención de células mononucleares mediante gradiente de densidad. En tubos de 50 mL se colocaron 20 mL de sangre que se diluyeron con 2 volúmenes de PBS. A cada tubo se le adicionó hasta el fondo 12 mL de Ficoll Hypaque sin romper el gradiente y después de centrifugar 20 min a 1500 rpm, se recuperó el anillo de células mononucleares que se lavaron con PBS y se congelaron a -70°C hasta su uso.

8.4. Purificación del ácido ribonucleico (RNA).

El RNA total se aisló mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi. Las células mononucleares se resuspendieron en 1 mL de una solución la cual contiene fenol y tiocianato de guanidina. Después de centrifugar se obtuvo la fase acuosa que se precipitó con isopropanol, se lavó 2 veces con etanol al 70% y el pellet se resuspendió en 40 μL de agua DEPC.

8.5. Obtención del DNA complementario (cDNA).

El RNA obtenido fue utilizado para la síntesis de DNA complementario (cDNA), mediante transcriptasa reversa (1st Strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR AMV) de BOEHRINGER MANNHEIM. Brevemente, se preparó una mezcla de 20 μ L por reacción que contenía: 1X de solución amortiguadora (100mM Tris, 500 mM KCL; pH8.3), 5mM de $MgCl_2$, 1mM de una mezcla de dNTPs, 50U de inhibidor de RNAasa, 20U de la enzima transcriptasa reversa y 3.2 μ g oligonucleótidos hexámeros al azar. La síntesis de DNac se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler 40 STRATAGENE y las condiciones de reacción fueron las siguientes: 10 min. a 25°C, para el alineamiento de los hexámeros; 45 min. a 45°C para la síntesis de las cadenas complementarias y 5 min. a 99°C para inactivar la enzima transcriptasa reversa. El producto obtenido fue utilizado como templado para la amplificación de los re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L .

8.6. Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L .

La amplificación de los de los re-arreglos $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L y del fragmento unidor se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se preparó una reacción de 20 μ L que contenía: 1X de solución amortiguadora para la enzima Vent DNA polimerasa (10mM de KCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 20mM de Tris-HCL pH 8.8, 2mM de $MgSO_4$, (0.1% de Tritón X-100), 2.5mM de una mezcla de dNTPs y 0.8U de la enzima Vent DNA polimerasa (NEB). A la mezcla se le adicionaron 10 pmol/reacción de oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada familia V_H o V_L (tabla 4). Las condiciones de reacción en el caso de los genes V_H y V_L (κ y λ) fueron: 4min. a 94°C; 25 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 57°C y 1 min. a 72°C y 1 ciclo de 10 min. a 72°C.

8.7. Obtención del fragmento unidor.

Se amplificó un fragmento unidor utilizando como templado el plásmido X4-A27, el cual proviene del vector pCANTAB 5b que en su sitio de clonación múltiple posee un scFv formado por el gen DP47 que pertenece a la familia VH3 de humano y el gen A27. Ambos genes se encuentran ensamblados a través de un unidor compuesto de una serina (S) y

cuatro glicinas (G), repetidas tres veces (SG₄)₃. (Almagro y cols). En este caso las condiciones de reacción fueron las siguientes: 4 min. a 94°C; 25 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C y 1 min. a 72°C y 1 ciclo de 10 min. a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (NE), con el objeto de verificar el tamaño y la concentración de los productos. En la tabla 5 se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

8.8. Obtención de los anticuerpos en formato scFvs.

Una vez amplificados los re-arreglos V_H(D)_HJ_H y V_LJ_L de ambas cadenas y el fragmento unidor, éstos fueron ensamblados mediante PCR sobrelapado para obtener dos mezclas de fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs), uno que lleva la cadena lambda y el otro la cadena kappa. En cada uno de los casos los re-arreglos V_KJ_K o V_LJ_L se pueden combinar con cualquiera de los re-arreglos V_H(D)_HJ_H contenidos en la mezcla y los re-arreglos V_H(D)_HJ_H/ V_KJ_K y V_LJ_L quedaron unidos por el fragmento unidor.

Para la reacción de PCR se preparó una mezcla que contenía: los re-arreglos V_H(D)_HJ_H (175ng/μL totales), los re-arreglos V_KJ_K ó V_LJ_L (150ng/μL totales) y el fragmento unidor (60ng/μL totales). A la mezcla de DNAs se le adicionó 1X de solución amortiguadora para la enzima Vent DNA polimerasa (10mM de KCL, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM de Tris-HCL pH 8.8, 2mM de MgSO₄ (0.1% de Tritón X-100), 2.5mM de una mezcla de dNTPs y 0.8U de la enzima Vent DNA polimerasa y se llevó a un volumen final de 25 μL. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 4 min. a 94°C; 25 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 64°C y 1 min. a 72°C y 1 ciclo de 10 min. a 72°C.

Tabla 4.

Oligonucleótidos empleados para amplificar las cadenas pesadas y ligeras:

Cadena amplificada	Secuencia de los Oligonucleótidos
Amplificado de la cadena V_H	VH1a 5'-CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3' VH2a 5'-CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG- 3' VH3a 5'-GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3' VH4a 5'-CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG-3' VH5a 5'-GAG GTG CAG CGT TTG CAG TCT GC-3' VH6a 5'-CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG- 3' JH1-2 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC-3' JH3 5'-TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC- 3' JH4-5 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC-3' JH6 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC-3'
Amplificado de la cadena V_K	VK1a 5'-GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC- 3' VK2a 5'-GAT GTT GTG ATG ACT BCAG TCT CC-3' VK3a 5'-GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC - 3' VK4a 5'-GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC- 3' VK5a 5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC- 3' VK6a 5'-GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC- 3' JK1 5'-ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC-3' JK2 5'-ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC-3' JK3 5'-ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC-3' JK4 5'-ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3' JK5 5'-ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC-3'
Amplificado de la cadena V_λ	Vλ1a 5'-CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC-3' Vλ2a 5'-CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC-3' Vλ3a 5'-TCC TAT GTG CTGACT CAG CCA CC- 3' Vλ13a 5'-TCT TCT GAG CTG ACT CAA CCG CC- 3' Vλ4a 5'-CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC- 3' Vλ5a 5'-CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCC CA-3' Vλ6a 5'-AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA- 3' Jλ1 5'-ACC TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC-3' Jλ2-3 5'-ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC-3' Jλ4-5 5'-ACC TAA AAC GGT GAG CTG GGT CCC-3'

Tabla 5.

Oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento unidor y la introducción de los sitios de restricción:

Oligonucleótidos para amplificar el fragmento unidor	
λ1Fv	5'-GGC GGC TGC GTC AAC ACA GAC TGC GAT CCG CCA CCG CCA GAG-3'
λ2Fv	5'-GCA GGC TGA GTC AGA GCA GAC TGC GAT CCG CCA CCG CCA GAG-3'
λ3aFv	5'-GGT GGC TGA GTC AGC ACA TAG GAC GAT CCG CCA CCG CCA GAG-3'
λ3bFv	5'-GGG TCC TGA GTC AGC TCA GAA GAC GAT CCG CCA CCG CCA GAG-3'
λ4Fv	5'-GGC GGT TGA GTC AGT ATA ACG TGC GAT CCG CCA CCG CCA GAG-3'
λ5Fv	5'-GAC GGC TGA GTC AGC ACA GAC TGC GAT CCG CCA CCG CCA GAG-3'
λ6Fv	5'-TGG GGC TGA GTC AGC ATA AAA TTC GAT CCG CCA CCG CCA GAG-3'
VK1	5'-GGA GAC TGG GTC ATC TGG ATG TCC GAT CCG CC-3'
VK2a	5'-GGA GAC TGA GTC ATC ACA ACA TCC GAT CCG CC-3'
VK3a	5'-GGA GAC TGC GTC AAC ACA ATT TCC GAT CCG CC-3'
VK4a	5'-GGA GAC TGC GTC ATC ACG ATG TCC GAT CCG CC-3'
VK5a	5'-GGA GAC TGC GTG AGT GTC GTT TCC GAT CCG CC-3'
VK6a	5'-GGA GAC TGA GTC AGC ACA ATT TCC GAT CCG CC-3'
JH1-2	5'-GCA CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G-3'
JH3	5'-GGA CAA TGG TCA CCG TCT CTT CAG GTG G-3'
JH4-5	5'-GAA CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G-3'
JH6	5'-GGA CCA CGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G-3'
Oligonucleótidos para introducir los sitios de restricción.	
VH1aSfi5'	5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'
VH2aSfi5'	5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG-3'
VH3aSfi5'	5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATC GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3'
VH4aSfi5'	5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG-3'
VH5aSfi5'	5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'
VH6aSfi5'	5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'

JK1Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC-3'

JK2Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC-3'

JK3Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC-3'

JK4Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'

JK5Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC-3'

Jλ1Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC-3'

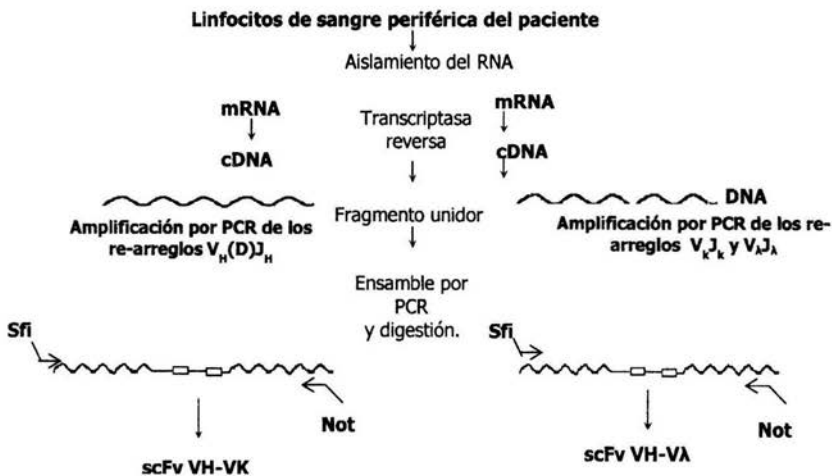
Jλ2-3Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC-3'

Jλ4-5Not 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC TAA AAC GGT GAG CTG GGT CCC-3'

8.9. Introducción de los sitios de restricción en los scFvs.

Una vez ensamblados los re-arreglos $V_H(D)J_H-V_KJ_K$, se utilizaron como template para una PCR, donde se introdujeron los sitios para las enzimas de restricción Not I y Sfi I. Brevemente, se preparó una mezcla de 25 μ L que contenía: 1X de solución amortiguadora para PCR, 2.5mM de una mezcla de dNTPs, 0.8U de la enzima Vent DNA polimerasa y 10pmol de cada uno de los oligonucleótidos que contenían los sitios para las enzimas de restricción Sfi I y Not I (ver secuencias en la tabla 5). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 4 min. a 94°C; 25 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 64°C y 1 min. a 72°C y 1 ciclo de 10 min. a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.6% para determinar su tamaño, y se purificaron mediante columnas de membrana de sílica (QIAquick Gel Extraction Kit). El protocolo completo para la obtención de los scFvs con los sitios para las enzimas de restricción se esquematiza en la figura 4.

Fig. 4. Construcción de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs)



En el esquema se representa el proceso para la obtención de los scFvs para la construcción de las bibliotecas a partir del mRNA de células mononucleares.

8.10. Digestión de los scFvs.

Los scFvs fueron digeridos con las enzimas de restricción Sfi I y Not I, para su posterior clonación en el vector fagémido pSyn2, el cual fue digerido previamente, con las mismas enzimas. El vector pSyn2 es un fagémido derivado del pHEN1. Presenta un sitio de clonación múltiple, un tag de c-myc que permite el reconocimiento por ELISA del fragmento de anticuerpo, un codón de paro ámbar seguido por la proteína de la cápside del fago filamentoso M13 pIII; ésta disposición permite que el fragmento del anticuerpo clonado sea expresado como fago-anticuerpo en la superficie del fago M13 asociado a pIII. El fagémido posee además, un gen con resistencia a ampicilina y un péptido señal que le permite el paso de la fusión del citoplasma al periplasma celular y un origen de replicación para *E. coli* y otro para M13.

Para la digestión con la enzima Not I, se preparó una mezcla de 40 μ L que contenía: 1X de solución amortiguadora para la enzima Not I (NEB buffer 3: 100mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 7.9, 10mM de $MgCl_2$ y 1mM de DTT), 10U de enzima Not I (NEB), 1X de BSA y el DNA correspondiente de cada scFvs. La digestión se llevo a cabo por 4h. a temperatura ambiente. El producto de la digestión se purificó con el equipo de Quiagen (QIAquick Gel Extraction Kit) y posteriormente se digirió con la enzima Sfi I (NEB).

Para la digestión con la enzima Sfi I, se preparó una mezcla de 40 μ L que contenía: 1X de solución amortiguadora para la enzima Sfi I (NEB buffer 2: 100mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 7.9, 10mM de $MgCl_2$ y 1mM de DTT), 10U de enzima Not I (NEB), 1X de BSA y el DNA previamente digerido con la enzima Not I. La digestión se llevó a cabo por 4h a 50°C. El producto de la digestión se purificó con el equipo de Quiagen (QIAquick Gel Extraction Kit) y posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1.6% para verificar su concentración e integridad. Las condiciones para el vector fueron similares.

8.11. Ligación de los scFvs en pSyn2.

Los scFvs digeridos fueron ligados al vector pSyn2. Para la reacción de ligación se preparó una mezcla de 50 μ L que contenía: 1X de solución amortiguadora (50mM de Tris-HCl pH 7.5, 10mM de $MgCl_2$, 10mM de DTT, 1mM de ATP y 25 μ g/mL de BSA) y 100U de enzima ligasa (NEB). A la mezcla se le añadió el vector y los scFvs en una relación molar 1:3 (250ng

de vector/150ng de cada scFvs). La mezcla se incubó 4h a temperatura ambiente. El producto ligado se purificó con el equipo de Quiagen (QIAquick Gel Extraction Kit).

8.12. Transformación.

La construcción de la biblioteca se llevó a cabo por electroporación empleando la cepa *Escherichia Coli* XL1 Blue para la expresión de los scFvs como fago-anticuerpos. La cepa tiene resistencia a tetraciclina para su selección y es Rec A⁻, lo que impide la recombinación y con ello la introducción de mutaciones en los fragmentos durante el proceso de selección. Se realizaron un total de 13 electroporaciones en cubetas de 0.1mm de separación entre las placas (BIORAD). Cada electroporación se realizó con 50µL de células y 3 µL de DNA. La eficiencia de transformación así como el tamaño de la biblioteca se determinó por titulación.

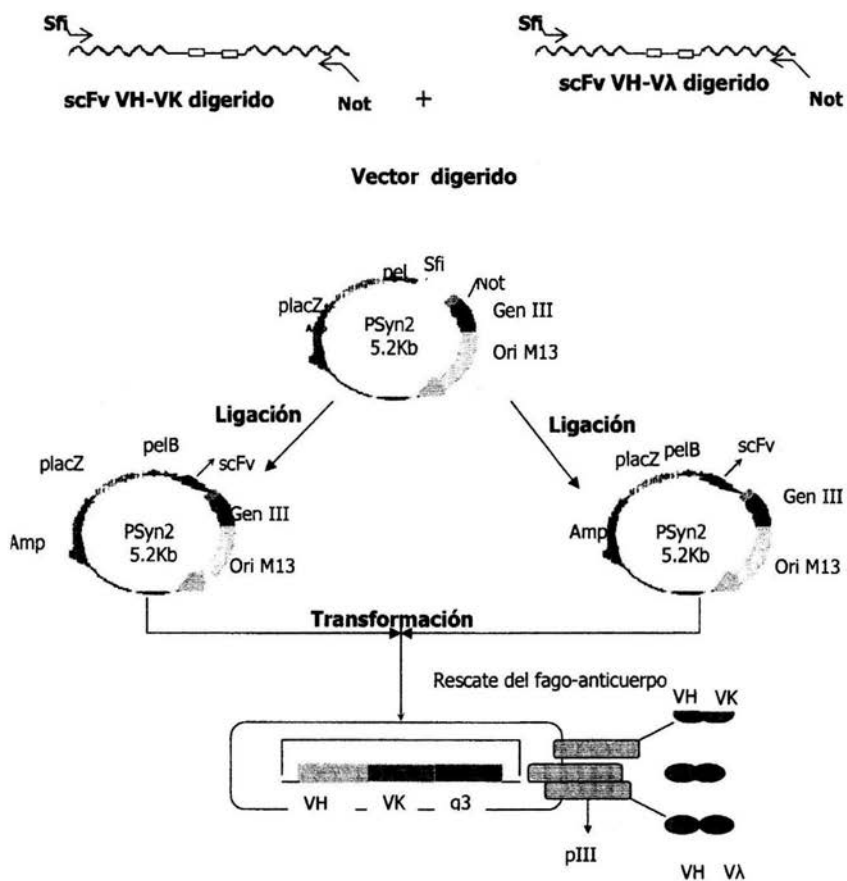
8.13. Propagación del Fago ayudador M13/K07.

Para la propagación del fago ayudador se utilizaron células XL1 blue. En un primer paso las células fueron crecidas en medio SB (triptona, extracto de levadura y NaCl pH 7.5) e infectadas con fago ayudador M13/K07 comercial. Después de la infección el cultivo fue crecido a 30°C toda la noche. Posteriormente se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante que contenía los fagos fue sometido a 2 precipitaciones con PEG al 20% en NaCl 2.5M. Los fagos precipitados fueron resuspendidos en TBS 1X (150 mM de NaCl y 50 mM de Tris pH 7.5.) y se almacenaron a -20°C. Una vez purificado el fago ayudador M13/K07 fue titulado por infección en un cultivo celular saturado.

8.14. Rescate de las bibliotecas como fago-anticuerpos.

El fago M13/K07 fue utilizado para la infección de un cultivo celular de *E. Coli* XL1 blue, previamente transformado con cada una de las bibliotecas. Se empleó una relación final de 10¹³ UFC de M13/K07/mL de cultivo (DO₆₀₀ nm). Los fagos fueron sometidos a 2 precipitaciones con PEG/NaCl y fueron utilizados para las rondas de selección. En la figura 5 se puede ver un esquema general de la estrategia empleada para la obtención de la biblioteca.

Fig. 5. Construcción y clonación de las bibliotecas de scFvs.



En el esquema se muestran los pasos realizados de los scFvs hasta la expresión como fagos-anticuerpos.

8.15. Caracterización de la biblioteca por "fingerprinting" y secuenciación.

La calidad de los repertorios se determinó por "fingerprinting" y secuenciación a partir de un conjunto de clonas seleccionadas al azar. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla 5. Para el ensayo de "fingerprinting" se amplificaron mediante PCR los scFvs de las clonas de cada una de las bibliotecas originales y las clonas positivas después de la 4ª ronda de selección. Los fragmentos obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción de corte frecuente *Bst*NI. De ésta manera se puede obtener un patrón de corte de DNA para cada una de las secuencias, lo cual da una idea de la diversidad de la biblioteca. De cada una de las bibliotecas se seleccionaron 20 clonas para llevar a cabo un análisis de las mismas secuencias.

8.16. Selección.

Los fago-anticuerpos obtenidos de la genoteca se utilizaron para realizar rondas de tamizado contra 2 diferentes antígenos: β_2 GP-I y protrombina. Con cada uno de los antígenos se realizaron cuatro rondas de selección. Brevemente, en tubos de polipropileno de 4 mL se incubaron los antígenos a temperatura ambiente (TA) durante toda la noche en solución salina de fosfato (PBS, 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄ y 0.24 KH₂PO₄) pH 7.4. Posteriormente se incubaron por 2 h con leche descremada 2%, tween 0.01%, en PBS 1X, para bloquear los espacios no cubiertos por los antígenos. 10¹³ partículas de fago conteniendo los fragmentos de anticuerpo desplegado en su superficie (fago-anticuerpos) se incubaron por 1h a 37°C. Los fago-anticuerpos que se unieron al antígeno fueron eluidos con Glicina-HCl 0.2M pH 2.2 y Tris-HCl 1M pH.9.1 y utilizados para las rondas posteriores de selección. En cada una de las rondas se llevaron a cabo dos titulaciones, una al inicio y otra al final, esto con el objeto de ver la eficiencia que se obtuvo en el tamizado y la cantidad de fagos que se requerían para la subsiguiente ronda. Así mismo en cada ronda se fue reduciendo a la mitad la concentración de antígeno, con el objeto de seleccionar solo aquellos fago-anticuerpos con mayor afinidad para cada uno de los antígenos.

8.17. Análisis mediante ELISA de los anticuerpos seleccionados.

Para determinar la especificidad de los fago-anticuerpos obtenidos después de la 4ª ronda de selección se hicieron nuevos ensayos inmunoenzimáticos con los antígenos contra los cuales fueron seleccionados. Para seleccionar los fagos-anticuerpos, se aislaron clonas independientes de la 4ª ronda de selección, cada una de las clonas fueron crecidas en placas de cultivo de 96 pozos (Nunc Inc, Danemark 97F) con medio de cultivo YT2X suplementado con antibióticos (ampicilina 200 µg/mL y tetraciclina 12.5 µg/mL) y 2% de glucosa. Después de que el medio alcanza una DO de 0.7 se infectó con fago ayudador M13/K07 para producir partículas de fago-anticuerpo. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación fue utilizado para los ELISAs.

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Inc, Danemark 97F) con 10µg/mL de antígeno disuelto en PBS 1X pH 7.4 e incubadas toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas fueron lavadas y bloqueadas con ASB al 0.5% en PBS 1X que contenía 0.1% de tween 20, durante 2h a 37°C. Posteriormente se adicionó 1X10⁹ fago-anticuerpos previamente obtenidos de un cultivo de clonas independientes y se incubaron 1h a 37°C. Transcurrido el tiempo se les adicionó el anticuerpo anti-M13 conjugado con la enzima peroxidasa (anti-M13-HRP) y se incubó 1h a 37°C. Como sustrato se utilizaron 8 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% y 8 mg de ortofenilendiamina (OPD). La reacción fue detenida con HCl 6N y las placas fueron leídas en un lector para placas de ELISA (TECAN) a una longitud de onda de 490nm.

9. Resultados.

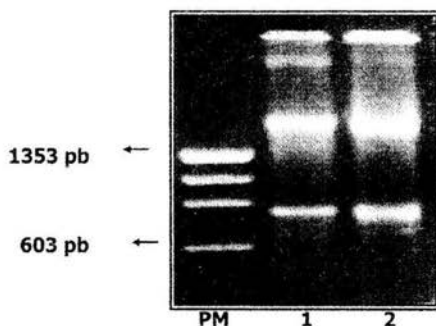
9.1. Actividad anti- β_2 GP-I.

Al momento de la toma de sangre el paciente presentó los siguientes títulos de anti- β_2 GP-I: Isotipo IgG 156.3 U/mL e isotipo IgM 2.9 U/mL (valores normales IgG \leq 11U/mL e IgM \leq 11 U/mL).

9.2. Análisis del RNA total.

El RNA total obtenido a partir de células mononucleares de sangre periférica del paciente con SaFP, se muestra en la figura 6.

Figura 6. Análisis del RNA total.



PM: Marcador de peso molecular. Carril 1 y 2: RNA del paciente con SaFP

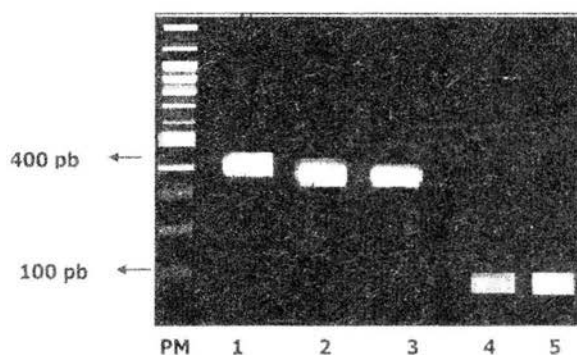
9.3. Amplificación de los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L .

La amplificación de los re-arreglos $V_HDJ_H-V_LJ_L$ y el fragmento unidor fue del tamaño esperado (figura 7) como se puede ver, la cadena pesada, ligera lambda y kappa tiene un tamaño aproximado de 400pb y el fragmento unidor de aproximadamente 100 pb.

9.4. Ensamble de los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L .

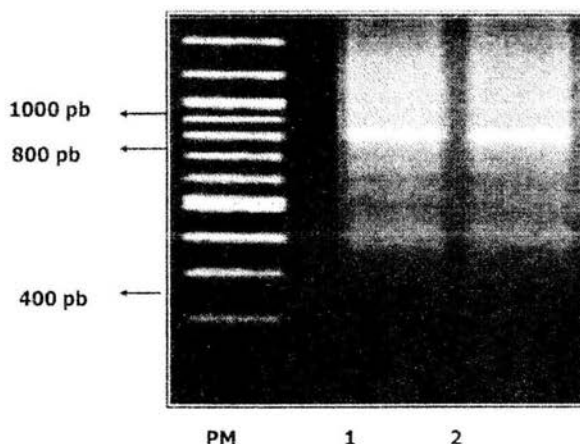
Una vez amplificados los re-arreglos V_HDJ_H , V_LJ_L y el fragmento unidor fueron ensamblados mediante PCR sobrelapado, donde también se introdujeron los sitios de restricción Not y Sfi, obteniéndose dos mezclas de fragmentos de cadena variables. En la figura 8 se muestran los scFvs ensamblados. Su tamaño aproximado es de 800 pb.

Figura 7. Amplificación de los re-arreglos V_HDJ_H , V_LJ_L y del fragmento unidor.



PM: Marcador de peso molecular. Carril 1: amplificado del re-arreglo V_HDJ_H , carril 2: amplificado V_LJ_L de la cadena kappa; carril 3: amplificado V_LJ_L de la cadena lambda; carril 4: amplificado del fragmento unidor para la cadena lambda; y carril 5: amplificado del fragmento unidor para la cadena kappa.

Fig. 8. Ensamble de los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L .



PM: Marcador de peso molecular; carril 1: ensamble VHDJH-VkKk; y carril 2: VHDJH-VλJλ.

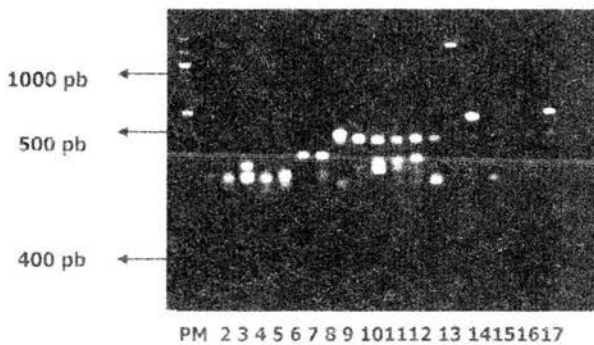
9.5. Digestión y ligación

Los scFvs fueron ligados al vector fagémido pSyn 2. Posteriormente cada una de las construcciones fue utilizada para transformar células electrocompetentes *E. Coli* XL-1Blue, las cuales presentaron una eficiencia de transformación de 1.0×10^9 UFC/10ng de pUC18 y el tamaño de la genoteca determinado fue de 1×10^6 UFC.

9.6. Variabilidad de las secuencias.

El análisis de 20 clonas al azar de la biblioteca $V_HDJ_K-V_KJ_K$ mostró que el 85% (17/20) de las clonas son del tamaño correcto. Dos de las tres clonas restantes presentaron un fragmento del tamaño correspondiente a una de las cadenas y la otra un fragmento del tamaño correspondiente al fragmento unidor. De las 17 clonas con tamaño correcto se obtuvieron 15 patrones de digestión diferentes y hubo un patrón de digestión que se repitió 2 veces (figura 9).

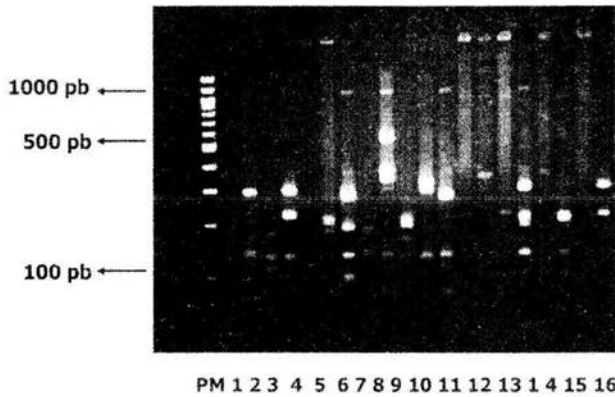
Figura 9. Patrón de digestión de las clonas de la biblioteca V_HDJ_H-V_KJ_K.



PM: Peso molecular. Carriles 2 y 4: clonas con un mismo patrón de digestión; y carriles 3,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16 y 17: clonas con patrones de digestión diferente.

La biblioteca V_HDJ_H-V_KJ_K mostró que el 80% (16/20) de las clonas son del tamaño correcto. 2 de las 4 clonas restantes presentaron un fragmento del tamaño correspondiente al fragmento original del vector y las otras 2 clonas presentaron un fragmento del tamaño correspondiente a una de las cadenas. Todas las clonas con tamaño correcto presentaron 16 patrones de digestión diferente, como se puede ver en la figura 10.

Figura 10. Patrón de digestión de las clonas de la biblioteca $V_HDJ_H-V\lambda J\lambda$



PM: Peso molecular; Carriles 2 al 16: clonas con patrón de digestión diferente.

El análisis de las secuencias de las clonas $V_HDJ_H-V\lambda J\lambda$ y $V_HDJ_K-V\kappa J\kappa$ escogidas al azar reveló que pertenecen a las siguientes familias: VH1, VH3, VH4, VH5, VH6, portan el segmento, JH1-2, JH3, HJ4-5, JH6 y presentaron los re-arreglos $V\lambda 2$, $V\lambda 3a$, $V\kappa 1$, $V\kappa 3$, $V\kappa 4$ y $V\kappa 6$.

9.7. Selección.

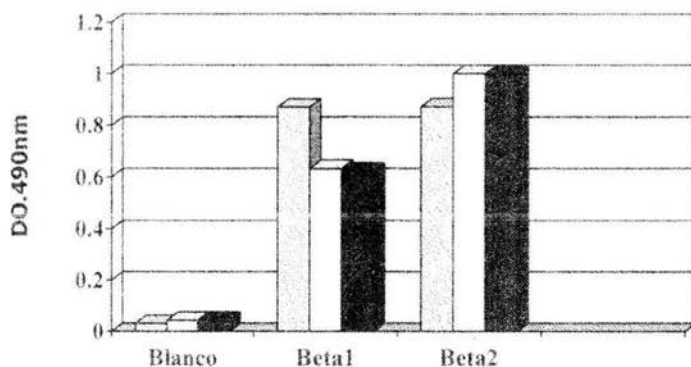
En la tabla 6 se muestran los resultados del proceso de selección contra 2 antígenos diferentes. Como se puede ver el número de clonas no aumento en cada una de las rondas de selección, esto podría deberse a que en cada ronda de selección se redujo a la mitad la concentración de antígeno y las condiciones de lavado se hicieron más astringentes.

Tabla 6. Resultados del proceso de tamizado contra β_2 GP-I y protrombina.

Antígeno	Ronda	Fagos de inicio	Fagos finales	Conc. Ag ($\mu\text{g/mL}$)
β_2 GP1	1	1.0×10^{14} UFC/mL	1.0×10^8 UFC/mL	100
	2	4.8×10^{14} UFC/mL	2.3×10^5 UFC/mL	50
	3	5.0×10^{14} UFC/mL	6.0×10^4 UFC/mL	25
	4	4.8×10^{13} UFC/mL	7.0×10^4 UFC/mL	12.5
Protrombina	1	4.86×10^{14} UFC/mL	2.2×10^5 UFC/mL	100
	2	4.91×10^{13} UFC/mL	4.5×10^4 UFC/mL	50
	3	1.0×10^{13} UFC/mL	2.3×10^6 UFC/mL	25
	4	1.0×10^{12} UFC/mL	2.5×10^6 UFC/mL	12.5

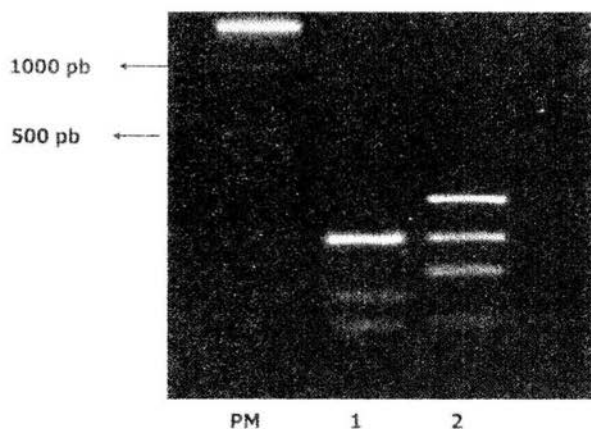
9.8. Actividad anti- β_2 GP-I.

De las colonias aisladas en la cuarta ronda de selección de las bibliotecas $V_H D J_H - V_K / V_K$ y $V_H D J_H - V_L / V_L$, se seleccionaron 88 clonas al azar para convertirlas en fagos-anticuerpos y se analizaron mediante ELISA como se describe en la sección de metodología. De las 88 clonas analizadas se obtuvieron 39 clonas positivas, las cuales se analizaron en cuanto a talla y se obtuvieron 2 clonas que presentaron un fragmento de talla correcta (β 1 y β 2). Posteriormente se realizó un segundo ELISA de las 2 clonas con el fragmento de talla correcta para confirmar que eran positivas, con lo que se corroboró los resultados. En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos del ELISA tomando como valores positivos todos aquellos que estuvieran al menos tres veces por arriba del control negativo (0.0880). El análisis mediante digestión con la enzima de restricción de corte frecuente *Bst*NI, mostró que ambas tenían un patrón de digestión diferente (Figura 12) mismo que fue confirmado posteriormente con el análisis de las secuencias.

Figura 11. Reactividad contra β_2 GP-I.

Ensayo de ELISA de las clonas positivas para β_2 GP-I. La barra en gris representa el 1er ensayo de ELISA realizado y las barras blancas y negras el mismo ensayo realizado por duplicado.

Figura 12. Patrón de digestión de las clonas Beta1 y Beta2.

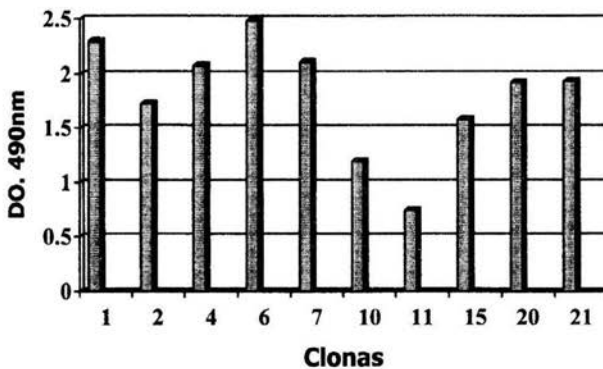


PM: Marcador de peso molecular. Carril 1: clona Beta1; carril 2: clona Beta2

9.9. Actividad anti-protrombina.

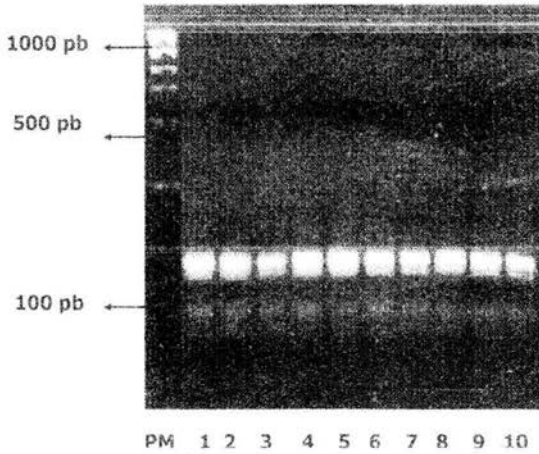
88 clonas fueron seleccionadas con protrombina como antígeno, de las cuales 38 fueron positivas y de éstas 10 clonas presentaron un fragmento de talla correcta. En la figura 13 se muestran los resultados de la reactividad mediada por ELISA tomando como valores positivos todos aquellos que estuvieran al menos tres veces por arriba del control negativo (0.0880). El análisis de las digestiones con la enzima de restricción de corte frecuente *BstNI*, mostró que todas tenían el mismo patrón de digestión (Figura 14), su identidad fue confirmada posteriormente mediante el análisis de las secuencias.

Figura 13. Actividad anti-protrombina.



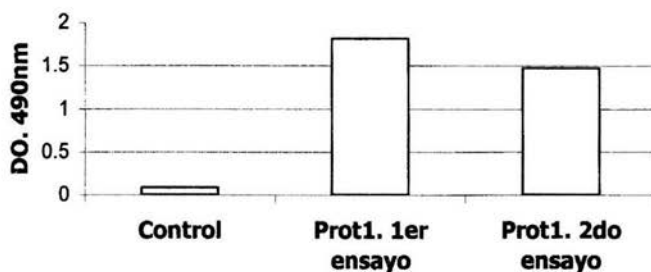
Ensayo de ELISA de las clonas positivas para protrombina.

Figura 14. Patrón de digestión de las clonas reactivas contra protrombina.



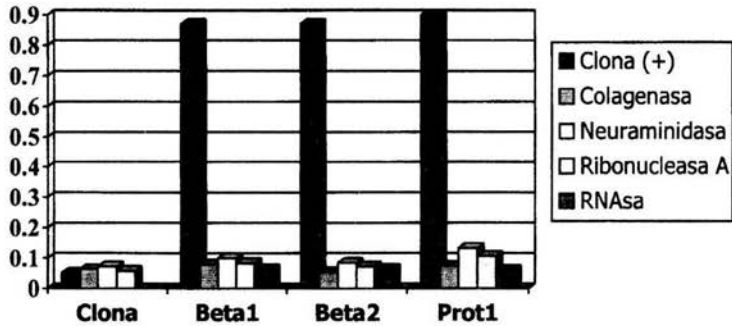
PM: Peso molecular; Carriles 1 al 10: clonas positivas para protrombina con patrón de digestión idéntico.

Como se puede ver en la siguiente figura, las clonas reactivas contra protrombina, también muestran reactividad contra β_2 GP-I.

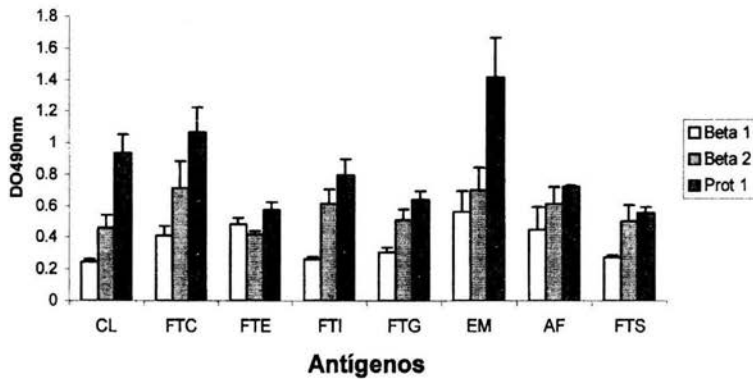
Figura 15. Reactividad contra β_2 GP-I.

9.10. Ensayos de reactividad cruzada.

Mediante ensayos de ELISA se investigó la reactividad de las clonas Beta1, Beta2 y Prot1, contra 4 antígenos diferentes, los cuales no están relacionados con el antígeno contra el cual fueron seleccionados. En la figura 16a se muestra la reactividad contra los antígenos probados. Como se puede ver ninguna clona mostró reactividad contra los antígenos probados. Sin embargo al determinar la reactividad contra los fosfolípidos neutros (fosfatidícolina (FTC), fosfatidiletanolamina (FTE), esfingomielina (EM)), y de carga negativa (cardiolipina (CL), fosfatidíserina (FTS) y fosfatidílinositol (FTI) y ácido fosfatídico (AF)) se observó reacción (figura 16b).

Figura 16a. Reactividad contra antígenos irrelevantes.

Ensayos de ELISA's de las clonas positivas para β_2 GP-I y protrombina contra antígenos irrelevantes.

Figura 16b. Reactividad contra fosfolípidos.

Ensayos de ELISA's de las clonas positivas para β_2 GP-I y protrombina contra cardiolipina (CL), fosfatidícolina (FTC), fosfatidiletanolamina (FTE), fosfatidilinositol (FTI), fosfatidílglicina (FTG), ácido (AF) y fosfatidíserina (FTS).

9.11. Análisis de las secuencias Beta1, Beta2 y Prot1.

Los re-arreglos V_HDJ_H y V_LJ_L de las clonas positivas Beta1, Beta2 y Prot1 fueron secuenciados con los oligonucleótidos Lmb3 y pCANTAB5B-S6 (tabla2) y comparados con los genes V_HDJ_H y V_L de línea germinal presentes en la base de datos V Base (www.wd.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901)

Clona beta1.

El análisis de la secuencia de la clona beta1 mostró que la región V_H pertenece a un miembro de la familia V_H4 y tiene un 96.7% de homología con el gen de línea germinal VHSP/VH4.22, esto se debe básicamente a 9 bases sustituidas en las regiones de armazón FW1 = 4, FW2 = 1 y FW3 = 3 y una en CDR1 (4 transiciones, 4 tranversiones y una base que no se pudo identificar). El segmento V_H anterior se encuentra re-arreglado con el gen J_H5 , el cual mostró una homología del 98.03% y no se pudo identificar gen D (Figura 17a). Respecto a la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de este re-arreglo, el gen V_L usado es el gen 1b.366F5/DPL5, el cual pertenece a la familia $V_{\lambda}1$. El análisis de la secuencia mostró una homología del 99.4 % hasta el codon 57, la secuencia posterior a dicho codon (FW2 y CDR3) presenta 72 mutaciones en las 96 bases. No se identificó ningún gen J_L , figura 17b.

Figura 17a. Secuencia del re-arreglo V_HDJ_H de la clona beta1.

```

          Q   V   Q   L   Q   E   S   G   P   G   L   V   K   P   S
          CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
VHSP/VH4.22...+  ...  ...  ... -GC T-- C-- --- --- --- --- -X --- ---
Beta1

          CDR1
          E   T   L   S   L   T   C   T   V   S   G   Y   S   I   S   S   G   Y   Y
          GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGC TAC TCC ATC AGC AGT GGT TAC TAC
          --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
          W   G   W   I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   S   I   Y
          TGG GGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT
          --- --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- A--
          CDR2
          H   S   G   S   T   Y   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S   V
          CAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA
          --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -TT --- ---
          D   T   S   K   N   Q   F   S   L   K   L   S   S   V   T   A   A   D   T
          GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA GAC ACG
          --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -C --- --- --- --- --- ---
          A   V   Y   Y   C   A   R
          GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA
          --- --- --- --- --- ---

          C   A   R   D   F   T   A   A   G   Q   N   N   W   F   D   P   W
          JH5b  TGT GCG AGA GAT TTC ACA GCA GCT GGT CAG AAC AAC TGG TTC GAC CCC TGG
          Beta1  ...  ...  ...  ...  ...  ...  ...  ...  ...  ...  ...  ...  ...

          G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
          GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G
          .C. ...  ...  ...  ...  ...  --- --- ---

```

Figura 17b. Secuencia del re-arreglo V_L de la clona β 1.

	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	V	S	A	A	P				
1b. 366F5/DPL5...+	CAG	TCT	GTG	TTG	ACG	CAG	CCG	CCC	TCA	GTG	TCT	GCG	GCC	CCA				
Beta1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---				
	CDR1																	
	G	Q	K	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N	I	G	N	N
	GGA	CAG	AAG	GTC	ACC	ATC	TCC	TGC	TCT	GGA	AGC	AGC	TCC	AAC	ATT	GGG	AAT	AAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y
	TAT	GTA	TCC	TGG	TAC	CAG	CAG	CTC	CCA	GGA	ACA	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATT	TAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	CDR2																	
	D	N	N	K	R	P	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	K	S
	GAC	AAT	AAT	AAG	CGA	CCC	TCA	GGG	ATT	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT
	---	---	---	---	---	---	---	---	GA-	T-C	TGA	-CG	A-T	CTC	T-G	CT-	C-A	GTC
	G	T	S	A	T	L	G	I	T	G	L	Q	T	G	D	E	A	D
	GGC	ACG	TCA	GCC	ACC	CTG	GGC	ATC	ACC	GGA	CTC	CAG	ACT	GGG	GAC	GAG	GCC	GAT
	T-G	CAC	GTC	AG-	CA-	-CT	--G	CAT	CA-	C-G	XA-	TCC	-GA	CT-	-GG	AC-	AGG	CCG
	CDR3																	
	Y	Y	C	G	T	W	D	S	S	L	S							
	TAT	TAC	TGC	GGA	ACA	TGG	GAT	AGC	AGC	CTG	AGT							
	AT-	ATT	ACT	-CC	GG-	ACA	TGG	GAT	-X-	AGC	CTG							

Clona β 2.

El análisis de la secuencia de la clona β 2 mostró que fue codificada por un gen de la familia V_H4 y su homología es de 98.97% con el gen de línea germinal VIV-4/4.35. Sólo tiene 3 mutaciones, las cuales están distribuidas de la siguiente manera: 2 en el FW 1 y una en el FW 3 (2 transiciones y una transversión). Además, esta re-arreglada con el producto del gen J_H4b con una homología del 81.25 % (9 mutaciones en las 48 bases) y no se identificó gen D (Figura 18a). Respecto a la secuencia de nucleótidos de la región V_L , la clona β 2 esta formada por el producto del gen V2-14+, el cual pertenece a la familia $V_{\lambda}3$ y el gen $J_{\lambda}3b$. La homología del producto del gen V2-14+ es del 88.88% debido a 29 mutaciones de las 261 bases (17 transiciones y 12 transversiones).

Las mutaciones están distribuidas de la siguiente manera: FW1 = 2, CDR1 = 2, FW2 = 3, CDR2 = 1 y FW3 = 21. La homología del gen J_H3b es del 93.75% debido a 3 mutaciones de las 48 bases (Figura 18b).

Figura 18a. Secuencia del re-arreglo V_HDJ_H de la clona beta2.

```

Q V Q L Q E S G P G L V K P S
VIV-4/4.35+ CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
Beta2      -CA  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---

                                     CDR1
E T L S L T C T V S G G S I S S Y Y
GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGT AGT TAC TAC
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---

W S W I R Q P A G K G L E W I G R I
TGG AGC TGG ATC CGG CAG CCC GCC GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG CGT ATC
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---

                                     CDR2
Y T S G S T N Y N P S L K S R V T M
TAT ACC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---

S V D T S K N Q F S L K L S S V T A
TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  -C-  ---

A D T A V Y Y C A R D
GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---

C A R D Y Y F D Y W G Q G T L V T
JH4b      TGT GCG AGA GAT TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC
Beta2      -----TGGGTG.G.G.....C.....

V S S
GTC TCC TCA G

```


C A N H I Y Y F D Y Q G Q G T
JH4b TGT GCG AAT CAT ATA TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC
Prot1 _____ TGGCGA.....

L V T V S S
 CTG GTC ACC GTC TCC TCA G

Figura 19b. Secuencia del re-arreglo V_LJ_L de la clona Prot1.

Q S V L T Q P P S V S A A
1b.366F5/DPL5...+ CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT GCG GCC
Prot1 ---- ---- ---- ---- ---- ---- ---- ---- ---- ---- ----

CDR1
 P G Q K V T I S C S G S S S N I G K
 CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATC TCC TGC TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATT GGG AAT
 ---- ---- -G- ---- ---- ---- ---- ---- -C- -C- ---- ---- ---- --A

N Y V S W Y Q Q L P G T A P K L L I
 AAT TAT GTA TCC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACA GCC CCC AAA CTC CTC ATT
 ---- ---- --C ---- ---- --A ---- ---- ---- ---- ---- -C- ---- ----

CDR2
 Y D N N K R P S G I P D R F S G S K
 TAT GAC AAT AAT AAG CGA CCC TCA GGG ATT CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG
 ---- ---- -G- -G- ---- -AG ---- --A ---- -C- -C- ---- ---- --A ----

S G T S A T L G I T G L Q T G D E A
 TCT GGC ACG TCA GCC ACC CTG GGC ATC ACC GGA CTC CAG ACT GGG GAC GAG GCC
 ---- ---- --G ---- ---- ---- -G- ---- ---- ---- ---- ---- ----

CDR3
 D Y Y C G T W D S S L S A
 GAT TAT TAC TGC GGA ACA TGG GAT AGC AGC CTG AGT GCT
 T-- ---- ---- ---- G-- ---- ---- ---- ---- ----

C G A W D S S L S A L G V R R R
JL3b TGC GGA GCA TGG GAT AGC AGC CTG AGT GCT TTG GGT GTT CGG CGG AGG
Prot1 _____ A...TCT.....

D Q A D R P
 GAC CAA GCT GAC CGT CCT AG

10. Discusión.

En el presente trabajo se analizaron las secuencias de dos anticuerpos anti- β_2 GP-I y un anticuerpo anti-protrombina provenientes de un paciente con SaFP, quien presentó títulos altos de anticuerpos anti- β_2 GP-I en el momento del estudio. Actualmente el análisis molecular de los anticuerpos aFL monoclonales ha servido para conocer algunas de sus características, desafortunadamente se cuenta con un número muy pequeño de secuencias reportadas, las cuales tienen dos grandes desventajas 1) provienen de un grupo heterogéneo de anticuerpos cuyo origen y propiedades de unión son diferentes, y 2) los anticuerpos monoclonales no pueden ser considerados representativos de los anticuerpos presentes en pacientes con SaF, además la obtención de AcMo es muy compleja. Afortunadamente hoy contamos con un método más eficiente para analizar dichos aFL, el cual emplea bibliotecas de péptidos expresadas en fagos filamentosos. Dado que los fagos son uno de los mejores sistemas para la clonación simultánea de múltiples genes, en el presente trabajo hemos utilizado esta metodología, como una manera de poder identificar el o los genes que codifican las regiones variables $V_H(D)J_H$ y V_LJ_L de los anticuerpos aFL y ver si sufren hipermutación somática.

Para cumplir con nuestros objetivos hemos diseñado y construido dos bibliotecas de scFvs, una que contiene los re-arreglos V_HDJ_H/V_KJ_K y la otra los re-arreglos $V_HDJ_H/J V_\lambda J_\lambda$, ambos rearrreglos se expresan como formato variable de cadena sencilla (scFv) en la superficie del fago M13 como proteínas de fusión unidos a la proteína pIII del fago. EL análisis por ensayos de restricción y secuenciación de varias clonas seleccionadas al azar mostró que el 85 y 80% respectivamente, de cada una de las bibliotecas contienen la talla correcta y presentan diversidad de los rearrreglos $V_H(D)J_H/V_KJ_K$ y $V_\lambda J_\lambda$ con respecto a las familias de genes utilizados.

Con el propósito de agilizar el proceso de selección de las clonas, se decidió mezclar las bibliotecas V_HDJ_H/V_KJ_K y $V_HDJ_H/J V_\lambda J_\lambda$. La variabilidad de la biblioteca se estimó en 1×10^6 rearrreglos. Una vez valorada la biblioteca se procedió a realizar 4 rondas de selección con β_2 GP-I y protrombina, sin embargo conforme se iba realizando la selección, no se observó un aumento del título, como era de esperarse al ir enriqueciendo la población de clonas capaces de unirse específicamente contra el antígeno, esto puede deberse a que las condiciones de lavado se

hicieron más astringentes y la concentración de antígeno se fue reduciendo a la mitad conforme aumentaban las rondas de selección.

Después de analizar las clonas contra los antígenos seleccionados se obtuvieron tres clonas positivas. Dos contra β_2 GP-I, las cuales se designaron Beta1 y Beta2 y una clona contra protrombina, designada Prot1, esta última también reaccionó contra β_2 GP-I, lo que sugiere que se trata de un anticuerpo con poli-reactividad como el encontrado por Chukwuocha RU y cols. en 1999 en el que se usó la misma metodología, lo que sugiere que el scFv puede reconocer un epítipo compartido por la β_2 GP-I y la protrombina. Ninguna de las tres clonas mostró reactividad contra proteínas irrelevantes (neuroaminidasa, colagenasa, ribonucleasa A, RNAasa) como se ve en la figura 16a, sin embargo llama la atención que todas mostraron reactividad contra un panel de 8 fosfolípidos estudiados, 4 de carga negativa (CL, FTS, FTI y FTG) y 4 neutros (FTC, FTE, EM y AF). Esto puede sugerir que el epítipo puede residir en los ácidos grasos y en el glicerol fosfato (figura 16b).

El análisis de las secuencias de las clonas Beta1 y Beta2 reveló que ambas pertenecen a la familia V_H4 . La primera fue el producto del gen VHSP/VH4.22 y la otra del gen VIV-4/4.35+. Beta1 presentó 10 mutaciones somáticas, las cuales se encuentran distribuidas en los FW (FW1=7, FW2=1y FW3=2) y 2 en los CDR'S (CDR2=1 y CDR3=1). Beta2 sólo presentó 3 mutaciones en FW (FW1 =2, FW 3= 1), sin embargo el número de mutaciones somáticas se vio incrementado en los re-arreglos del gen $V\lambda 1b.366F5/DPL5$ y $V\lambda V2-14+$, donde se observaron 72 y 28 mutaciones respectivamente. Si bien las mutaciones están principalmente en la región de armazón, se observaron mutaciones en los CDR'S, lo que sugiere que éstos re-arreglos podrían provenir de una clona de célula B que sufrió hipermutación somática.

El análisis de la secuencia de la clona Prot1, reveló que la región V_H pertenece a la familia V_H3 y es el producto del gen DP-47/V3-23, con 4 mutaciones en los FW y ninguna en los CDR'S. Al igual que las clonas anteriores también presentó mutaciones somáticas en los re-arreglos del gen $V\lambda$, por lo que se sugiere que también sufrió hipermutación somática. Respecto al análisis de los re-arreglos de esta clona, se ha visto que el gen V3-23 pertenece a un grupo de genes que se re-arreglan con mayor frecuencia en la ontogenia (Schroeder Jr y Wang JY. 1990).

También se ha visto mediante análisis molecular, que hay una mayor frecuencia en el uso de los genes de las familias VH3 y VH4 en auto-anticuerpos anti-DNA, con una gran variedad de genes V λ y V κ (Isenberg D.A. y cols., 1991). En dicho estudio se reportan 3 anticuerpos que utilizan la familia de genes VH3 y VH4. Además se menciona que existe sesgo de los anticuerpos aFL en el uso de cadenas ligeras λ (Ghavari AE y cols., 1988), y nuestros tres anticuerpos tenían cadenas λ .

Análisis previos de las secuencias de los anticuerpos aFL ha mostrado que los anticuerpos de isotipo IgG, pero no de isotipo IgM frecuentemente contienen un gran número de mutaciones somáticas y una acumulación de ciertos residuos, tales como arginina y asparagina (Radic MAZ y cols., 1994 y Isenberg DA y cols., 1997) particularmente en los CDR'S, sugiriendo que tales anticuerpos están implicados en la patogénesis del SaF. En nuestro caso las tres secuencias reportadas en este estudio presentaron hipermutación somática en los rearreglos V λ ,

11. Conclusiones

- Se obtuvieron dos anticuerpos positivos contra B₂GP-I. Clonas Beta1 y Beta2.
- El anticuerpo scFv Beta 1 es el producto del gen VHSP/VH4.22, no se detectó gen D y porta el gen J_H5. El gen V_L usado fue el 1b.366F5/DPL5, el cual pertenece a la familia Vλ1 y no se identificó ningún gen J_L.
- El anticuerpo Beta2 es el producto del gen IV-4/4.35+, no se detectó gen D y porta el gen J_H4b. El gen V_L usado es el V2-14+, el cual pertenece a la familia Vλ3 y se encuentra re-arreglado con el producto del gen J_L3b.
- Se obtuvo una clona reactiva contra protrombina, Prot1, la cual es el producto del gen DP-47/V3-23...+, no se identificó gen D y porta el gen J_H4b. El gen V_L usado es el 1b.366F5/DPL5...+ el cual pertenece a la familia Vλ1 y se encuentra re-arreglado con el producto del gen J_L3b.
- Se observó un mayor número de mutaciones somáticas en los re-arreglos V_L de los tres anticuerpos.
- Todos los anticuerpos fueron oligo-reactivos contra fosfolípidos de carga negativa y neutra, y no mostraron reactividad contra antígenos irrelevantes.

12. Perspectivas

- Determinar las K_D de los anticuerpos Beta1, Beta2 y Prot1, contra B₂GP-I y protrombina respectivamente.
- Determinar sí los anticuerpos son capaces de inducir SaFP en modelos experimentales.
- Utilizar un panel de antígenos nuevos, con el objetivo de detectar posibles reactividades contra otras proteínas plasmáticas.

13. Bibliografía.

Alarcón-Segovia D. and Sánchez Guerrero J. Primary Antiphospholipid Syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16:482 -488.

Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: a prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine* 1989; 68:353-65.

Alarcón-Segovia D, Cabral A: Antiphospholipid Antibodies. Where do They come From? Where do They Go?. *J Rheum* 1994; 21(6):982-89.

Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, et al. Concise communication: Mayor histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1992; 35:124-125

Beck E and Zink B. Nucleotide sequence and genome organization of filamentous bacteriophages fl and fd. *Gene* 1981; 16:35-58.

Bendixen E, et al. Complete primary structuring of bovine beta2-glycoprotein I: Localization of the disulfide bridges. *Biochemistry* 1992; 31: 3611-3617.

Brey R, Gharavi M: Neurologic Complications of Antiphospholipid Antibodies. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19 (4) : 833-851.

Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D, et al. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- β 2-glycoprotein I that with antiphospholipid antibodies. *J. Rheumatol* 1995; 22:1899-1906.

Cabral AR, Cabiedes J, Alarcon-Segovia D. Hemolytic anemia related to an IgM autoantibody to phosphatidylcholine that binds in vitro to stored and to bromelain-treated human erythrocytes. *Journal of Autoimmunity* 1990; 3:773-787.

- Cervera Ricard, Piette Jean-Charles, Font Josep, et al. Clinical and Immunologic Manifestations and Patterns of Disease Expression in a Cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheumatol* 2002; 46:1019-1027.
- Chukwuocha RU, Hsiao ET, Shaw P, et al. Isolation, characterization and sequence analysis of five IgG monoclonal anti- β 2-glycoprotein- 1 and anti-prothrombin anti-gen-binding fragments generated by phage display. *J Immunol* 1999; 163:4604-11.
- Conley CL, Rathbun HK, Morse WI II, Robinson JE Jr. Circulating anticoagulant as a cause of hemorrhagic diathesis in man. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1948; 83:288-296.
- Deleze M, Oria CV et al. Occurrence of both hemolytic anaemia and thrombocytopenic purpura (Evans's syndrome), in systemic lupus erythematosus. Relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1988; 15:611-615.
- Demaison C, Ravirajan CT, Isenberg DA, Zouali M. Analysis of variable region genes encoding anti-Sm and anti-cardiolipin antibodies from a systemic lupus erythematosus patient. *Immunology* 1995; 86:487-94.
- Denomme GA, Mahmoudi M, Cairns E, et al. Immunoglobulin V region sequence of two human antiplatelet monoclonal autoantibodies derived from B cells of normal origin. *J Autoimmun* 1994; 7:521-35
- Dersimonian H, Schwartz RS, Barrett KJ, et al. Relationship of human variable region heavy chain germ-line genes to genes encoding anti-DNA autoantibodies. *J Immunol* 1987; 139:2496-501
- Galli M, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-1547.
- Galli M, Finazzi G: Thrombocytopenia in Antiphospholipin Syndrome. *Br J Hematol* 1996; 93: 1-5.
- Ghafari AE, Harris EN, Asherson RA, et al. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46:1-6

- Ghavari AE, Harris EN, et al. IgG subclass and light chain distribution of anticardiolipin and anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1988; 47:286-290.
- Gharavi AE, et al. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with b2 glycoprotein I (Apolipoprotein H). *J Clin Invest* 1992; 90: 1105-1110.
- Giles P Ian, Joanna D. Haley, Sylvia Nagl, et al. A systemic Analysis of Sequence of Human Antiphospholipid and Anti- β_2 -Glycoprotein I Antibodies: The Importance of Somatic Mutations and Certain Sequence Motifs. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2003; 32:246-265.
- Gramatikoff K, Georgiev O, Schaffner W. Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:5761-5762.
- Gray CW and Marvin DA. Adsorption complex of filamentous fd virus. *J Mol Biol* 1981; 146:621-627.
- Haagerup A, Kristensen T, Kruse TA. Polymorphism and genetic mapping of the gene encoding human b2-glycoprotein I to chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 58: 2004-2010.
- Harmer IJ, Loizou S, Thompson KM, et al. A human monoclonal antiphospholipid antibody that is representative of serum antibodies and is germline encoded. *Arthritis Rheum* 1995; 38:1068-76.
- Harris EN, Ghavari AE, Boey MI et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2:1211-1214.
- Harris EN, Chang JKH et al. Thrombosis, recurrent fetal loss, thrombocytopenia: predictive value of IgG anticardiolipin antibodies. *Arch Intern Med* 1986; 146:2153-2159.
- Hill DF and Petersen GB. Nucleotide sequence of bacteriophage fl DNA. *J. Virol* 1982; 44:32-46.
- Hoch S, Schwaber J. Identification and sequence of the VH gene elements encoding a human anti-DNA antibody. *J Immunol* 1987; 139:1689-93.

- Hohmann A, Cairns E, Brisco M, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis of anti-cardiolipin and anti-cardiolipin idiotype (H3) human monoclonal antibodies. *Autoimmunity* 1995; 22:49-58.
- Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson PW. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4133-4137.
- Hughes GRV, Harris EN, Ghavari AE. The anticardiolipin syndrome. *J. Rheumatol* 1983; 13:486-489.
- Hughes G: Simposio de Reumatología, junio 1996. Bs As. Argentina.
- Hunt JE, et al. A phospholipid-b2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992; 1: 75-81.
- Ikematsu W, Luan FL, La Rosa L, et al. Human anticardiolipin monoclonal autoantibodies cause placental necrosis and fetal loss in BALB/c mice. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1026-39.
- Isenberg DA, Ehrenstein MR, Longhurst C. The origin, sequence, structure and consequences of developing anti-DNA antibodies. *Arthritis Rheumatism* 1991; 37:168.
- Isenberg DA, Ravirajan CT, Rahman A, et al. The role of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus-a review and introduction to an international workshop on DNA antibodies held in London, May 1996. *Lupus* 1997; 6:290-304.
- Kato H, Enyoji K. Amino acid sequence and location of the disulphide bovine in the beta 2-glycoprotein I: the presence of five sushi domains. *Biochemistry* 1991; 30: 11687-11694.
- Lai CJ, Rauch J, Cho CS, et al. Immunological and molecular analysis of three monoclonal lupus anticoagulant antibodies from a patient with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1998; 11:39-51.
- Levy RA, Ghavari AE, Sammaritano LR, et al. Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody. *J Clin Immunol* 1990; 10:141-145.

- Logtenberg T, Young FM, Van Es JH, et al. Autoantibodies encoded by the most Jh-proximal human immunoglobulin heavy chain variable region gene. *J Exp Med* 1989; 170:347-55
- López-Soto A, Cervera R, Font J, et al. Isotype distribution and clinical significance of antibodies to cardiolipin , phosphatidic acid, phosphatidylinositol and phosphatidylserina in systemic lupus erythematosus: prospective analysis of a series of 92 patients.
- McNeil HP, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: b2-glycoprotein 1 (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.
- Mariette X, Levy Y, Dubreuil ML, et al. Characterization of a human monoclonal autoantibody directed to cardiolipin/beta 2 glycoprotein I produced by chronic lymphocytic leukaemia B cells. *Clin Exp Immunol* 1993; 94:385-90
- Matsuura E, et al. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336: 177-178.
- Matsuura E, et al. Anticardiolipin antibodies recognize b2 glycoprotein I structure altered by interacting with an Oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179: 457-462
- Medhi H, et al. Nucleotide sequence and expression of the human gene encoding apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Gene* 1991; 108: 293-298.
- Menon S, Rahman MA, Ravirajan CT, et al. The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies. *J Autoimmun* 1997; 10:43-57.
- Model P., and Russel M. Filamentous bacteriophage. *In* "the Bacteriophages" (R. Calendar. Ed). 1988; 2:375-456.
- Muir K, Squire Y: Anticardiolipin Antibodies in an Unselected Stroke Population. *Lancet* 1994; 344: 452-6.

Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Beta 2-glycoprotein I (apo H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis* 1987; 63: 109-114.

Radic MZ, Weigert M. Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Ann Rev Immunol* 1994; 12:487-520.

Reid KBM and Day AJ. Structure-function relationships of the complement components. *Immunol Today* 1993; 10: 177-180.

Rioux JD, Zdarsky E, Newkirk MM, Rauch J. Anti-DNA and anti-platelet specificities of SLE-derived autoantibodies: evidence for CDR2H mutations and CDR3H motifs. *Mol Immunol* 1995; 32:683-96.

Roubey, RAS. Immunology of the Antiphospholipid Antibody Syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39(9):1444 - 1454.

Schroeder Jr. HW and Wang JY. Preferential utilization of conserved Immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:6146.

Schousboe I. Beta 2-glycoprotein: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985; 66: 1086-1091.

Sheng Y, Kandiah DA, Krilis SA. b2-Glycoprotein I: target and antigen for "antiphospholipid" antibodies. Immunological and molecular aspects. *Lupus* 1998; 7 (Suppl. 2): S5-S9.

Shlomchik, MJ, Marshak-Rothstein, C.B.Wolfowicz, et al. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 1990; 328:805.

Siminovitch KA, Misener V, Kwong PC, et al. A natural auto antibody is encoded by germline heavy and lambda light chain variable region genes without somatic mutation. *J Clin Invest* 1989; 84:1675-8

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virión surface. *Science* 1985; 228:1315-1317.

Soulier J-P, Boffa M-C. Avortements a repetition, thromboses et anticoagulant circulant anti-thromboplastine. Trois observations. *Nouv Presse Med* 1980;9:859-864.

Steinkasserer A, et al. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human b2-glycoprotein I. *Biochem J* 1991; 277: 387-391.

Subang R, Levine SJ, Janoff SA. Phospholipid-Bound β 2-Glycoprotein I Induces the Production of Anti-Phospholipid Antibodies. *J of Autoimmunity* 2000; 15:21-32

Tincani A, et al. The Anti beta 2 Glycoprotein I activity in human antiphospholipid syndrome sera is due to monoreactive low affinity autoantibodies directed to epitopes located on native beta 2 Glycoprotein I and preserved during species evolution. *J Immunol* 1996; 157: 5732-5738

Van Es JH, Aanstoot H, Gmelig-Meyling FH, et al. A human systemic lupus erythematosus related anti-cardiolipin/single-stranded DNA autoantibody is encoded by a somatically mutated variant of the developmentally restricted 51P1 VH gene. *J Immunol* 1992; 149: 2234-40.

Van Wezenbeek, P.M.G.F., Hulsebos, T.J.M., and Schoenmakers, J.G.G. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: Comparison with phage fd. *Gene* 1980; 11:129-148.

Von Landenberg C, Lackner KJ, von Landenberg P, et al. Isolation and characterization of two human monoclonal anti-phospholipid IgG from patients with autoimmune disease. *J Autoimmun* 1999; 13:215-23.

Wang M-X, et al. Epitope specificity of monoclonal anti-b2-glycoprotein I antibodies derived from patients with the antiphospholipid syndrome. *J Immunol* 1995; 155: 1629-1636.