

**ACTIVACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL INDUCIDA POR ANTICUERPOS
DE PACIENTES CON DIFERENTES MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL
SÍNDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO**

Manuela Velásquez Berrio. Biol. MSc

**Tesis sometida en cumplimiento a los requisitos para obtención del título de doctor en
Ciencias Básicas Biomédicas**

Asesora

Ángela P. Cadavid J. MD, MSc, Dr. Sci. Profesora titular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Coordinadora Grupo Reproducción. Medellín, Colombia.

Co-asesor

Sebastián San Martín H. PhD. Profesor titular. Centro de Investigaciones Biomédicas. Escuela de Medicina-Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

Comité asesor

Paula Andrea Velilla Hernández. Bact, MSc, PhD. Profesora, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Mauricio Rojas López. Biol, MSc, PhD. Profesor, Instituto de investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Coordinador Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG), Medellín, Colombia.

Raúl Narváez Sánchez. MD, MSc, PhD. Profesor, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

**Universidad de Antioquia
Corporación Ciencias Básicas Biomédicas
Grupo Reproducción
Medellín, Colombia
2022**

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a Dios por darme vida, salud y la oportunidad de hacer todo este trabajo para optar al título de doctorado. Esta tesis está dedicada principalmente a mi hija **Rafaela**. Has sido mi mayor aliciente. El tenerte dentro de mi al realizar cada uno de los últimos ensayos me llenó de ánimo y me dio esa razón que me faltaba para seguir adelante. Sentirte crecer sana y hermosa como podíamos ver desde cada una de tus ecografías llenaron de amor, alegría y emoción esos días difíciles de tanto estrés y compromisos. Después de que naciste, cuidarte y verte crecer me llenaron de fortaleza para culminar la escritura de este trabajo. Te amo hija y todo este esfuerzo es principalmente por ti. Eres el regalo más hermoso que Dios me ha dado.

También quiero dedicarle este trabajo a mi esposo **José Danilo**. Gracias por tu paciencia, compañía, ayuda y comprensión. Gracias por estar a mi lado en cada congreso y viaje dejando tus cosas de lado. Dios te recompense por todo el apoyo incondicional que me has dado. Gracias por acompañarme esos fines de semana y esas noches estudiando o en el laboratorio. Nada ha sido fácil para nosotros pero hemos aprendido y crecido juntos en todas las áreas de nuestra vida. Gracias a Dios por tu vida. Te amo.

A mis padres **Patricia** y **Edgar** y a mi hermano **Samuel**, quiero dedicarles mi trabajo y agradecerles por tanto. **Mama hermosa** gracias por el apoyo, la ternura, el amor, tus consejos y tus abrazos en los momentos más difíciles. **Papa lindo** gracias por darme tanto amor y seguridad. Me enseñaste a ser fuerte y a buscar soluciones siempre en lugar de ahogarme en los problemas, lo cual apliqué constantemente en mi proceso formativo y de investigación. **Hermanito lindo** gracias por tu compañía y amor en los momentos más duros. No sé qué habría hecho sin ti. Gracias infinitas a mi familia hermosa, los amo con el alma.

Por último agradezco a mi tutora, la profe Ángela. Gracias profe por ser mi maestra, por tanta paciencia, por entenderme y ayudarme en todo. Incluso en mi embarazo y posterior maternidad como estudiante de doctorado. Dios la bendiga siempre. La aprecio muchísimo.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Quiero agradecer a mi cotutor, el profesor **Sebastián**. Gracias profe por su apoyo incondicional en cada etapa de mi proceso formativo. Sus comentarios siempre fueron propositivos y esenciales para el desarrollo de cada parte del trabajo. Gracias por aportar siempre soluciones a los problemas que facilitaron el desarrollo ágil de la investigación. Siempre lo voy a recordar con mucho aprecio y cariño.

Gracias a mi comité asesor por ser un apoyo real en mi proceso de formación. Gracias profe **Mauricio** por su apoyo incondicional en todo y la disponibilidad para aportar mejoras al diseño de los experimentos y posteriores análisis. Gracias por sus enseñanzas en mis inicios como investigadora desde que era estudiante de biología que me facilitaron realizar la maestría y finalmente la tesis doctoral. Gracias profe **Raúl** por el apoyo, el respeto y la amabilidad en cada una de las reuniones de comité asesor. Gracias por aportar siempre soluciones y animarme a seguir adelante. Gracias profesora **Paula** por siempre indicarme la necesidad de simplificar los resultados y plantear con mayor claridad la pregunta de investigación. Finalmente esto me permitió realizar los manuscritos con mayor facilidad.

Gracias a mis compañeros y profesores del **Grupo Reproducción** por el acompañamiento y apoyo durante mi proceso formativo. Especialmente agradezco a **Manuel Granada, Carlos Rodríguez** y **Daniel Alvarez** por ser mis compañeros de laboratorio y posteriormente amigos con los que aún comparto. Siempre fuimos un excelente equipo de trabajo en la línea de investigación en Alteraciones de la Gestación y Autoinmunidad. El compañerismo y amabilidad hicieron más ameno y exitoso nuestro proceso de formación. Agradezco a mis estudiantes Luisa Fernanda, Julián Galvis y Juan José por su responsabilidad, respeto y compromiso con el desarrollo del trabajo. Además del cariño para conmigo. Los aprecio muchísimo. A los demás compañeros del grupo, **Julio, Walter, Jennifer y Beatriz** gracias por su compañerismo, apoyo y aportes a mi trabajo durante las reuniones académicas.

Finalmente agradezco a todas las pacientes que aceptaron amablemente participar en el estudio y actualmente forman parte del grupo de Apoyo SAF-COLOMBIA.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO	8

CAPÍTULO I. Introducción general, planteamiento del problema, hipótesis, objetivo general y objetivos específicos:

1.Introducción general	10
1.1 Generalidades del endotelio	
1.2 Activación y disfunción endotelial en el síndrome antifosfolipídico y cofactores involucrados	
• Anexo 1	
<i>Velásquez, M., Rojas M., Abrahams, V.M., Escudero, C., and Cadavid, Á.P. (2018). Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association with Clinical Manifestations. Front. Physiol. doi:10.3389/fphys.2018.01840.</i>	
• Anexo 2	
<i>Fierro JJ., Velásquez M., Cadavid Á.P., de Leeuw K. Effects of anti-beta 2-glycoprotein 1 antibodies and its association with pregnancy-related morbidity in antiphospholipid syndrome. Am J Reprod Immunol. 2021; e13509. https://doi.org/10.1111/aji.13509</i>	
1.3 Modulación de los efectos patológicos de los anticuerpos antifosfolipídicos	
• Anexo 3	
<i>Velásquez M., Fierro JJ., de Leeuw K., Ospina A., Cadavid Á. P. Hydroxychloroquine, a multifaceted drug and its use in antiphospholipid refractory syndrome. (Manuscrito en preparación por los coautores para someter a la revista Am J Reprod Immunol).</i>	
2.Planteamiento del problema	17
3.Pregunta de investigación	18
4. Hipótesis	18
5.Objetivo general	18
5.1 Objetivos específicos	18

CAPÍTULO II. Artículos originales con los resultados de los objetivos de la tesis:

6. Activación endotelial inducida por el suero de diferentes grupos de pacientes con síndrome antifosfolipídico	
• Anexo 4	
<i>Velasquez, M., Granada, M.A., Galvis, J.C., Alvarez, A.M., and Cadavid, Á.P. (2019). Oxidative stress in endothelial cells induced by the serum of women with different clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome. Biomedica 39(4), 673-688. doi: 10.7705/biomedica.4701</i>	
7. Activación y disfunción endotelial inducida por los anticuerpos antifosfolipídicos de diferentes grupos de pacientes con SAF	
• Anexo 5	

Velásquez M, Peláez LF, Rojas M, Narvaez-Sanchez R, Velásquez JA, Escudero C, San Martín S and Cadavid Á.P (2021) Differences in Endothelial Activation and Dysfunction Induced by Antiphospholipid Antibodies Among Groups of Patients With Thrombotic, Refractory, and Non-refractory Antiphospholipid Syndrome. Front. Physiol. 12:764702. doi: 10.3389/fphys.2021.764702.

CAPÍTULO III. Discusión, conclusiones, perspectivas y presentación de resultados

8. Discusión general	21
9. Conclusiones	29
10. Perspectivas	29
11. Referencias	30
12. Resúmenes publicados y presentaciones orales (Anexo 6)	
13. Apropiación social del conocimiento (Anexo 7)	

CAPÍTULO IV. Otros mecanismos patológicos de los anticuerpos antifosfolipídicos que inducen alteración endotelial

- Anexo 8

Rodríguez CM, Velásquez M, Rúa C, Viana M, Abrahams VM, Cadavid Á.P and Alvarez AM (2021) Antiphospholipid Antibodies From Women With Pregnancy Morbidity and Vascular Thrombosis Induce Endothelial Mitochondrial Dysfunction, mTOR Activation, and Autophagy. Front. Physiol. 12:706743. doi: 10.3389/fphys.2021.706743

- Anexo 9

Granada M., Velásquez M., Rúa C., San Martín S., Escudero C., Alvarez A., Cadavid Á.P. Modulation of the activation of endothelial nitric oxide synthase and nitrosative stress biomarkers by aspirin triggered lipoxins: A possible mechanism of action of aspirin in the antiphospholipid syndrome?(Manuscrito en preparación por coautores para ser sometido a Am J Reprod Immunol).

Resumen

El síndrome antifosfolípídico (SAF) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia persistente de anticuerpos antifosfolípídicos (aAFL) y morbilidad gestacional o trombosis. Los aAFL se unen al endotelio e inducen activación y disfunción endotelial. Esta alteración endotelial favorece el desarrollo de las manifestaciones clínicas del SAF y es un componente clave en el desencadenamiento de los casos más severos de este síndrome. Las pacientes con SAF pueden ser clasificadas en diferentes grupos de acuerdo con las manifestaciones clínicas. Esta clasificación incluye la presencia de SAF primario o asociado a otras enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES), SAF trombótico (trombosis sola) o SAF obstétrico (morbilidad gestacional), el cual puede presentarse con o sin trombosis. De las pacientes con SAF obstétrico, únicamente el 70% logra el éxito gestacional con la terapia convencional de heparina y aspirina. El 30% restante presenta refractariedad a este tratamiento. Para estas pacientes se ha propuesto el uso de hidroxiclороquina, pero aún no son claros los mecanismos de acción involucrados. El entendimiento de los mecanismos de activación y disfunción endotelial en los diferentes grupos de pacientes con SAF, permitiría el estudio de nuevas terapias específicamente para los casos refractarios. El objetivo de este trabajo fue evaluar diferencias en la activación y disfunción endotelial, inducida por los aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario en contraste con los aAFL de pacientes con otras manifestaciones clínicas de este síndrome. Se evaluó el efecto del suero y las inmunoglobulinas G (IgG) de los diferentes grupos de pacientes y controles sobre varios modelos de activación y disfunción endotelial. Los resultados del trabajo indicaron que los aAFL de pacientes con distintas características clínicas del SAF inducen activación y disfunción endotelial por diferentes mecanismos, y que en algunos casos se puede o no requerir la adición de cofactores como la β_2 GPI. En adición a lo anterior, se evaluó el efecto modulador de la aspirina, la heparina y la hidroxiclороquina sobre la disfunción endotelial y se encontró que tanto la heparina como la hidroxiclороquina únicamente modulaban la disfunción endotelial inducida por las IgG de pacientes con SAF obstétrico refractario primario. Nuestro diseño experimental permite evaluar nuevas terapias para los casos más severos y refractarios del SAF en diferentes poblaciones de pacientes.

Abstract

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disorder characterized by pregnancy morbidity or thrombosis and persistent antiphospholipid antibodies (aPL) that bind to the endothelium and induce endothelial activation. These endothelial alterations are associated with the induction of clinical manifestation and are the key components for the development of severe pathological processes in APS. Patients with APS can be grouped according to the clinical manifestations of this syndrome. This classification includes the presence of primary or secondary APS when other diseases are present, such as systemic lupus erythematosus (SLE), thrombotic APS (thrombosis alone), or obstetric APS, which can present with pregnancy morbidity alone or with thrombosis. 70% of patients with obstetric APS get pregnancy success with conventional treatment regimens. The remaining 30% are refractory to this treatment. Hydroxychloroquine has been used in patients with obstetric and refractory APS, however, the mechanism of action involved in these patients has not been fully understood yet. The elucidation of the mechanisms underlying these alterations according to the different groups of patients with APS could help establish new therapies, particularly necessary for severe and refractory cases. Therefore, this study aimed to evaluate the differences in endothelial activation and dysfunction induced by aPL between patients with refractory obstetric APS and other APS clinical manifestations. The effect of serum and immunoglobulins G (IgG) on different models of endothelial activation and dysfunction was evaluated. Our results indicated that the aPL from patients with different clinical manifestations of APS induce activation and endothelial dysfunction by different mechanisms, in some cases, β 2GPI was required. In addition to the above, aspirin, heparin and hydroxychloroquine's modulating effect on endothelial dysfunction were evaluated. We found that both heparin and hydroxychloroquine modulated endothelial dysfunction induced by patients with primary refractory obstetric APS. Our experimental design will allow us to evaluate in future assays new therapies for the most severe and refractory cases of APS in different patient populations.

DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto titulado “*Mecanismos de daño y disfunción endotelial en el síndrome antifosfolípido: ¿hay diferencias de acuerdo con las manifestaciones clínicas del síndrome?*” aprobado por Minciencias con el apoyo financiero de la convocatoria 757 de doctorados nacionales Minciencias (código de registro 62949, contrato 748-2018). El desarrollo de este estudio permitió realizar una amplia descripción de los mecanismos de activación y disfunción endotelial de acuerdo con las manifestaciones clínicas de pacientes con SAF.

En el capítulo I de este trabajo se realizó una revisión de la literatura donde se detectó que a pesar de la existencia de numerosos reportes sobre los efectos patológicos de los aAFL especialmente sobre el endotelio, no se habían establecido las posibles diferencias de estos mecanismos patológicos que llevaban a la presentación de las diversas manifestaciones clínicas del SAF. Esto se planteó como un aspecto clave ya que en la actualidad existen pacientes con SAF refractario para las cuales es necesario proponer el estudio de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces. En esta revisión de la literatura también indicamos que la falta de una clasificación correcta de las pacientes con SAF de acuerdo con las manifestaciones clínicas en los estudios en los cuales se evaluaban los efectos patológicos de los aAFL sobre el endotelio, representaba un obstáculo para el entendimiento de la enfermedad, considerando la ausencia de tratamientos eficaces para los casos más severos (**Anexo 1**). Además, se detectó la necesidad de una mayor claridad en la descripción de la importancia del principal antígeno del SAF, la β_2 GPI, la cual se asocia directamente con la severidad del SAF obstétrico (**Anexo 2**). En las revisiones anteriormente descritas se encontró que la falta de reportes con la clasificación de las pacientes de acuerdo con las manifestaciones clínicas limitaba el uso de medicamentos como la hidroxiclороquina, que han sido usados empíricamente en el SAF obstétrico refractario, requiriendo mayor claridad acerca de su mecanismo de acción. Lo anterior nos llevó a plantear posibles actividades moduladoras de este fármaco en el SAF y a resaltar los vacíos en el conocimiento, que podrán ser estudiados en trabajos futuros (**Anexo 3 Manuscrito en preparación por los coautores para someter a la revista Am J Reprod Immunol**). La información recopilada y revisada permitió plantear los vacíos en el conocimiento que dieron lugar al planteamiento del problema, la pregunta de investigación, la hipótesis, objetivo general y objetivos específicos del trabajo.

En el capítulo II de esta tesis se tenían las herramientas para el desarrollo del trabajo experimental. En principio con las pacientes con SAF que se habían captado a la fecha, se realizó una clasificación de acuerdo con la presencia de trombosis, morbilidad gestacional o ambas. De estas pacientes se usó el suero y se realizaron ensayos preliminares que permitieron encontrar diferencias en los mecanismos de activación endotelial (**Anexo 4**). Una vez completado el número de pacientes del estudio se realizó una purificación de las IgG de los sueros con el fin de evaluar el efecto de los aAFL sobre la activación y disfunción endotelial, con la adición o no, de la β_2 GPI. En este estudio evidenciamos diferencias en los mecanismos de activación y disfunción endotelial entre todos los grupos con SAF así como la dependencia o no del cofactor β_2 GPI para mediar esta alteración endotelial en algunos casos (**Anexo 5**). En este mismo manuscrito se determinó que la heparina y la

hidroxicloroquina eran efectivas únicamente en modular la disfunción endotelial inducida por los aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario primario.

En el capítulo III se discuten los resultados obtenidos en el capítulo II, con el fin de proponer los mecanismos de activación y disfunción endotelial según las características clínicas de las pacientes. También se incluyen las conclusiones y perspectivas de este trabajo además de las presentaciones realizadas en eventos nacionales e internacionales (**Anexo 6**). La financiación por Minciencias del proyecto “*Mecanismos de daño y disfunción endotelial en el síndrome antifosfolípido: ¿hay diferencias de acuerdo con las manifestaciones clínicas del síndrome?*” permitió participar en un apoyo adicional para promover la apropiación social del conocimiento en la cual se desarrolló un afiche, un plegable y un manual para los pacientes del grupo de apoyo SAF-COLOMBIA (creado también a partir de esta estrategia) y demás pacientes con SAF (**Anexo 7**).

Finalmente, en el capítulo IV se presenta el resultado de la participación que tuve en simultánea con el desarrollo de mi tesis, en dos trabajos de maestría que incluyen el estudio de otros mecanismos patológicos de los aAFL sobre el endotelio. En el primer trabajo realizado por Carlos Mario Rodríguez, participé en el diseño de los ensayos, el análisis de los datos y el plantamiento del problema de los posibles mecanismos de estrés endotelial inducidos por los aAFL, que incluyen la hiperpolarización mitocondrial y la activación de diana de rapamicina en mamífero (mTOR) en asociación con la autofagia. Los resultados de este trabajo fueron publicados y fui incluida como segundo autor según todo lo realizado (**Anexo 8**). En el segundo trabajo realizado por Manuel Granada, participé en el diseño de los ensayos, la elaboración del manuscrito y reanálisis de los datos (**Anexo 9**, (*Manuscrito en preparación por el coautores para ser sometido a Am J Reprod Immunol*)) con la misma contribución que el primer autor. En este último manuscrito se encontraron diferencias en los mecanismos asociados con la activación y disfunción endotelial entre los grupos de pacientes con SAF, y además se describió un mecanismo modulador de la aspirina mediado por las lipoxinas inducidas por la aspirina.

CAPÍTULO I. Introducción general, planteamiento del problema, pregunta de investigación, hipótesis, objetivo general y objetivos específicos:

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Generalidades del endotelio

El endotelio se define como una estructura celular dinámica que forma una monocapa en toda la vasculatura y está en contacto continuo con la sangre; se estima que contiene 1 a 6×10^{13} células en su área de 7 m² de superficie, y un peso de 1-1,8 Kg aproximadamente en su masa total (1).

1.1.1 El endotelio: acercamiento histórico

El endotelio fue descrito por primera vez en 1847 mediante la observación de un revestimiento celular o pared capilar, que años después sería detectada en los vasos linfáticos como una sola capa de células (2). Sin embargo, el término endotelio fue usado por primera vez en 1865 para definir la capa interna de los vasos sanguíneos (3). En 1973, los ensayos de Jaffe y colaboradores fueron claves para el estudio *in vitro* del endotelio humano, ya que se lograron aislar células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) (4). En 1974, se establecieron las características del cultivo de las HUVEC considerando que al ser una fuente de endotelio humano de fácil acceso, representaban una mejor opción para el estudio de los mecanismos biológicos de estas células en contraste con el endotelio de otras especies, permitiendo en 1986 el uso de este modelo para evaluar las funciones de este tipo celular en la vasopermeabilidad, y su implementación hasta la actualidad, en el estudio del endotelio venoso (5-7). Posteriormente se demostró que el endotelio producía un factor relajante que resultó ser el óxido nítrico o *nitric oxide* (NO), un gas que se produce a partir de la L-arginina ante el estímulo con diversos agonistas mediante la enzima óxido nítrico sintasa o *nitric oxide synthase* (NOS) (8). Esta enzima tiene tres isoformas: endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) expresadas constitutivamente en el endotelio; y la isoforma inducible o (iNOS) activada principalmente en procesos inflamatorios (9-11). Según estos hallazgos, en el endotelio se expresan las tres isoformas de la NOS, pero la eNOS es la principal responsable de la producción de NO en el sistema cardiovascular (12).

1.1.2 Funciones del endotelio en condiciones homeostáticas

1.1.2.1 Endotelio como regulador de la coagulación y la inflamación

Las células endoteliales funcionan como reguladoras del paso de nutrientes y células del sistema inmune desde la circulación sanguínea hacia los tejidos (1). En condiciones homeostáticas, el endotelio se mantiene en un estado “inactivo” (Figura 1) con función anticoagulante y antiinflamatoria (Figura 1) o un estado “activo” cuando se requiere dar una respuesta inflamatoria (13). El efecto antiinflamatorio endotelial es modulado por la tensión de cizallamiento (conocida como *shear stress*), la cual indica la fuerza por unidad de área que ejerce la sangre sobre la pared de los vasos (14). Los patrones del flujo sanguíneo modulan la activación de factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB), y en consecuencia la expresión de moléculas de adhesión para inhibir la unión de leucocitos (15) (Figura 1). En el proceso de la coagulación y la formación de trombos ocurre una disrupción en la función anticoagulante del endotelio (16). Este proceso se genera en tres fases: iniciación, amplificación y propagación. La trombosis se desencadena con un iniciador que causa reacciones asociadas con inflamación y activación endotelial (17). Esta activación se caracteriza por la expresión de FT tanto en el endotelio como en las células del músculo liso, el cual desencadena la cascada de la coagulación por la vía extrínseca (17). En la amplificación, las plaquetas adheridas se activan por la trombina y forman agregados. Finalmente, en la fase de propagación, la formación de trombina se amplifica en las plaquetas activadas. Este sistema es sensible a la alteración de cualquiera de las vías anticoagulantes indicadas en la figura 1.

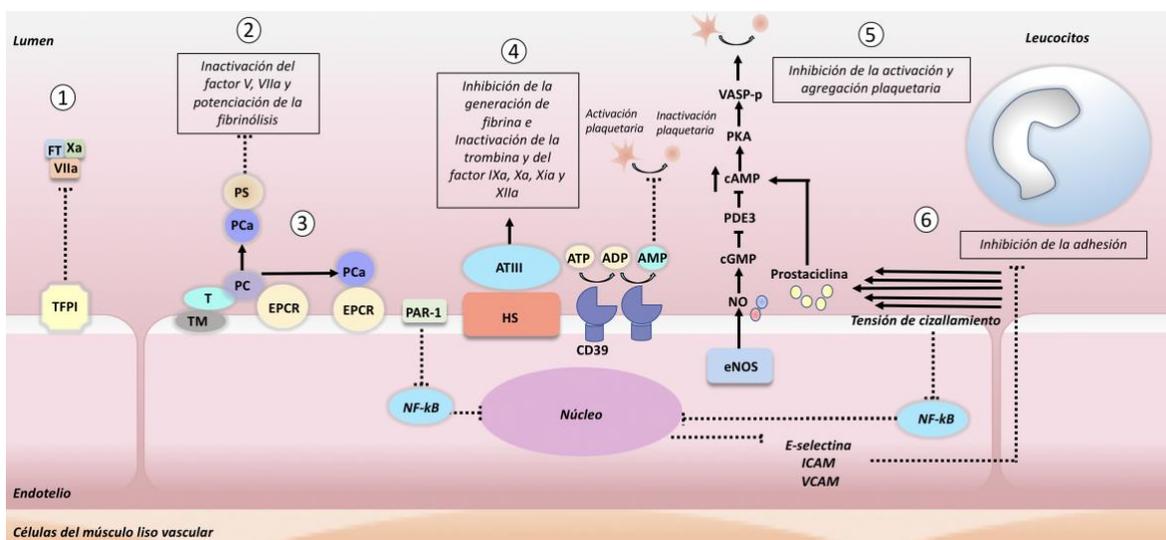


Figura 1. Función anticoagulante y antiinflamatoria del endotelio. 1) El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) inhibe al factor tisular (FT) mediante la unión con el complejo que incluye al FT, al factor Xa y al factor VIIa, bloqueando a su vez la activación de la vía extrínseca de la coagulación. 2) La trombina/trombomodulina (T/TM) generan la activación de la proteína C (PC) acelerada por el receptor de proteína C endotelial (EPCR) que induce junto con la proteína S (PS) la hidrólisis de factores de la coagulación V y VIIa. 3) La formación del complejo EPCR y la PC activada (PCa) induce su efecto antiinflamatorio

mediante la activación del receptor 1 activado por proteasa (PAR-1), el cual inhibe la translocación del factor NF- κ B al núcleo que a su vez regula los genes asociados con la expresión de moléculas de adhesión como la E-selectina, la molécula de adhesión intercelular I (ICAM-I) y la molécula de adhesión celular vascular-I (VCAM-I). 4) La unión del heparán sulfato (HS) y la antitrombina III (ATIII) inhiben la generación de fibrina y trombina mediante la inactivación de factores de la coagulación. 5) El CD39, degrada a los activadores plaquetarios adenosina trifosfato (ATP) y adenosina difosfato (ADP), en adenosina monofosfato (AMP) que inhibe la activación plaquetaria. 5) El NO endotelial generado activa a la guanilil ciclasa soluble para sintetizar guanosin 3', 5' monofosfato cíclico (cGMP), que activa a las proteínas quinasas dependientes de cGMP e inhibe a la fosfodiesterasa 3 (PDE3), que degrada al monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Al inhibir esta fosfodiesterasa se eleva el cAMP que activa a la proteína quinasa dependientes de cAMP (PKA) que fosforila en la serina 239 a la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP). 5) Así como el NO induce el incremento de cAMP, la prostaciclina también lo aumenta, permitiendo la fosforilación de VASP y en consecuencia inhiben la activación plaquetaria. 6) La tensión de cizallamiento en condiciones homeostáticas ejerce un efecto antiinflamatorio en el endotelio inhibiendo la activación del factor NF- κ B evitando la expresión de moléculas de adhesión y por ende la interacción con leucocitos. Las vías que indican inhibición o inactivación se muestran con líneas punteadas (18-27). (**Imagen realizada por Manuela Velásquez Berrio**).

1.1.2.2 Endotelio como regulador del tono vascular

Una de las principales funciones del endotelio es mantener el tono vascular, mediante diversos factores incluyendo al NO, el cual además de regular el crecimiento celular y protege al vaso sanguíneo (28). En la producción de NO, las NOS generan interacciones proteína-proteína y se incluyen diferentes cofactores. Las NOS forman homodímeros y usan a los electrones NADPH donados para catalizar la oxidación de L-arginina a L-citrulina y NO mediante la hidroxilación de L-arginina a N^ω-hidroxi-L-arginina. Esta al ser oxidada por el efecto catalizador que ejerce la misma enzima se transforma en L-citrulina liberándose el NO (29). Las NOS pueden activarse mediante diferentes vías de señalización. Específicamente la eNOS se activa de manera dependiente e independiente del calcio. La fosforilación en la serina 1177 en el dominio reductasa, conduce a una mayor sensibilidad al calcio. En esta vía intervienen otras proteínas como la proteína quinasa B (Akt), lo cual ha sido evidenciado al inhibir la vía fosfatidilinositol 3 quinasa/Akt o al inducir la mutación del sitio de unión de la Akt en la eNOS, que genera una atenuación en la fosforilación de la serina 1177 bloqueando su activación (30). En la vía dependiente de calcio, inicialmente se requiere la unión de acetilcolina, bradiquinina e histamina a sus receptores en la superficie de la membrana celular endotelial, para aumentar el calcio intracelular que se une a la calmodulina, conduciendo a la activación del dominio de unión a calmodulina de la eNOS, requerido para la producción de NO (31). En contraste, en la vía independiente de calcio, la tensión de cizallamiento ejercida por la sangre sobre el endotelio y las hormonas como la adiponectina o la insulina, inician la

activación de la eNOS (31). Una vez se produce el NO por la activación previa de la eNOS, llega a las células del músculo liso vascular y activa la guanilato ciclasa conduciendo a la vasodilatación mediada por cGMP, el cual activa a la proteína quinasa G que evita la entrada de calcio e induce su salida desde el citosol al exterior.

1.1.2.3 Endotelio y la preservación de su integridad

Un endotelio sano posee la capacidad endógena de repararse así mismo mediante diferentes mecanismos que implican la replicación de células ya diferenciadas que reemplazan a las células faltantes a causa de alguna lesión (32). En adición a este mecanismo, también se ha evidenciado que en la circulación, las células progenitoras endoteliales circulantes se diferencian y adquieren características de endotelio para reparar el vaso, sin embargo estas células son mínimamente proliferativas y derivadas de un linaje monocítico mieloide, que más que ser una fuente de células nuevas, ejercen un efecto paracrino sobre las células endoteliales residentes mediante la inducción de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve su proliferación (33).

1.1.3 Activación y disfunción endotelial

Como se señaló previamente, cuando el endotelio es agredido cambia a su estado “activo”. La activación y disfunción endoteliales son distintos estados del endotelio que pueden asociarse, y que se desencadenan en diferentes contextos patológicos como resultado del tabaquismo, aterosclerosis, diabetes, infecciones, hipertensión y autoinmunidad, entre otros (34-38). En cada uno de estos estados patológicos se puede generar activación endotelial que lleva a disfunción, o directamente a una de estas dos condiciones de manera independiente.

1.1.3.1 Activación endotelial: inflamación y factores de transcripción involucrados

En la activación endotelial los cambios en el patrón de flujo o tensión de cizallamiento activan al NF- κ B induciendo la expresión de moléculas de adhesión (39). En adición a lo anterior, el estímulo patológico desencadenante puede generar un desequilibrio entre los factores oxidantes y antioxidantes celulares, llevando a estrés oxidativo que contribuye a la activación del NF- κ B (40). El endotelio activado se caracteriza por la expresión de moléculas de adhesión como E-selectina, ICAM-I y VCAM-I (41). Desde la década de los 80, se evidenció que al endotelio tratado con citoquinas proinflamatorias se unían de 20 a 40 veces más leucocitos que al endotelio no estimulado (42). Específicamente, citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) al unirse con su receptor, activa la vía de señalización que involucra a los factores de transcripción NF- κ B y a la proteína activadora 1 (AP-1) que participan en la inducción de estas moléculas de adhesión (41). Las moléculas de adhesión median la interacción con leucocitos en el endotelio de las vénulas postcapilares para promover la migración transendotelial. En el primer paso hacia la activación endotelial, el

desencadenante inflamatorio induce la expresión de P-selectina (preformada en los cuerpos de Weibel-Palade), VCAM-1 y Sialil Lewis X (S-Le^x) en el endotelio, que se unen al ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), VLA-4 y L-selectina expresados en leucocitos, los cuales se unen a sus respectivos receptores en el endotelio en la fase de captura y rodamiento rápido. En estas fases iniciales se generan uniones débiles entre leucocitos y endotelio; posteriormente la E-selectina expresada se une al PSGL-1 y al ligando-1 de E-selectina (ESL-1) de los leucocitos. En esta misma fase, la ICAM-1 endotelial se une a la Mac-1 y a la LFA-1 leucocitaria dando lugar a la activación y adhesión mediada por quimiocinas en el endotelio y la expresión de VCAM-1 que proporciona estabilidad a esta interacción (43). Después de esta adhesión se genera la locomoción y diapédesis, en las cuales los leucocitos realizan la migración transendotelial, hacia la membrana basal y el tejido intersticial (44).

1.1.3.1 Disfunción endotelial: liberación de óxido nítrico y producción de vesículas extracelulares

Los antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa ayudan a mantener el NO, pero al perderse el balance con los oxidantes, estos últimos aumentan y consumen al NO conduciendo a disfunción endotelial (45). Sin embargo, en enfermedades como la diabetes tipo II y la hipertensión, la disfunción endotelial se induce directamente por la producción de inhibidores de la eNOS que reducen el NO (46, 47). Con esta disminución de NO se incrementa la expresión de moléculas de adhesión que en condiciones normales serían inhibidas por el mismo NO mediante la reducción de la activación del factor NF- κ B (48, 49). La asociación entre eventos que llevan a activación y disfunción endotelial indica que uno podría llevar al otro, e incluso potenciarse y desencadenar un estado procoagulante. Este estado alterado del endotelio se amplifica mediante la liberación celular de unas partículas llamadas vesículas extracelulares, que además de facilitar la comunicación intercelular modulan los procesos de inflamación y posteriormente, de reparación (50). Según la *Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares*, estas son partículas compuestas por bicapas de lípidos que transportan una gran variedad de moléculas como RNA, DNA y proteínas (51). Sin embargo, no existe un consenso sobre marcadores específicos ni tipos únicos de moléculas transportadas por diferentes subtipos de vesículas extracelulares que se han reportado en la literatura como exosomas (de origen endosomal) y ectosomas/micropartículas (derivados de la membrana plasmática) por lo cual actualmente todas estas estructuras se denominan vesículas extracelulares (52). Estas vesículas se pueden detectar mediante su composición bioquímica por la positividad para el marcaje con Anexina V y pueden ser pequeñas si miden menos de 200 nanómetros y medianas/grandes si miden más (52, 53). En diversas enfermedades las vesículas extracelulares han sido implementadas como biomarcadores que pueden predecir el estado endotelial (54). En alteraciones cardiovasculares se ha encontrado un incremento en la producción vesículas extracelulares endoteliales detectadas por el marcaje con CD31 y anexina V (55). El incremento en la

generación de vesículas extracelulares derivadas del endotelio se ha asociado con disfunción endotelial-vascular (56). Este incremento indica a su vez el estado del endotelio alterado que podría ser de utilidad en el estudio de enfermedades que involucran eventos relacionados con activación y disfunción endotelial (56).

1.2 Activación y disfunción endotelial en el síndrome antifosfolipídico y cofactores involucrados

Tanto la trombosis como la morbilidad gestacional se pueden presentar simultáneamente o por separado en el SAF, una enfermedad autoinmune que además de estas manifestaciones se caracteriza por la presencia persistente de anticuerpos antifosfolipídicos aAFL como el anticoagulante lúpico (AL), los anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) y los anti- β_2 glicoproteína I ($\alpha\beta_2$ GPI) (57). El SAF presenta una incidencia anual de 2,1 por 100.000 habitantes en adultos mayores de 18 años y una prevalencia de 50 por 100.000 habitantes sin diferencias entre sexos (58). En población general la prevalencia de los aAFL se encuentra entre el 1 y el 5% de los casos (59). Estos aAFL pueden desencadenar la activación y disfunción endotelial y en consecuencia las manifestaciones clínicas de trombosis y morbilidad gestacional por diferentes mecanismos mediados o no por la β_2 GPI (60).

Los aAFL inducen activación y disfunción endotelial por diferentes mecanismos que en consecuencia conducen a la morbilidad gestacional y la trombosis.

Los aAFL podrían desencadenar la trombosis por medio de (Figura 2A): 1) La disminución de la activación de la eNOS por la unión a la β_2 GPI que a su vez se asocia con el receptor ApoER2 que activa a la proteína fosfatasa 2 A (PP2A) reduciendo la fosforilación de la eNOS en la serina 1177 en humanos y 1179 en bovinos, esta disminución bloquea la producción de NO el cual es requerido para inhibir la activación plaquetaria en condiciones homeostáticas (Figura 1) (61, 62); 2) El Incremento en la producción de la proteína quimioatrayente de monocitos -1 y del factor tisular, lo cual incrementa la activación endotelial y la activación de la cascada de la coagulación (63-65); 3) El aumento en la adhesión de los monocitos al endotelio por la unión a la Anexina A2 y la β_2 GPI (66); 4) La inducción de la unión de C5a con C5aR que podría incrementar el factor tisular (65, 67) y 5) la generación de vesículas extracelulares (micropartículas) que podrían presentar un efecto procoagulante (68).

En el desarrollo de la morbilidad gestacional los aAFL podrían desencadenar activación y disfunción endotelial por mecanismos como (Figura 2B): 1) Incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno asociadas con la activación de p38 MAPK y el NF- κ B que en consecuencia inducen la expresión de factor tisular, moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias (69). Esta misma vía puede activarse por el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) mediante la unión de aAFL/ β_2 GPI/receptor tipo Toll (TLR) 2 ó 4 favoreciendo la activación endotelial (70, 71). El incremento en la producción de las especies reactivas del oxígeno consume la liberación de NO y en consecuencia genera disfunción

endotelial (72); 2) Activación de diana de rapamicina en mamífero (mTOR) que altera el endotelio induciendo hiperplasia endotelial (73); 3) Reducción de la remodelación vascular por alteración de la angiogénesis que altera la placentación (Anexo 2)(74); e inducción de inflamación por unión de C3a con C3aR que impide la función endotelial en la placentación (75). Aunque se han planteado asociaciones de los eventos de activación y disfunción del endotelio con el desarrollo de la trombosis y la morbilidad gestacional, en los diferentes estudios por lo general no se clasifican a los pacientes por las manifestaciones clínicas, el sexo, ni se incluyen grupos de individuos con mayor severidad de la enfermedad o refractarios a los tratamientos actuales. Entender estas diferencias en los mecanismos patológicos que pueden desencadenar los aAFL sobre el endotelio en los diferentes grupos de pacientes permitiría el inicio del estudio de nuevas estrategias terapéuticas especialmente para los casos más graves o refractarios. En adición a esto, tampoco es claro si la β_2 GPI es requerida o no en el desarrollo de la trombosis, la morbilidad gestacional o la refractariedad, aunque se ha planteado su asociación en ambas manifestaciones clínicas del SAF (Anexo 1 y 2). Lo anterior limita el estudio de nuevos tratamientos para los casos refractarios. Para estos casos refractarios se ha planteado el uso de la hidroxicloroquina, sin embargo no son claros los mecanismos de acción que permiten la modulación de los efectos de los aAFL ni se conoce en que tipo de pacientes con mayor severidad podría ser efectivo este medicamento posiblemente por la falta de clasificación de los mismos pacientes en trabajos previos (Información ampliada en el anexo 3).

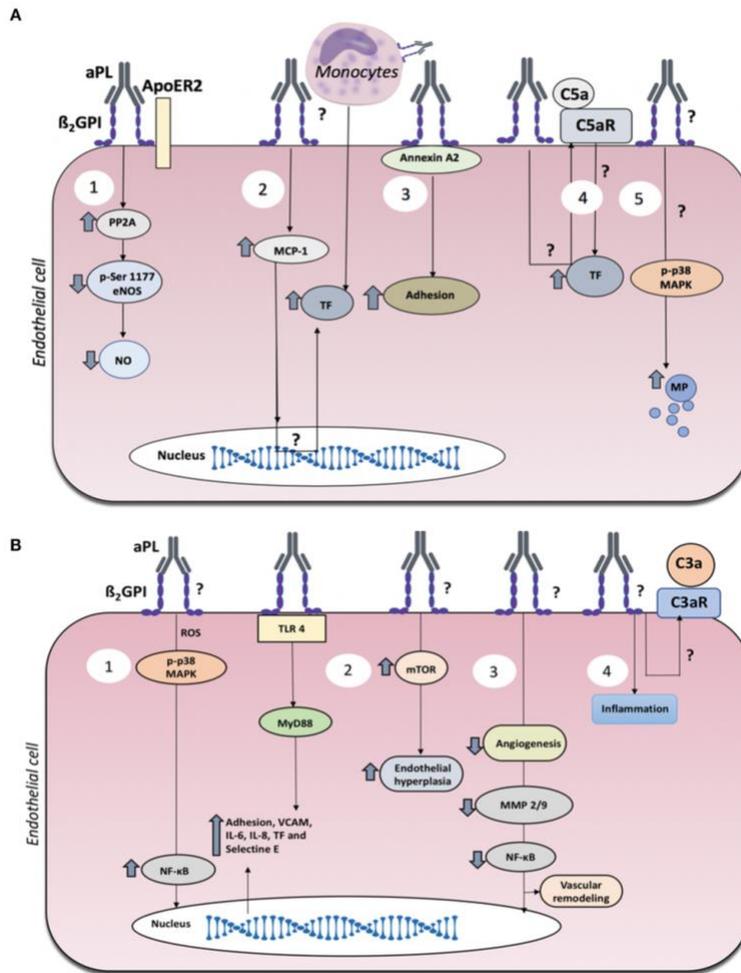


Figura 2. Mecanismos de activación y disfunción endotelial inducidos por los aAFL. (A) Mecanismos de activación y disfunción endotelial asociados con el desarrollo de trombosis inducidos por los aAFL: (1) Reducción de la generación de óxido nítrico vía ApoER2; (2) Incremento en la producción de MCP-1, lo cual favorece la adhesión de los monocitos al endotelio y la producción del factor tisular (TF); (3) La unión de los aAFL a β_2 GPI al complejo anexina A2/ β_2 GPI induce el incremento en la expresión de moléculas de adhesión; (4) La generación del C5a por activación del complemento que induce la expresión del TF e (5) Incremento en la producción de micropartículas endoteliales. (B) Mecanismos de activación y disfunción endotelial asociados con SAF obstétrico con o sin trombosis inducidos por los aAFL: (1) Inducción de inflamación vía TLR/MyD88/MAPK y NF- κ B; (2) Inducción de proliferación mediada por mTOR; (3) Reducción en la remodelación vascular e (4) Inflamación y daño placentario asociados con activación del complemento. (Anexo.1. Velásquez, M., y colaboradores (2018). *Front. Physiol.* doi:10.3389/fphys.2018.0184). La participación de la

2. Planteamiento del problema

Los aAFL funcionan como iniciadores de la activación y disfunción endotelial, lo que podría asociarse con el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, pero esta relación aún no ha sido bien caracterizada (60) (**información ampliada en el anexo 1, 4 y 5**). Los pacientes con SAF se clasifican en diferentes grupos dependiendo de la severidad de las manifestaciones clínicas y los títulos de aAFL presentes. Existen grupos de pacientes con SAF obstétrico que únicamente tienen morbilidad gestacional y positividad para uno de los aAFL, que en la mayoría de los casos logran el éxito gestacional con el tratamiento convencional de heparina y aspirina (76). En contraste, existe un grupo de pacientes con SAF obstétrico, que aparte de presentar morbilidad gestacional tienen trombosis y títulos altos de aAFL para las cuales la terapia convencional no es efectiva, pero se ha demostrado que la adición de hidroxiclороquina (HCQ) al tratamiento, mejora el resultado gestacional (77). La severidad en las manifestaciones clínicas de estas pacientes con morbilidad gestacional y trombosis, junto con los altos niveles de aAFL, podrían estar generando eventos relacionados con activación y disfunción endotelial de mayor severidad (60, 78, 79). Los aAFL inducen activación y disfunción endotelial evidenciadas por el aumento del estrés oxidativo, la expresión de moléculas de adhesión, la generación de vesículas extracelulares y la reducción de NO, pero no se ha establecido la asociación de estos eventos con las características clínicas de las pacientes. Establecer esta relación mediante modelos *in vitro* de activación y disfunción endotelial, proporcionaría herramientas para evaluar nuevas estrategias terapéuticas en los casos refractarios o más severos de este síndrome.

3. Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en la disfunción endotelial y sus mecanismos, inducida por los aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario, en contraste con los aAFL de pacientes con otras manifestaciones clínicas de este síndrome, que sí responden a la terapia convencional con heparina/aspirina?

4. Hipótesis

Los aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario inducen activación y disfunción endotelial a través de mecanismos diferentes a los inducidos por los aAFL de pacientes con otras manifestaciones clínicas de este síndrome.

5. Objetivo general

Evaluar diferencias en la activación y disfunción endotelial, inducida por los aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario en contraste con los aAFL de pacientes con otras manifestaciones clínicas de este síndrome.

5.1 Objetivos específicos

1. Evaluar indicadores de activación y disfunción endotelial inducida por los aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario, en contraste con los aAFL de pacientes con otras manifestaciones clínicas de este síndrome, mediante eventos como: estrés oxidativo, adhesión de leucocitos y generación de vesículas extracelulares (micropartículas).
2. Identificar si la disfunción endotelial inducida por los aAFL de los diferentes grupos de pacientes con SAF, se asocia con disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico e incremento en la expresión de la endotelina- 1.
3. Describir el efecto modulador de los medicamentos heparina, aspirina e hidroxiclороquina, sobre la disfunción endotelial inducida por los aAFL de los diferentes grupos de pacientes con SAF.

CAPÍTULO II. Artículos originales con los resultados de los objetivos de la tesis:

6. *Activación endotelial inducida por el suero de diferentes grupos de pacientes con síndrome antifosfolipídico*

- Anexo 4

Velásquez, M., Granada, M.A., Galvis, J.C., Alvarez, A.M., and Cadavid, Á.P. (2019). *Oxidative stress in endothelial cells induced by the serum of women with different clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome. Biomedica 39(4), 673-688. doi: 10.7705/biomedica.4701*

7. *Activación y disfunción endotelial inducida por los anticuerpos antifosfolipídico de diferentes grupos de pacientes con SAF*

- Anexo 5

Velásquez M, Peláez LF, Rojas M, Narvaez-Sanchez R, Velásquez JA, Escudero C, San Martín S and Cadavid Á.P (2021) Differences in Endothelial Activation and Dysfunction Induced by Antiphospholipid Antibodies Among Groups of Patients With Thrombotic, Refractory, and Non-refractory Antiphospholipid Syndrome. Front. Physiol. 12:764702. doi: 10.3389/fphys.2021.764702.

8. DISCUSIÓN GENERAL

El principal hallazgo de este trabajo indica que los aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario inducen activación y disfunción endotelial a través de mecanismos diferentes a los inducidos por los aAFL de pacientes con otras manifestaciones clínicas de este síndrome. Lo anterior, podría definir el tipo de terapia más eficaz según la manifestación clínica de la enfermedad, especialmente en los casos refractarios. En la mayoría de reportes previos sobre el efecto deletéreo de los aAFL en el endotelio, la estratificación de las pacientes de acuerdo a las características clínicas no había sido tomada en cuenta, lo que ha dificultado entender el desarrollo de la refractariedad o mayor severidad del SAF y en consecuencia la posibilidad de proponer el uso de nuevas terapias (60). El estudio del efecto de los aAFL sobre el endotelio es clave para determinar cómo estos autoanticuerpos desencadenan la trombosis y la morbilidad gestacional. En condiciones homeostáticas el endotelio regula la respuesta inmune y los eventos trombóticos, pero en la activación y disfunción endotelial estas funciones podrían alterarse, por lo cual para un estudio más adecuado del endotelio deben implementarse diferentes metodologías que modelen estos procesos. Con el fin de proporcionar un entendimiento más completo del efecto de los aAFL sobre la activación y disfunción endotelial, en este trabajo se incluyeron diferentes modelos *in vitro*. La activación endotelial se evaluó mediante la detección de la expresión de moléculas de adhesión, unión de leucocitos al endotelio y la producción de especies reactivas del oxígeno. La disfunción endotelial se determinó por la generación de factores procoagulantes como las vesículas extracelulares y la liberación de NO, VEGF y endotelina-1.

8.1 Activación endotelial en el SAF trombótico o vascular

En ensayos preliminares evidenciamos que el suero de pacientes con SAF trombótico o vascular, incrementaba el estrés oxidativo endotelial comparado con el control de suero humano normal (80). En los ensayos posteriores se separó este grupo considerando la presencia de SAF vascular primario o SAF asociado a lupus eritematoso sistémico (LES) y se purificaron las IgG del suero de estas mismas pacientes. Esta clasificación permitió observar diferencias en los mecanismos de activación endotelial entre pacientes con SAF trombótico primario y asociado a LES. Además se encontró que, al purificar las IgG, el efecto

pro-oxidante endotelial no se observaba, lo que sugiere que en adición a los aAFL otros factores no evaluados en este estudio presentes en el suero de estas pacientes favorecen la producción de especies reactivas del oxígeno endotelial asociadas con trombosis. Otros autores han encontrado que en pacientes con trombosis se observan marcadores séricos de estrés oxidativo que pueden asociarse con factores genéticos o ambientales, incluyendo los relacionados con la dieta (81). Sin embargo, específicamente las IgG de las pacientes con SAF trombótico primario indujeron otros mecanismos asociados con activación endotelial en presencia de la β_2 GPI como la expresión de E-selectina y la producción de vesículas extracelulares Anexina V+. La expresión de la E-selectina se ha usado ampliamente como un indicador de activación endotelial ya que esta proteína participa en la unión con los leucocitos (82). Sin embargo, en nuestros resultados de adhesión de monocitos al endotelio, el efecto de estas IgG no se observó a pesar de evidenciarse el incremento en la E-selectina, lo cual podría indicar que se requieren de otras moléculas como la VCAM-1 para observar esta unión *in vitro*. En contraste, y únicamente en presencia de la β_2 GPI, estas mismas IgG incrementaron el número de vesículas extracelulares derivadas del endotelio positivas para anexina V, con o sin CD31. La actividad procoagulante de estas vesículas extracelulares derivadas de endotelio se ha establecido por la positividad para la Anexina V, la cual permite detectar las vesículas extracelulares positivas para la fosfatidilserina, un fosfolípido que contribuye a la transformación del factor tisular de su forma inactiva a su estado activo y que, como receptor del factor VIIa, inicia la cascada de la coagulación por la vía extrínseca (83). Un estudio evidenció un incremento de las vesículas extracelulares circulantes derivadas del endotelio positivas para anexina V en una muestra de 47 hombres y mujeres con SAF, de los cuales el 63% presentaba trombosis, pero no se encontró una asociación entre la presencia de esas vesículas extracelulares en los pacientes con o sin trombosis, pero no es claro si la presentación de la enfermedad primaria o asociada a LES podría afectar la ausencia de esta asociación (84). En otros reportes tampoco es claro si en los pacientes con SAF que presentaban trombosis existe un incremento en las vesículas extracelulares endoteliales, porque no se clasificaron en SAF primario y SAF asociado a LES (85-88). Por lo anterior, en nuestro estudio se consideró la presencia del LES, encontrándose este efecto únicamente para las IgG del grupo con SAF trombótico primario y dependiente de la adición de β_2 GPI al endotelio. En conclusión, la β_2 GPI estaría favoreciendo el desarrollo de trombosis en el grupo con SAF trombótico primario mediante la expresión de la E-selectina y la generación de vesículas extracelulares derivadas del endotelio cargadas con fosfatidilserina, que además amplifican el estado procoagulante.

Por otra parte, sin la adición de β_2 GPI, tanto las IgG de mujeres con SAF trombótico primario como el asociado a LES, aumentaron la producción de VEGF en células endoteliales. Se ha planteado que el incremento de VEGF en pacientes con SAF que presentan trombosis se debe a la producción de este factor por los monocitos y plaquetas como un mecanismo regulador que promueve la resolución de trombos (89). Sin embargo, cuando este VEGF es producido directamente por el endotelio podría inducir una proliferación endotelial elevada la cual ha

sido encontrada en la vasculatura renal de pacientes con SAF que desarrollan nefropatía y que también evidenciamos en nuestros resultados por los anticuerpos de pacientes con SAF trombótico (90). Esta proliferación endotelial elevada conduce a la necesidad de un trasplante renal y posterior tratamiento con sirolimus para inhibirla (90). Además, este incremento en el VEGF asociado con el desarrollo de trombosis en el SAF, también se ha relacionado con la inducción de hiperplasia de la íntima del vaso en el sitio del trombo (91). Nuestros resultados indican que los aAFL en el SAF vascular contribuyen al desarrollo de la trombosis mediante la producción del VEGF endotelial que estaría induciendo tal hiperplasia vascular.

8.2 Mecanismo de activación y disfunción endotelial en el SAF obstétrico primario refractario (RI+) y su modulación por la heparina y la hidroxiclороquina

La activación endotelial inducida por las IgG de pacientes con RI+ fue dependiente de la β_2 GPI, en contraste con la disfunción endotelial inducida por estas mismas IgG, que se observó con o sin la adición de esta glicoproteína. La activación endotelial se evidenció mediante el incremento en la expresión de E-selectina, VCAM-1 y en la adhesión de monocitos al endotelio. La β_2 GPI es el principal antígeno en el SAF y funciona como cofactor de los aAFL. Esta propiedad de cofactor se da por su capacidad para unirse con diferentes receptores como el TLR2, TLR4 y Anexina A2 que activa la vía de señalización involucrada con la expresión de moléculas de adhesión (66, 70, 71, 92). En el inicio de la inflamación, la E-selectina se requiere para la adhesión de los leucocitos al endotelio principalmente en las fases de rodamiento del leucocito mediante uniones débiles, que posteriormente son estabilizadas por VCAM-1 (93-95). La E-selectina es una glicoproteína de 115 kDa que no tiene una expresión constitutiva en la membrana celular, pero aumenta en presencia de citoquinas inflamatorias. En concordancia con nuestros resultados, otros autores han encontrado que al estimular a las HUVEC con IgG de pacientes con SAF se incrementa la expresión de E-selectina (96, 97). Los a β_2 GPI incrementan la expresión de E-selectina endotelial y esta es modulada por fluvastatina y simvastatina (98). Por su parte, la molécula de adhesión VCAM-1, es una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas que en condiciones de homeostasis vascular/endotelial se reduce, pero es rápidamente inducida por mediadores inflamatorios. VCAM-1 interactúa con el antígeno leucocitario 4 muy tardío (VLA-4) expresado en monocitos, lo cual permite las interacciones célula-célula (93, 99). Tanto en modelos murinos como en pacientes con SAF, se ha encontrado un incremento de VCAM-1 en su forma soluble, además de su inducción en el endotelio por los aAFL (96, 97, 100). En ratones BALB/c estimulados con IgG de pacientes con SAF, se demostró en células endoteliales de aorta un incremento tanto de E-selectina como de VCAM-1 que se modulaban por la adición del inhibidor del NF- κ B (101). La vía que involucra la activación de p38MAPK también se activa para inducir moléculas de adhesión por los aAFL. En ratones tratados con IgG de pacientes con SAF primario y el inhibidor de la p38MAPK, se observó una reducción de VCAM-1 en el endotelio de aorta con la adición del inhibidor (93, 96, 97, 99-102). La E-selectina y la VCAM-1 han sido

ampliamente estudiadas como un indicador de la activación endotelial en el SAF, sin embargo no se habían evaluado posibles diferencias considerando la relevancia de la presentación clínica de la enfermedad, la refractariedad de los diferentes grupos de pacientes y además la participación de la β_2 GPI. La clasificación de las pacientes de nuestro estudio y la adición de la β_2 GPI humana al endotelio, permitieron observar que este mecanismo patológico de los aAFL se presenta en el SAF primario, y que su efecto es aún mayor en pacientes refractarias con ambas manifestaciones clínicas (vascular y obstétrica), de manera dependiente a la presencia de la β_2 GPI.

Estas mismas IgG de pacientes RI+ que activaron el endotelio, indujeron disfunción endotelial evidenciada por una reducción del NO con o sin β_2 GPI. El NO inhibe la expresión de las moléculas de adhesión y la unión de leucocitos al endotelio disminuyendo la actividad del NF- κ B (49, 103). Si el NO se reduce, se genera un microambiente protrombótico y de activación endotelial que implica además una pérdida en la regulación de la reactividad plaquetaria (104). El NO se libera por la activación de la NOS o por donantes de NO. Los aAFL inhiben la activación de la eNOS. Este mecanismo de inhibición fue descrito por Sacharidou y colaboradores como dependiente de la β_2 GPI. Inicialmente, los aAFL se unen al endotelio por la β_2 GPI que se asocia con el receptor 2 de la apolipoproteína E (ApoER2); esta unión activa a la proteína fosfatasa 2-A que media la desfosforilación de la Akt y la eNOS inhibiendo su activación (61). Estos eventos conducen a la inducción de trombosis evidenciada en un modelo murino por estos mismos autores (61). En contraste, nuestros resultados indican que esta reducción de NO también se genera de manera independiente a la presencia de la β_2 GPI. Sin embargo, los mecanismos moleculares deben ser estudiados en trabajos futuros.

La reducción de NO además de asociarse con el desarrollo de trombosis, también se relaciona con la morbilidad gestacional. El NO se requiere para una formación adecuada de la red vascular placentaria y el mantenimiento de su tono vascular (105). Bajos niveles de NO incrementan la vasoconstricción y la hipertensión que alteran la formación placentaria (106). En un modelo de hipertensión en ratas, generado mediante la inhibición del NO, se encontró una alteración en la remodelación de las arterias espirales uterinas (107).

Los hallazgos de nuestro trabajo indican que la activación y disfunción endotelial son mecanismos asociados que pueden potenciarse mutuamente y conducir al desarrollo de las manifestaciones clínicas del SAF. Esto representa un avance en el estudio de las pacientes con SAF obstétrico refractario, las cuales requieren un esquema de tratamiento diferente a los demás grupos de mujeres con SAF obstétrico. En la mayoría de los ensayos clínicos de pacientes con SAF obstétrico, se obtiene el éxito gestacional en un 75%-80% de los casos entre los cuales por lo general se encuentran pacientes positivas para uno solo de los aAFL y morbilidad gestacional únicamente (78, 108, 109). En pacientes refractarias al tratamiento con aspirina a bajas dosis y heparina de bajo peso molecular se planteó desde 1985 el uso de otras estrategias como la administración de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) que disminuye la actividad del anticoagulante lúpico (110-112). Sin embargo, la implementación de IVIG en el SAF obstétrico refractario es controversial, ya que en algunos casos disminuyó

el éxito gestacional; esto llevó a proponer el uso de prednisolona e hidroxiclороquina en adición al tratamiento convencional, además de las terapias biológicas con anticuerpos monoclonales que son de alto costo (78). Aunque los tratamientos propuestos para las pacientes con SAF obstétrico refractario han sido favorables en algunos casos, su uso aún es empírico y los mecanismos patológicos de los aAFL que llevan a esta severidad no son claros. El estudio de los efectos de estos autoanticuerpos para evaluar nuevas terapias que puedan ser más eficaces continúa siendo un objetivo de interés actual (78). En concordancia con los resultados de las pacientes incluidas en nuestro estudio, se ha reportado que las mujeres con SAF obstétrico refractario presentan con mayor frecuencia triple positividad de los aAFL, trombosis y otras enfermedades autoinmunes como el LES, pero también pueden tener SAF primario como nuestro grupo de RI+ (78). Nuestro estudio aporta al esclarecimiento de uno de los mecanismos patológicos de los aAFL en el SAF obstétrico primario refractario (RI+) en la inducción de disfunción endotelial. Esta disfunción fue modulada por la enoxaparina o heparina de bajo peso molecular (ENX) y la HCQ. La ENX restauró la liberación de NO con la adición o no de la β_2 GPI y la HCQ únicamente moduló la producción de NO reducida en presencia de la β_2 GPI. El mecanismo modulador de la HCQ se podría explicar mediante la desintegración de complejos moleculares de β_2 GPI/ $\alpha\beta_2$ GPI que ejerce este fármaco (113). Más recientemente, Miranda y colaboradores evidenciaron que la HCQ restaura la fosforilación de la eNOS reducida por los aAFL y modula el estado procoagulante generado en el SAF (100). Por su parte la ENX también incrementa la fosforilación de la eNOS lo que podría estar explicando lo observado en nuestro estudio (114). Lo anteriormente descrito sugiere que para este tipo de pacientes con refractariedad, la ENX y la HCQ juntas podrían ser una alternativa eficaz y se debería considerar además la adición de estatinas que en otros estudios han mostrado un efecto modulador sobre la activación endotelial inducida por los aAFL (98).

8.3 Producción de vesículas extracelulares derivadas del endotelio y desbalance entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, asociados con disfunción endotelial en el SAF obstétrico no refractario (NR+)

Las IgG de mujeres con NR+ con la adición de la β_2 GP, disminuyeron la biodisponibilidad de NO y aumentaron las vesículas extracelulares procoagulantes. Sin la adición de la β_2 GP, estas mismas IgG indujeron la producción de endotelina-1 y redujeron la producción de VEGF. Previamente se había evidenciado que las IgG de pacientes con SAF que presentaban trombosis, con o sin morbilidad gestacional, incrementaban la generación de vesículas extracelulares endoteliales *in vitro* (68). En otro reporte se encontró que las vesículas extracelulares endoteliales aumentaban únicamente en el plasma de pacientes con SAF trombótico en contraste con las mujeres con SAF obstétrico, en las cuales no se encontró una cantidad significativa (115). Aunque en las pacientes con SAF obstétrico las vesículas extracelulares endoteliales no se han asociado con el desarrollo de la morbilidad gestacional, se sabe que son las vesículas extracelulares de origen plaquetario las que pueden generar

daño placentario y contribuir a la activación endotelial (116). El incremento de vesículas extracelulares derivadas del endotelio en pacientes con SAF se ha correlacionado positivamente con la presencia de $\alpha\beta_2$ GPI de los isotipos IgG e IgM (84). Se ha planteado que los $\alpha\beta_2$ GPI activan el endotelio el cual desencadena el desarrollo de la trombosis por un aumento en la liberación de vesículas extracelulares endoteliales procoagulantes, mediante la fosforilación de la cadena reguladora de la miosina no muscular de clase II (RLC), que regula el ensamblaje del citoesqueleto (117). La producción de estas vesículas extracelulares endoteliales procoagulantes se bloqueó con la inhibición de la fosforilación del RLC en HUVEC preincubadas con β_2 GPI y posterior estímulo con $\alpha\beta_2$ GPI de ratón y de pacientes con SAF (117). Uno de los principales marcadores para detectar vesículas extracelulares endoteliales es el CD31, una molécula de adhesión intercelular endotelial que se conserva en el 99% de las HUVEC de diferentes clonas (80). En el presente trabajo, los $\alpha\beta_2$ GPI presentes en las IgG de mujeres con SAF primario sin refractariedad (NR+), con morbilidad gestacional y trombosis, indujeron un incremento en el número de eventos de vesículas extracelulares procoagulantes (CD31+/Anexina V+) de 0.5 μ m con respecto a los demás grupos de estudio y a las mismas IgG sin la β_2 GPI, lo que podría estar explicando uno de los mecanismos desencadenantes de la trombosis. Estas IgG de pacientes con NR+ también incrementaron las vesículas extracelulares positivas para CD31+ de 1 μ m en comparación con el control de IgG-SHN y las IgG de este mismo grupo en ausencia de la β_2 GPI. Las vesículas extracelulares CD31+/Anexina V+ además de ser procoagulantes, pueden reducir los niveles de células endoteliales progenitoras las cuales son requeridas en la reparación vascular y se han observado disminuidas en pacientes con SAF primario, contribuyendo al daño vascular (118, 119). Las vesículas extracelulares positivas para CD31 se han reportado elevadas hasta 2.85 veces más en pacientes con otras enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple en comparación con individuos sanos; sin embargo, no es muy claro que proteínas cargo se estarían transportando (120). Las vesículas extracelulares pueden generarse desde la membrana plasmática y ser positivas en su superficie para múltiples componentes celulares como integrinas, balsas lipídicas, factor tisular, moléculas de adhesión, fosfolípidos, antígenos propios y otros receptores, pero en el interior pueden tener proteínas como citoquinas y diferentes tipos de ARN como son los microRNA, mensajero e interferente (121).

La reducción de NO, VEGF y el aumento en la producción del vasoconstrictor endotelina-1, inducido por estas IgG de NR+ con la adición de la β_2 GPI se ha asociado con el desarrollo de la morbilidad gestacional como lo indican Saleh y colaboradores (122). A diferencia del SAF trombotico en el cual observamos un incremento en el VEGF asociado con el desarrollo de trombosis, en pacientes que también presentan morbilidad gestacional, el VEGF disminuye e incrementa la endotelina-1 conduciendo a malformación placentaria (123). En pacientes con NR+ el desarrollo de la trombosis y la morbilidad gestacional se asocian con la disfunción endotelial que puede ser inducida por α AFL dependientes e independientes de la β_2 GPI.

8.4 Estrés oxidativo, producción de vesículas extracelulares y desbalance entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores como indicadores de activación y disfunción endotelial en el SAF obstétrico refractario (RII+) asociado a LES

Las IgG de pacientes con RII+ disminuyeron la biodisponibilidad de NO, generaron vesículas extracelulares derivadas de endotelio, endotelina-1 y estrés oxidativo (producción de O_2^- mitocondrial). En el presente trabajo además de tener en cuenta las manifestaciones clínicas de trombosis y morbilidad gestacional de las pacientes, consideramos la refractariedad y el SAF asociado a LES. Esta clasificación nos permitió encontrar diferencias en los mecanismos patológicos de los aAFL sobre los eventos de activación endotelial incluso entre las pacientes con las mismas manifestaciones clínicas. Este es el caso de las IgG de las mujeres con LES refractarias para el SAF obstétrico (RII+), que indujeron estrés oxidativo endotelial evidenciado por la producción de O_2^- mitocondrial comparado con el grupo de SAF primario no refractario (NR+) y el control de SHN. Este resultado fue independiente de la β 2GPI, lo que sugiere que este efecto se podría estar generando por anticuerpos anticardiolipina (aCL) que no requieren a este cofactor, y por otros autoanticuerpos diferentes a los aAFL. Se ha reportado que aCL monoclonales de humano inyectados en ratones BALB/c, inducen la producción de O_2^- ; sin embargo, estos anticuerpos también presentaban reactividad a la β 2GPI por lo que no era clara su participación en este evento (124). Simoncini y colaboradores evidenciaron que después de eliminar a los β 2GPI, los aAFL de pacientes con SAF inducían la producción de especies reactivas del oxígeno en células endoteliales, en contraste con el control de suero humano normal indicando la relevancia de los aCL independientes de β 2GPI (69, 124). Otros autores han reportado que el suero de pacientes con LES positivas para anticuerpos anti-ADN de doble cadena, inducen la producción de especies reactivas del oxígeno intracelulares y la actividad de la oxidasa nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, considerada la principal catalizadora de la producción de O_2^- (125, 126). Aunque en los reportes mencionados no se clasificaron los pacientes por las manifestaciones clínicas, en nuestro trabajo se pudo evidenciar que los autoanticuerpos independientes de β 2GPI de mujeres con (RII+) podrían desencadenar la trombosis y la morbilidad gestacional mediante el estrés oxidativo endotelial, lo cual sugiere el potencial uso de antioxidantes en este tipo de pacientes refractarias al tratamiento convencional lo cual ya ha sido propuesto por otros autores para el tratamiento del SAF en general (69, 127). El estrés oxidativo generado por estos anticuerpos también se asocia con la reducción del NO, que es consumido por las especies reactivas del oxígeno, que en adición al incremento de la endotelina-1 favorecen la vasoconstricción, y a que las vesículas extracelulares derivadas de endotelio también favorecen la disfunción endotelial mediante una mayor reducción del NO (72, 128, 129).

En el presente estudio, la clasificación de los pacientes por manifestaciones clínicas y la adición de β 2GPI a las HUVEC permitió comprender algunas de las diferencias que

presentan los aAFL en la inducción de activación y disfunción endotelial representando una metodología adecuada en el estudio del SAF en trabajos futuros (Figura 3) (**modelo de activación y disfunción endotelial en el SAF, anexo 5**). Sin embargo, el número de individuos fue limitado, considerando la dificultad de reclutar pacientes con autoinmunidad bien caracterizadas, debido a la baja prevalencia de este tipo de enfermedades, más aún con refractariedad. Según nuestros resultados la ENX y la HCQ solo modulan la disfunción generada en el SAF obstétrico refractario primario (RI+) lo cual podría ser implementado en el tratamiento de este tipo de pacientes, pero indica que en las mujeres con RII+ se deben probar otras estrategias terapéuticas posiblemente asociadas con antioxidantes y moduladores del NO.

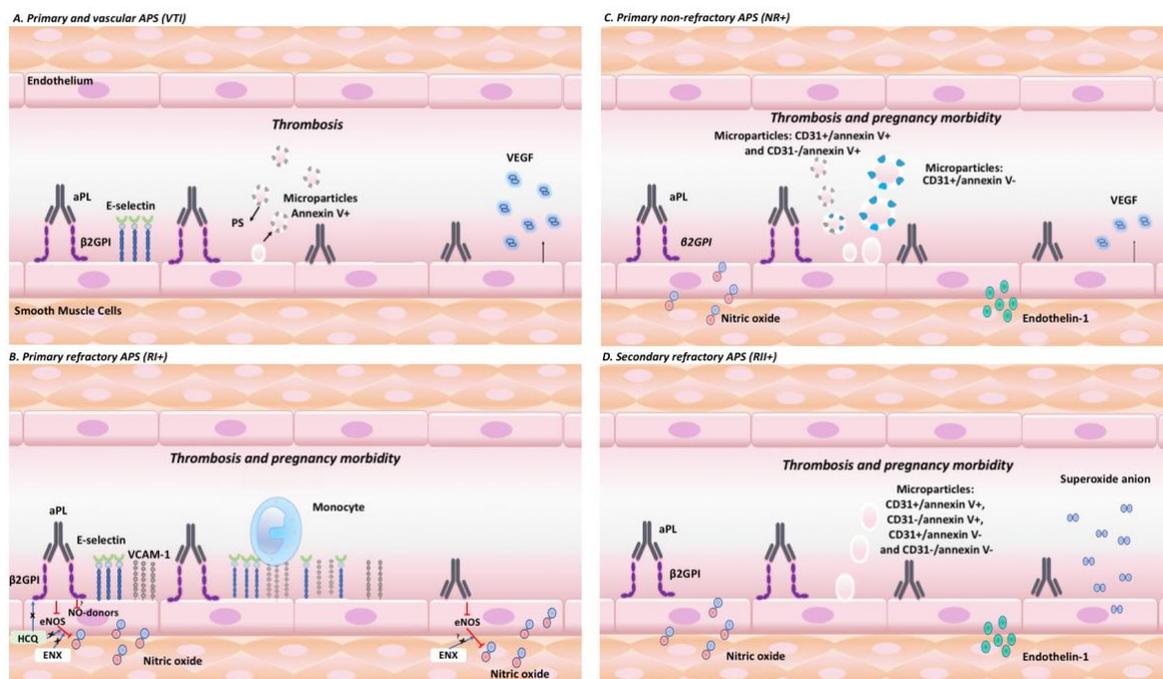


Figura 3. Modelo de activación y disfunción endotelial en los diferentes grupos de pacientes con SAF. Los aAFL (*aPL en inglés*) de los diferentes grupos de pacientes inducen activación y disfunción endotelial por distintos mecanismos. (A) En el SAF trombótico o vascular primario (VTI) los aAFL inducen incremento de E-selectina, generación de vesículas extracelulares (micropartículas) procoagulantes (Anexina V+) y producción de VEGF. (B) En el SAF obstétrico primario refractario (RI+) los aAFL inducen la expresión de E-selectina y VCAM-1 que favorecen la adhesión de monocitos. Estos mismos aAFL disminuyen la biodisponibilidad del NO y este efecto patológico fue modulado por la heparina y la hidroxicloroquina. (C) En el SAF obstétrico no refractario (NR+) los aAFL disminuyen la biodisponibilidad de NO, incrementan la generación de vesículas extracelulares procoagulantes, aumentan la producción de endotelina-1 y reducen la producción de VEGF. (D) En el SAF obstétrico refractario asociado a LES los aAFL

disminuyen la liberación de NO, incrementan la generación de vesículas extracelulares, endotelina-1 e inducen estrés oxidativo (Velásquez M et al. *Front. Physiol.*2021). En el panel A la sigla PS en inglés (*phosphatidylserine*) indica fosfatidilserina. Los aAFL que no se encuentran unidos a la β 2GPI indican los mecanismos patológicos para los cuales la adición de este cofactor no fue requerido.

9. CONCLUSIONES

- La activación y disfunción endotelial en el SAF se observaron en diferentes contextos, y el mecanismo de inducción varió según las características clínicas de las pacientes y la presencia de cofactores para los aAFL, como la β 2GPI.
- La disfunción endotelial fue inducida por las IgG de los tres grupos de mujeres con trombosis y morbilidad gestacional, lo que sugiere una asociación con el desarrollo de estas manifestaciones clínicas.
- La aspirina, como se utilizó en nuestro modelo, no modula la disfunción endotelial inducida por las IgG de los tres grupos de mujeres con trombosis y morbilidad gestacional.
- La ENX modula la disfunción endotelial generada por IgG de RI+ con o sin β 2GPI.
- La HCQ no moduló la disfunción endotelial inducida por las IgG de RI+ en ausencia de β 2GPI lo que indica que este fármaco únicamente revierte el efecto de los aAFL $\alpha\beta$ 2GPI presentes.

10. PERSPECTIVAS

- El efecto de los medicamentos usados sobre el modelo de disfunción endotelial *in vitro* podría considerarse al implementar la aspirina, la ENX y la HCQ en el tratamiento de pacientes con SAF refractario, específicamente con SAF primario refractario (RI+) para los cuales únicamente la ENX y la HCQ fueron moduladoras. Considerando lo anterior, se propone plantear un estudio clínico con estos medicamentos, pacientes con SAF refractario y la evaluación de la disfunción endotelial por métodos no invasivos.

- En trabajos futuros con aAFL de pacientes con SAF obstétrico refractario primario se propone adicionar además de la ENX y la HCQ que revierten la disfunción endotelial, estatinas para disminuir la activación de estas mismas células evidenciada por el aumento en la expresión de moléculas de adhesión. Estas moléculas de adhesión incrementadas por los aAFL han mostrado ser moduladas por las estatinas según otros autores, de esta manera se estaría tratando la activación y la disfunción endotelial.
- En pacientes con SAF refractario asociado a LES podría proponerse el estudio de antioxidantes para modular la activación y disfunción endotelial considerando que según nuestros resultados se genera estrés oxidativo y disminución de NO. Esta disminución de NO como se mencionó previamente podría estarse generando por las especies reactivas del oxígeno que lo consumen.
- En estudios futuros de pacientes con SAF debe considerarse la clasificación en diferentes grupos según la manifestación clínica de este síndrome y la inclusión de un mayor tamaño muestral.

11. REFERENCIAS

1. Creager M, Loscalzo J, Beckman JA. Vascular medicine E-book: A companion to Braunwald's heart disease: Elsevier Health Sciences; 2012.
2. Schwann T. Microscopical Researches into the Accordance in the Structure and Growth of Animals and Plants: Рипол Классик; 1847.
3. His W, Häute D, des Körpers H. Akademisches Programm. Basel; 1865.
4. **Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR.** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 1973;52:2745-56.<https://doi.org/10.1172/JCI107470>.
5. **Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Folkman J.** Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. J Cell Biol. 1974;60:673-84.<https://doi.org/10.1083/jcb.60.3.673>.
6. **Killackey JJ, Johnston MG, Movat HZ.** Increased permeability of microcarrier-cultured endothelial monolayers in response to histamine and thrombin. A model for the in vitro study of increased vasopermeability. Am J Pathol. 1986;122:50-61
7. **Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L.** Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review. Applied Sciences. 2020;10:938
8. **Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 1988;333:664-6.<https://doi.org/10.1038/333664a0>.

9. **Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al.** Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991;42:1849-57. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90581-o](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90581-o).
10. **Schulz R, Nava E, Moncada S.** Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol.* 1992;105:575-80. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb09021.x>.
11. **Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>.
12. **Carvajal Carvajal C.** El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica.* 2017;34:90-100
13. **Bosseboeuf E, Raimondi C.** Signalling, metabolic pathways and iron homeostasis in endothelial cells in health, atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Cells.* 2020;9:2055
14. **Zakkar M, Angelini GD, Emanuelli C.** Regulation of Vascular Endothelium Inflammatory Signalling by Shear Stress. *Curr Vasc Pharmacol.* 2016;14:181-6. <https://doi.org/10.2174/1570161114666151202205139>.
15. **Urschel K, Cicha I.** TNF- α in the cardiovascular system: from physiology to therapy. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research.* 2015;7:9-25
16. **Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH.** New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews.* 2013;93:327-58
17. **Yau JW, Teoh H, Verma S.** Endothelial cell control of thrombosis. *BMC cardiovascular disorders.* 2015;15:1-11
18. **Shimada K, Kobayashi M, Kimura S, Nishinaga M, Takeuchi K, Ozawa T.** Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn Circ J.* 1991;55:1016-21. <https://doi.org/10.1253/jcj.55.1016>.
19. **Lupu C, Goodwin CA, Westmuckett AD, Emeis JJ, Scully MF, Kakkar VV, et al.** Tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae. Regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2964-74. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.11.2964>.
20. **Rezaie AR.** Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr Med Chem.* 2010;17:2059-69. <https://doi.org/10.2174/092986710791233706>.
21. **Gkaliagkousi E, Ferro A.** Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:1873-97. <https://doi.org/10.2741/3828>.
22. **Neubauer K, Zieger B.** Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>.
23. **Ren D, Giri H, Li J, Rezaie AR.** The Cardioprotective Signaling Activity of Activated Protein C in Heart Failure and Ischemic Heart Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20071762>.
24. **Hohmann JD, Wang X, Krajewski S, Selan C, Haller CA, Straub A, et al.** Delayed targeting of CD39 to activated platelet GPIIb/IIIa via a single-chain antibody: breaking the

- link between antithrombotic potency and bleeding? *Blood*. 2013;121:3067-75.<https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449694>.
25. **Li Z, Ajdic J, Eigenthaler M, Du X.** A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood*. 2003;101:4423-9.<https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3210>.
 26. **Du X.** A new mechanism for nitric oxide–and cGMP-mediated platelet inhibition. *Blood*. 2007;109:392-3
 27. **Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, et al.** The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J*. 1999;18:37-48.<https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.37>.
 28. **Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C.** The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10:4-18.<https://doi.org/10.2174/157016112798829760>.
 29. **Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS.** Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36:307-21.<https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>.
 30. **Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM.** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399:601-5.<https://doi.org/10.1038/21224>.
 31. **Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW.** Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*. 2015;129:83-94.<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.
 32. **Op den Buijs J, Musters M, Verrips T, Post JA, Braam B, van Riel N.** Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing, and telomere shortening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2651-8.<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00332.2004>.
 33. **Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL.** Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107:1164-9.<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000058702.69484.a0>.
 34. **Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS.** Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*. 2002;7:40-53
 35. **Kaur R, Kaur M, Singh J.** Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17:121.<https://doi.org/10.1186/s12933-018-0763-3>.
 36. **Page AV, Liles WC.** Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence*. 2013;4:507-16.<https://doi.org/10.4161/viru.24530>.
 37. **Konukoglu D, Uzun H.** Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2017;956:511-40.https://doi.org/10.1007/5584_2016_90.
 38. **Wienke J, Mertens JS, Garcia S, Lim J, Wijngaarde CA, Yeo JG, et al.** Biomarker profiles of endothelial activation and dysfunction in rare systemic autoimmune diseases: implications for cardiovascular risk. *Rheumatology (Oxford)*. 2021;60:785-801.<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa270>.

39. **Baeriswyl DC, Prionisti I, Peach T, Tsolkas G, Chooi KY, Vardakis J, et al.** Disturbed flow induces a sustained, stochastic NF- κ B activation which may support intracranial aneurysm growth in vivo. *Scientific reports*. 2019;9:1-14
40. **Sen CK, Roy S, Packer L.** Involvement of intracellular Ca²⁺ in oxidant-induced NF- κ B activation. *FEBS letters*. 1996;385:58-62
41. **Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T.** Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995;9:899-909
42. **Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr.** Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest*. 1985;76:2003-11. <https://doi.org/10.1172/JCI112200>.
43. **Rutledge NS, Muller WA.** Understanding molecules that mediate leukocyte extravasation. *Current Pathobiology Reports*. 2020;8:25-35
44. **Muller WA.** Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*. 2013;50:7-22. <https://doi.org/10.1177/0300985812469883>.
45. **F  l  t  u M, Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture). *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;291:H985-H1002
46. **Wang C, Luo Z, Carter G, Wellstein A, Jose PA, Tomlinson J, et al.** NRF2 prevents hypertension, increased ADMA, microvascular oxidative stress, and dysfunction in mice with two weeks of ANG II infusion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2018;314:R399-R406
47. **Sciacqua A, Grillo N, Quero M, Sesti G, Perticone F.** Asymmetric dimethylarginine plasma levels and endothelial function in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *International journal of molecular sciences*. 2012;13:13804-15
48. **Kubes P, Suzuki M, Granger D.** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88:4651-5
49. **Liao JK.** Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest*. 2013;123:540-1. <https://doi.org/10.1172/JCI66843>.
50. **Dignat-George F, Boulanger CM.** The many faces of endothelial microparticles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31:27-33
51. **Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al.** Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>.
52. **Bazzan E, Tine M, Casara A, Biondini D, Semenzato U, Cocconcelli E, et al.** Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. *Int J Mol Sci*. 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22126417>.
53. **Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, Campello E, Radu CM, Saggiorato G, et al.** Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role. *Thromb Haemost*. 2013;110:378-85. <https://doi.org/10.1160/TH12-12-0957>.

54. **Leite AR, Borges-Canha M, Cardoso R, Neves JS, Castro-Ferreira R, Leite-Moreira A.** Novel Biomarkers for Evaluation of Endothelial Dysfunction. *Angiology*. 2020;3319720903586. <https://doi.org/10.1177/0003319720903586>.
55. **Deng F, Wang S, Zhang L.** Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review. *J Cell Mol Med*. 2017;21:1698-710. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13125>.
56. **Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddart J, et al.** Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3381-8. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005050535>.
57. **Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al.** International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4:295-306. <https://doi.org/JTH1753> [pii] 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x.
58. **Duarte-Garcia A, Pham MM, Crowson CS, Amin S, Moder KG, Pruthi RK, et al.** The Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population-Based Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71:1545-52. <https://doi.org/10.1002/art.40901>.
59. **Hellmark T, Segelmark M.** Diagnosis and classification of Goodpasture's disease (anti-GBM). *Journal of autoimmunity*. 2014;48:108-12
60. **Velásquez M, Rojas M, Abrahams VM, Escudero C, Cadavid ÁP.** Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association with Clinical Manifestations. *Front Physiol*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01840>.
61. **Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, Salmon JE, Shen YM, Herz J, et al.** Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood*. 2018;131:2097-110. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-814681>.
62. **Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al.** Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:120-31
63. **Cho C-S, Cho M-L, Chen PP, Min S-Y, Hwang S-Y, Park K-S, et al.** Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *The Journal of Immunology*. 2002;168:4209-15
64. **Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS.** Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52:1545-54
65. **Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J.** Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52:2120-4
66. **Zhang J, McCrae KR.** Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Blood*. 2005;105:1964-9

67. **Wojta J, Kaun C, Zorn G, Ghannadan M, Hauswirth AW, Sperr WR, et al.** C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood*. 2002;100:517-23. <https://doi.org/10.1182/blood.v100.2.517>.
68. **Pericleous C, Clarke LA, Brogan PA, Latchman DS, Isenberg DA, Ioannou Y, et al.** Endothelial microparticle release is stimulated in vitro by purified IgG from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2013;109:72-8. <https://doi.org/10.1160/TH12-05-0346>.
69. **Simoncini S, Sapet C, Camoin-Jau L, Bardin N, Harle JR, Sampol J, et al.** Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome. *Int Immunol*. 2005;17:489-500. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh229>.
70. **Alard J-E, Gaillard F, Daridon C, Shoenfeld Y, Jamin C, Youinou P.** TLR2 is one of the endothelial receptors for β 2-glycoprotein I. *The Journal of Immunology*. 2010;185:1550-7
71. **Raschi E, Chighizola CB, Grossi C, Ronda N, Gatti R, Meroni PL, et al.** β 2-glycoprotein I, lipopolysaccharide and endothelial TLR4: three players in the two hit theory for anti-phospholipid-mediated thrombosis. *Journal of autoimmunity*. 2014;55:42-50
72. **Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM.** Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front Physiol*. 2012;3:441. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00441>.
73. **Canaud G, Bienaimé F, Tabarin F, Bataillon G, Seilhean D, Noël L-H, et al.** Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2014;371:303-12
74. **Di Simone N, Di Nicuolo F, D'Ippolito S, Castellani R, Tersigni C, Caruso A, et al.** Antiphospholipid antibodies affect human endometrial angiogenesis. *Biology of reproduction*. 2010;83:212-9
75. **Girardi G, Redecha P, Salmon J.** A potential mechanism for therapeutics efficacy of heparin in antiphospholipid antibodies-induced pregnancy loss—inhibition of complement. *Nat Med*. 2004;10:1222-6
76. **Jain P, Dhodapkar SB, Daniel M.** Combination of aspirin and heparin in unexplained recurrent miscarriages - "Empirical or evidence based". *J Hum Reprod Sci*. 2011;4:155-6. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.92293>.
77. **Mekinian A, Lazzaroni MG, Kuzenko A, Alijotas-Reig J, Ruffatti A, Levy P, et al.** The efficacy of hydroxychloroquine for obstetrical outcome in anti-phospholipid syndrome: Data from a European multicenter retrospective study. *Autoimmun Rev*. 2015;14:498-502. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.012>.
78. **Ruffatti A, Hoxha A, Favaro M, Tonello M, Colpo A, Cucchini U, et al.** Additional Treatments for High-Risk Obstetric Antiphospholipid Syndrome: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53:28-39. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8571-6>.
79. **Meroni PL, Borghi MO, Grossi C, Chighizola CB, Durigutto P, Tedesco F.** Obstetric and vascular antiphospholipid syndrome: same antibodies but different diseases? *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14:433-40. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0032-6>.
80. **Velasquez M, Granada MA, Galvis JC, Alvarez AM, Cadavid A.** Oxidative stress in endothelial cells induced by the serum of women with different clinical manifestations of

- the antiphospholipid syndrome. *Biomedica*. 2019;39:673-88.<https://doi.org/10.7705/biomedica.4701>.
81. **Ekim M, Sekeroglu MR, Balahoroglu R, Ozkol H, Ekim H.** Roles of the Oxidative Stress and ADMA in the Development of Deep Venous Thrombosis. *Biochem Res Int*. 2014;2014:703128.<https://doi.org/10.1155/2014/703128>.
82. **Melrose J, Tsurushita N, Liu G, Berg EL.** IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J Immunol*. 1998;161:2457-64
83. **Owens AP, 3rd, Mackman N.** Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011;108:1284-97.<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233056>.
84. **Chaturvedi S, Cockrell E, Espinola R, Hsi L, Fulton S, Khan M, et al.** Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: characterization and associations. *Thromb Res*. 2015;135:102-8.<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.11.011>.
85. **Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al.** In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999;104:93-102.<https://doi.org/10.1172/JCI4985>.
86. **Vikerfors A, Mobarrez F, Bremme K, Holmstrom M, Agren A, Eelde A, et al.** Studies of microparticles in patients with the antiphospholipid syndrome (APS). *Lupus*. 2012;21:802-5.<https://doi.org/10.1177/0961203312437809>.
87. **Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al.** Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2004;91:667-73.<https://doi.org/10.1160/TH03-07-0487>.
88. **Jy W, Tiede M, Bidot CJ, Horstman LL, Jimenez JJ, Chirinos J, et al.** Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res*. 2007;121:319-25.<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.04.014>.
89. **Smadja D, Gaussem P, Roncal C, Fischer AM, Emmerich J, Darnige L.** Arterial and venous thrombosis is associated with different angiogenic cytokine patterns in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010;19:837-43.<https://doi.org/10.1177/0961203309360985>.
90. **Canaud G, Bienaime F, Tabarin F, Bataillon G, Seilhean D, Noel LH, et al.** Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2014;371:303-12.<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312890>.
91. **Williams FM, Parmar K, Hughes GR, Hunt BJ.** Systemic endothelial cell markers in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2000;84:742-6
92. **Borghi MO, Raschi E, Grossi C, Chighizola CB, Meroni PL.** Toll-like receptor 4 and beta2 glycoprotein I interaction on endothelial cells. *Lupus*. 2014;23:1302-4.<https://doi.org/10.1177/0961203314536479>.
93. **Feletou M.** The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*. San Rafael (CA)2011.

94. **Noble KE, Panayiotidis P, Collins PW, Hoffbrand AV, Yong KL.** Monocytes induce E-selectin gene expression in endothelial cells: role of CD11/CD18 and extracellular matrix proteins. *Eur J Immunol.* 1996;26:2944-51. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261221>.
95. **Hauselmann I, Roblek M, Protsyuk D, Huck V, Knopfova L, Grassle S, et al.** Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade. *Cancer Res.* 2016;76:5302-12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0784>.
96. **Engel B, Muller G, Roch B, Schroder HE, Aringer M, Bornstein SR, et al.** Serum of patients with antiphospholipid syndrome induces adhesion molecules in endothelial cells. *Atheroscler Suppl.* 2017;30:141-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2017.05.039>.
97. **Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN.** Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation.* 1999;99:1997-2002
98. **Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani A, Balestrieri G, Molteni R, et al.** Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2870-8. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200112\)44:12<2870::aid-art475>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200112)44:12<2870::aid-art475>3.0.co;2-y).
99. **Kalogeris TJ, Kevil CG, Laroux FS, Coe LL, Phifer TJ, Alexander JS.** Differential monocyte adhesion and adhesion molecule expression in venous and arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1999;276:L9-L19
100. **Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al.** Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One.* 2019;14:e0212614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212614>.
101. **Xia L, Xie H, Yu Y, Zhou H, Wang T, Yan J.** The Effects of NF-kappaB and c-Jun/AP-1 on the Expression of Prothrombotic and Proinflammatory Molecules Induced by Anti-beta2GPI in Mouse. *PLoS One.* 2016;11:e0147958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147958>.
102. **Vega-Ostertag ME, Ferrara DE, Romay-Penabad Z, Liu X, Taylor WR, Colden-Stanfield M, et al.** Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1828-34. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02680.x>.
103. **De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., et al.** Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995;96:60-8. <https://doi.org/10.1172/JCI118074>.
104. **Costa D, Benincasa G, Lucchese R, Infante T, Nicoletti GF, Napoli C.** Effect of nitric oxide reduction on arterial thrombosis. *Scand Cardiovasc J.* 2019;53:1-8. <https://doi.org/10.1080/14017431.2019.1581943>.

105. **Vatish M, Randeve HS, Grammatopoulos DK.** Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia. *Trends Mol Med.* 2006;12:223-33.<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.03.003>.
106. **Possomato-Vieira JS, Khalil RA.** Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv Pharmacol.* 2016;77:361-431.<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.008>.
107. **Osol G, Barron C, Gokina N, Mandala M.** Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy-induced uterine vascular expansive remodeling. *J Vasc Res.* 2009;46:478-86.<https://doi.org/10.1159/000200963>.
108. **Branch DW, Silver RM, Blackwell JL, Reading JC, Scott JR.** Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstet Gynecol.* 1992;80:614-20
109. **Petri M, Qazi U.** Management of antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am.* 2006;32:591-607.<https://doi.org/10.1016/j.rdc.2006.05.007>.
110. **McVerry BA, Spearing R, Smith A.** SLE anticoagulant: transient inhibition by high dose immunoglobulin infusions. *Br J Haematol.* 1985;61:579-80.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1985.tb02863.x>.
111. **Carreras LD, Perez GN, Vega HR, Casavilla F.** Lupus anticoagulant and recurrent fetal loss: successful treatment with gammaglobulin. *Lancet.* 1988;2:393-4.[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)92859-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)92859-0).
112. **Wapner RJ, Cowchock FS, Shapiro SS.** Successful treatment in two women with antiphospholipid antibodies and refractory pregnancy losses with intravenous immunoglobulin infusions. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161:1271-2.[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90681-9](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90681-9).
113. **Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Chen PP, Hathcock JJ, Taatjes DJ.** Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody-beta2-glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood.* 2008;112:1687-95.<https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144204>.
114. **Li Y, Talotta-Altenburg LM, Silimperi KA, Ciabattini GO, Lowe-Krentz LJ.** Endothelial nitric oxide synthase activation is required for heparin receptor effects on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;318:C463-C75.<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00284.2018>.
115. **Breen KA, Sanchez K, Kirkman N, Seed PT, Parmar K, Moore GW, et al.** Endothelial and platelet microparticles in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2015;135:368-74.<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.11.027>.
116. **Zhou Q, Lian Y, Zhang Y, Li L, Li H, Shen D, et al.** Platelet-derived microparticles from recurrent miscarriage associated with antiphospholipid antibody syndrome influence behaviours of trophoblast and endothelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2019;25:483-94.<https://doi.org/10.1093/molehr/gaz019>.
117. **Betapudi V, Lominadze G, Hsi L, Willard B, Wu M, McCrae KR.** Anti-beta2GPI antibodies stimulate endothelial cell microparticle release via a nonmuscle myosin II motor protein-dependent pathway. *Blood.* 2013;122:3808-17.<https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-490318>.

118. **Grenn RC, Yalavarthi S, Gandhi AA, Kazzaz NM, Nunez-Alvarez C, Hernandez-Ramirez D, et al.** Endothelial progenitor dysfunction associates with a type I interferon signature in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:450-7.<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209442>.
119. **Huang PH, Huang SS, Chen YH, Lin CP, Chiang KH, Chen JS, et al.** Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J Hypertens*. 2010;28:1655-65.<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833a4d0a>.
120. **Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Mao WW, et al.** Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology*. 2001;56:1319-24.<https://doi.org/10.1212/wnl.56.10.1319>.
121. **Chaturvedi S, Alluri R, McCrae KR.** Extracellular Vesicles in the Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2018;44:493-504.<https://doi.org/10.1055/s-0037-1599081>.
122. **Saleh L, Verdonk K, Visser W, van den Meiracker AH, Danser AH.** The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2016;10:282-93.<https://doi.org/10.1177/1753944715624853>.
123. **Lankhorst S, Danser AH, van den Meiracker AH.** Endothelin-1 and antiangiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310:R230-4.<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00373.2015>.
124. **Delgado Alves J, Mason LJ, Ames PR, Chen PP, Rauch J, Levine JS, et al.** Antiphospholipid antibodies are associated with enhanced oxidative stress, decreased plasma nitric oxide and paraoxonase activity in an experimental mouse model. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:1238-44.<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh722>.
125. **Toral M, Jimenez R, Romero M, Robles-Vera I, Sanchez M, Salices M, et al.** Role of endoplasmic reticulum stress in the protective effects of PPARbeta/delta activation on endothelial dysfunction induced by plasma from patients with lupus. *Arthritis Res Ther*. 2017;19:268.<https://doi.org/10.1186/s13075-017-1478-7>.
126. **Didion SP, Faraci FM.** Effects of NADH and NADPH on superoxide levels and cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H688-95.<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00576.2001>.
127. **Andreoli L, Piantoni S, Dall'Ara F, Allegri F, Meroni PL, Tincani A.** Vitamin D and antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012;21:736-40.<https://doi.org/10.1177/0961203312446386>.
128. **Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, et al.** Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock*. 2006;26:464-71.<https://doi.org/10.1097/01.shk.0000228791.10550.36>.
129. **Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS.** Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1910-5.<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01172.2003>.

Resúmenes publicados y presentaciones orales (Anexo 6)
Apropiación social del conocimiento (Anexo 7)

CAPÍTULO IV. Otros mecanismos patológicos de los anticuerpos antifosfolipídico que inducen alteración endotelial

- Anexo 8

Rodríguez CM, Velásquez M, Rúa C, Viana M, Abrahams VM, Cadavid Á.P and Alvarez AM (2021) Antiphospholipid Antibodies From Women With Pregnancy Morbidity and Vascular Thrombosis Induce Endothelial Mitochondrial Dysfunction, mTOR Activation, and Autophagy. *Front. Physiol.* 12:706743. doi: 10.3389/fphys.2021.706743

- Anexo 9

Granada M., Velásquez M., Rúa C., San Martín S., Escudero C., Alvarez A., Cadavid Á.P. Modulation of the activation of endothelial nitric oxide synthase and nitrosative stress biomarkers by aspirin triggered lipoxins: A possible mechanism of action of aspirin in the antiphospholipid syndrome?(Manuscrito en preparación por coautores para ser sometido a *Am J Reprod Immunol*).