

Vesículas extracelulares endoteliales, anticuerpos antifosfolípidos, y vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos: Un nuevo abordaje del fenómeno anticoagulante lúpico

Daniel Álvarez Jaramillo, Enf.

Trabajo de grado sometido en cumplimiento a los requisitos para la obtención del título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas. Énfasis en bioquímica, farmacología y fisiología

Asesora

Ángela P. Cadavid J. MD, MSc, Dr.Sci.

Co-asesora

Carolina Rúa Molina, BSc, MSc.

Comité asesor

Gloria P. Cardona Gómez BSc, PhD.

Gloria M. Vásquez Duque MD, PhD.

Carlos A. Escudero Orozco MD, PhD.

Universidad de Antioquia

Corporación Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Reproducción

Medellín, Colombia

2022

Resumen

El síndrome antifosfolípido es una trombofilia adquirida causada por un grupo heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos principalmente contra proteínas de unión a fosfolípidos (anticuerpos antifosfolípidos - aAFL). Paradójicamente, algunos de estos anticuerpos se comportan *in vitro* como inhibidores de la cascada de la coagulación, un fenómeno denominado "anticoagulante lúpico". Entre los múltiples mecanismos patogénicos asociados al síndrome antifosfolípido, se ha descrito que los aAFL inducen la activación y disfunción del endotelio vascular a través de vías de señalización que involucran las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Así mismo, se sabe que los aAFL inducen en células endoteliales la liberación de vesículas extracelulares medianas y grandes (VEm/g), fragmentos de membrana con presumibles propiedades procoagulantes. En este trabajo abordamos la actividad de coagulación de las VEm/g endoteliales liberadas ante el estímulo con aAFL y su principal cofactor, la proteína plasmática $\beta 2$ glicoproteína I. Exploramos cómo las vías de las MAPK están implicadas en la liberación de las VEm/g y en su carácter procoagulante, y cómo los anticuerpos tipo anticoagulante lúpico interactúan con estas estructuras para modificar su actividad de coagulación directa. Con esta finalidad, fue empleado un modelo *in vitro* de endotelio estimulado con inmunoglobulinas G de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido y de grupos control, se realizó identificación de vesículas extracelulares por citometría de flujo, y fue implementado un ensayo de coagulación basado en plasma recalcificado. Nuestros resultados muestran que la actividad de coagulación de las VEm/g liberadas a causa del estímulo con aAFL se encuentra condicionada por la actividad tipo anticoagulante lúpico de estos autoanticuerpos. Este efecto anticoagulante se ve revertido al usar $\beta 2$ glicoproteína I durante la estimulación de las células endoteliales, lo cual recupera la actividad de coagulación de las VEm/g de una forma dependiente de las MAPK quinasas de especificidad dual 1 y 2 (MEK1/2). En resumen, nuestros hallazgos sugieren que la $\beta 2$ glicoproteína I es suficiente para revertir, más no para sobrepasar, el efecto anticoagulante que anticuerpos tipo anticoagulante lúpico ejercen sobre las VEm/g endoteliales. Así, las VEm/g no parecen constituir un factor procoagulante directo en el síndrome antifosfolípido, aunque su relación con otros mecanismos indirectos aún debe ser explorada.

Palabras clave

Anticuerpos antifosfolípidos, inhibidor de coagulación del lupus, vesículas extracelulares, trombosis, proteínas quinasas activadas por mitógenos.

Abstract

Antiphospholipid syndrome is an acquired thrombophilia driven by a heterogeneous group of autoantibodies primarily targeting phospholipid-binding proteins (antiphospholipid antibodies - aPL). Paradoxically, some of these antibodies behave *in vitro* as inhibitors of the coagulation cascade, a phenomenon referred to as “lupus anticoagulant”. Among the multiple pathogenic mechanisms involved in antiphospholipid syndrome, aPL have been described to induce activation/dysfunction of vascular endothelium through signalling pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. Likewise, aPL are known to induce the release of endothelial cell-derived medium/large extracellular vesicles (EDEVs), which are membrane fragments with putative procoagulant properties. This work addresses the coagulation activity of EDEVs released upon stimulation with aPL and its primary cofactor, β 2 glycoprotein I. We attempted to explore how MAPK pathways are involved in the release of EDEVs and their coagulation properties; and how lupus anticoagulant-like antibodies interact with EDEVs to modify their coagulation properties. For this purpose, an *in vitro* model of immunoglobulin G-stimulated endothelium, flow cytometry of extracellular vesicles, and a recalcified plasma-based assay were employed. Our results show that the coagulation activity of EDEVs released upon stimulation with aPL is conditioned by the lupus anticoagulant-like activity of autoantibodies. This anticoagulant effect is abrogated by using β 2 glycoprotein I during endothelial cell stimulation, which restores the coagulation activity of EDEVs in mitogen-activated protein kinase kinases 1 and 2 (MEK1/2)-dependent manner. In summary, our findings suggest that β 2 glycoprotein I is sufficient to abrogate, but not to surpass, the anticoagulant effect that lupus anticoagulant-like antibodies exert on EDEVs. Thus, EDEVs does not seem to pose a direct procoagulant factor in antiphospholipid syndrome, although their relationship with other indirect mechanisms remains to be explored.

Keywords

Antiphospholipid antibodies, lupus coagulation inhibitor, cell-derived extracellular vesicles, thrombosis, mitogen-activated protein kinases.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Introducción | 6 |
| Capítulo 1: Contexto y conceptos - Anticuerpos antifosfolípidos, vesículas extracelulares y coagulación | 8 |
| 1.1. <i>Síndrome antifosfolípido y anticuerpos antifosfolípidos</i> | 8 |
| 1.2. <i>Vesículas extracelulares</i> | 9 |
| 1.2.1. <i>Definición, funciones y conceptos generales</i> | 9 |
| 1.2.2. <i>Biogénesis de vesículas extracelulares y su relación con las MAPK</i> | 12 |
| 1.3. <i>Cascada de la coagulación</i> | 14 |
| 1.4. <i>Anticoagulante lúpico</i> | 17 |
| 1.4.1. <i>Definición y contexto histórico</i> | 17 |
| 1.4.2. <i>Principios para la medición del anticoagulante lúpico</i> | 19 |
| 1.5. <i>Anticuerpos antifosfolípidos y vesículas extracelulares</i> | 19 |
| <i>Anexo 1: Microparticles: an alternative explanation to the behavior of vascular antiphospholipid syndrome</i> | 23 |
| Capítulo 2: Trabajo experimental – Actividad de coagulación de vesículas extracelulares liberadas ante el estímulo con anticuerpos antifosfolípidos | 24 |
| <i>Anexo 2: Extracellular vesicles released upon antiphospholipid antibody stimulus: an actual direct procoagulant mechanism or a new factor in the lupus anticoagulant paradox?</i> | 24 |
| Capítulo 3: Conclusiones y perspectivas – Un nuevo abordaje de la paradoja del anticoagulante lúpico | 25 |
| Referencias | 29 |

*“Although patients with the antiphospholipid syndrome exist, they (like **black swans**) are probably not found as frequently as enthusiastic medical personnel might like. Only a small fraction of all patients with thrombosis or fetal loss will have this syndrome, but the numbers are large enough and complications severe enough to justify **searching for them.**”*

E. Nigel Harris, 1987

*“**Lupus anticoagulants (LA)** are somewhat akin to **subatomic particles** and **extrasolar planets**, in that they are “detected” by inference.”*

Gary W. Moore, 2014

Introducción

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una trombofilia adquirida de origen autoinmune, causada por un grupo amplio y heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos contra fosfolípidos¹, proteínas de unión a fosfolípidos, o complejos proteína-fosfolípido² (denominados en conjunto anticuerpos antifosfolípidos - aAFL). Algunos de estos anticuerpos funcionan *in vitro*, en presencia de bajas concentraciones de fosfolípidos, y por mecanismos que aún deben ser esclarecidos, como inhibidores de la vía común de la cascada de la coagulación. A este fenómeno se le conoce como anticoagulante lúpico (AL)³. Más allá, la presencia de aAFL se ha asociado *in vivo* a la ocurrencia de trombosis venosa, arterial, y de pequeños vasos, así como a episodios de morbilidad gestacional. Así, el SAF se define como la entidad que reúne estas manifestaciones clínicas, acompañadas de la seropositividad persistente para los aAFL⁴. Es posible afirmar que los aAFL constituyen la causa directa del SAF, pues estos han sido utilizados con éxito para inducir las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad en modelos murinos, como por ejemplo, trombosis mesentérica en ratas Wistar⁵, o restricción en el crecimiento fetal en ratones BALB/c⁶.

Una característica funcional de los aAFL, descrita recientemente, es su capacidad para inducir en células endoteliales la producción de vesículas extracelulares medianas y grandes (también conocidas como microvesículas o micropartículas)⁷. De hecho, es sabido que individuos con aAFL, en comparación con individuos sanos seronegativos, presentan una cantidad aumentada de vesículas extracelulares medianas y grandes (VEm/g), tanto de origen endotelial como provenientes de monocitos y plaquetas^{8,9}.

Desde su primera descripción en 1946, realizada por Chargaff y West, las VEm/g han sido identificadas por su capacidad procoagulante¹⁰. Así, el primer indicio de la existencia de estas estructuras fue la observación de que en el plasma pobre en plaquetas perdura un remanente de “agente tromboplástico” que es susceptible de ser aislado mediante centrifugación, e incluso puede ser utilizado para restaurar las propiedades del plasma con tiempos de coagulación anormalmente prolongados. La naturaleza del agente tromboplástico identificado por Chargaff y West fue mejor descrita por Wolf en 1967, quien lo definió como un material particulado de origen plaquetario y rico en fosfolípidos o, en términos del autor, “polvo de plaquetas”¹¹. El potencial procoagulante de las VEm/g sigue siendo una característica de interés; no solo se ha mostrado que pacientes con antecedentes de trombosis tienen una mayor cantidad de VEm/g en plasma, sino que se ha podido establecer que el riesgo de trombosis incrementa

progresivamente y de manera lineal con los niveles plasmáticos de VEm/g¹². De hecho, en experimentos posteriores a los realizados por Chargaff y West, tanto *in vitro*¹³ como *in vivo*¹⁴, las VEm/g han sido utilizadas para potenciar la activación del coágulo.

Se han descrito ampliamente dos mecanismos moleculares a través de los cuales las VEm/g interactúan directamente con componentes del plasma facilitando así los eventos propios de la cascada de la coagulación. Por un lado, al incrementar la superficie total de fosfolípidos aniónicos, en especial fosfatidilserina, las VEm/g permiten el ensamblaje de complejos compuestos por factores de coagulación con dominios de aminoácidos catiónicos modificados (factores VII, IX, X y II). Esto a su vez potencia la formación de fibrina y la generación de trombina en plasma^{13,15}. Por otro lado, algunas VEm/g pueden exhibir un potencial de coagulación aumentado dado que portan proteínas procoagulantes como la glicoproteína transmembrana factor tisular (FT), la cual funciona como un iniciador de la cascada de la coagulación a través de la vía extrínseca¹⁴.

En este contexto las VEm/g, especialmente aquellas derivadas de células endoteliales, han sido planteadas como un posible eslabón entre la autoinmunidad y la trombosis en enfermedades como lupus eritematoso sistémico (LES)¹⁶ y SAF¹⁷. No obstante, las veces que se han interrogado las VEm/g en cuanto a sus propiedades funcionales, ha sido desconcertante que, en individuos con aAFL, una cantidad aumentada de VEm/g no se relaciona con una mayor disponibilidad de fosfolípidos aniónicos para la formación de complejos protrombinasa¹⁸, ni con una mayor actividad de coagulación tipo FT¹⁹. Así, se sugiere que, más allá del número de vesículas, otras variables como las condiciones en las cuales el endotelio es activado para la liberación de VEm/g, o una posible interacción entre las VEm/g endoteliales y los mismos autoanticuerpos que inducen y condicionan su liberación, podrían estar influyendo en la actividad de coagulación de estas estructuras. Estos aspectos son abordados en el presente trabajo.

Capítulo 1: Contexto y conceptos - Anticuerpos antifosfolípidos, vesículas extracelulares y coagulación

1.1. Síndrome antifosfolípido y anticuerpos antifosfolípidos

El SAF es una enfermedad autoinmune definida por los criterios de clasificación de Sapporo actualizados⁴. Según este consenso internacional, es posible atribuir a un individuo el síndrome si cumple con al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio propios de la enfermedad. Son criterios clínicos: uno o más episodios de trombosis, bien sea venoso o arterial, debidamente confirmado; una o más pérdidas fetales posterior a la semana 10 de gestación sin ninguna otra causa determinada y con un feto evaluado como morfológicamente normal; tres o más pérdidas gestacionales consecutivas antes de la semana 10 excluida cualquier otra causa subyacente; o uno o más nacimientos prematuros antes de la semana 34 a causa de eclampsia, preeclampsia o insuficiencia placentaria. Por su parte, son considerados criterios de laboratorio la presencia persistente de títulos medios o altos de anticuerpos anti-cardiolipina (aCL), anticuerpos anti- β 2 glicoproteína I (a β 2GPI), o la detección del AL⁴ (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de Sapporo actualizados para la clasificación del síndrome antifosfolípido.

| Criterios clínicos | Criterios de laboratorio |
|--|--|
| - Uno o más episodios clínicos de trombosis que afecten venas, arterias o pequeños vasos y/o, | - Presencia de AL en plasma, detectado en dos o más ocasiones separadas por al menos 12 semanas y/o, |
| - Una o más pérdidas fetales a la semana 10 de gestación o después de la semana 10 de gestación y/o, | - Presencia de títulos medios o altos (por encima del percentil 99) de anticuerpos aCL y/o a β 2GPI (isotipos IgG o IgM), detectados en dos ocasiones o más separadas por al menos 12 semanas. |
| - Tres o más abortos espontáneos no explicados antes de la semana 10 de gestación y/o, | |
| - Uno o más nacimientos prematuros a causa de eclampsia, preeclampsia o insuficiencia placentaria. | |

AL, anticoagulante lúpico; aCL, anticuerpos anti-cardiolipina; a β 2GPI, anticuerpos anti- β 2-glicoproteína I; IgG, inmunoglobulinas G; IgM, inmunoglobulinas M.

Adaptado de: Miyakis S et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006⁴.

En contraste con su definición en el contexto clínico, el entendimiento de la fisiopatología del SAF, y los mecanismos moleculares que subyacen a las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad, aún es difuso y constituye un limitante para la postulación de nuevas alternativas terapéuticas. De hecho, hasta el momento en que se escribe este trabajo, el tratamiento recomendado para la enfermedad está dirigido fundamentalmente hacia el manejo del efecto de hipercoagulabilidad de los aAFL mediante el uso de agentes anticoagulantes, trombofiláticos y antiplaquetarios²⁰; y no, como es esperado, hacia la interrupción de los mecanismos patogénicos a través de los cuales los autoanticuerpos conducen a esta trombofilia.

Así, por ejemplo, aunque de forma canónica se reconocen como parte de los criterios diagnósticos únicamente los anticuerpos aCL, a β 2GPI y AL, de hecho, se ha descrito un gran número de aAFL como anticuerpos anti-fosfatidilinositol, anti-fosfatidiletanolmina, anti-fosfatidilserina, anti-ácido fosfático, anti-fosfatidilserina/protrombina, anti-anexina V, y anti-vimentina/cardioplipina²¹⁻²⁵; anticuerpos que podrían ser de importancia para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, o bien estar implicados en sus mecanismos patogénicos²¹.

Asociado a la gran variedad de aAFL y posibles mecanismos patogénicos, algunos autores han postulado que, posiblemente, las manifestaciones clínicas obstétricas y vasculares del SAF se deben a anticuerpos con especificidades antigénicas diferentes y, por lo tanto, la enfermedad podría diferenciarse en dos entidades independientes: SAF vascular y SAF obstétrico²⁶. Esta hipótesis se encuentra fundamentada en evidencias que muestran cómo aAFL monoclonales activan algunos tipos de células por medio de vías diferentes^{27,28}; y cómo anticuerpos policlonales purificados de pacientes con manifestaciones clínicas de uno u otro tipo (vasculares u obstétricas) inducen respuestas únicas en células de trofoblasto²⁹ y monocitos³⁰. Esta discusión se aborda a profundidad en el anexo 1: "*Microparticles. An alternative explanation to the behavior of vascular antiphospholipid syndrome*".

1.2. Vesículas extracelulares

1.2.1. Definición, funciones y conceptos generales

Las vesículas extracelulares (VEs) son fragmentos de bicapa lipídica liberados naturalmente por células, que, por definición, no pueden replicarse³¹. Intercambiadas entre células como mensajeros que portan proteínas³², ácidos nucleicos³³, y lípidos de importancia biológica³⁴, las VEs cumplen diferentes funciones en contextos fisiológicos al tiempo que están implicadas en estados patológicos.

Un ejemplo clásico de la participación de VEs en procesos fisiológicos lo constituyen los prostasomas. Como lo demuestran trabajos recientes, células del epitelio prostático en la zona de transición, a través de secreción apocrina, liberan hacia el lumen del tracto reproductor masculino fragmentos de membrana de 0.15 hasta más de 1 μm^3 (Figura 1). Por su origen, estas vesículas han sido denominadas “prostasomas”. La importancia de los prostasomas en la maduración post-testicular de los espermatozoides ha sido motivo de interés por años. Ya desde la década de 1980, mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño y centrifugación, se logró demostrar que las VEs son un componente principal del plasma seminal capaz de promover la movilidad progresiva de espermatozoides de individuos sanos³⁶. Hoy es sabido que los prostasomas cargan e importan a los espermatozoides proteínas implicadas en la movilidad espermática, como lo es la bomba calcio ATPasa 4 y la óxido nítrico sintasa³⁷.

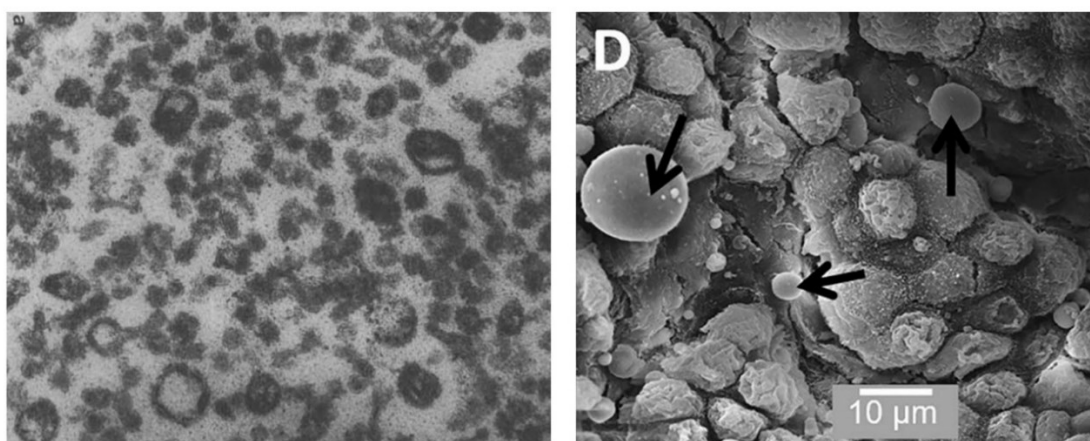


Figura 1. Ejemplo de la evolución en el estudio de vesículas extracelulares. Comparación entre imágenes de vesículas extracelulares liberadas por células de la próstata, publicadas con casi 4 décadas de diferencia. Izquierda, imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) publicada en 1982, que muestra la fracción cromatográfica del plasma seminal que se encuentra enriquecida en vesículas extracelulares (tomado de: Stegmayr B et al. Urol Res. 1982). Derecha, imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) publicada en 2019, que muestra células de epitelio prostático en proceso de secreción de vesículas (tomado de: Fullwood NJ et al. Sci Rep. 2019).

Otro proceso fisiológico cuya concepción se ha visto modificada por la participación de VEs es la presentación de antígenos. En un principio, se entiende que la condición particular de los receptores de linfocitos T, por la cual estos únicamente reconocen sus objetivos cognatos cuando se encuentran en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), implica que este reconocimiento solo ocurre en cercanía estrecha con células presentadoras que previamente han adquirido y procesado el respectivo antígeno. Sin embargo, este concepto se ve retado al identificar que es posible inducir respuestas antígeno-

específicas en células T, utilizando VEs de linfocitos B portadoras del CMH-clase II³⁸. Evidencia más reciente muestra que células dendríticas maduras intercambian complejos antígeno-CMH y moléculas co-estimuladoras a través de VEs (“dexosomas”), permitiendo así que células dendríticas que no han estado en contacto primario con el antígeno, amplifiquen la activación de linfocitos T CD4⁺³⁹. Las VEs derivadas de células presentadoras de antígeno se exploran en la actualidad como una posible inmunoterapia en el cáncer⁴⁰.

La versatilidad de las VEs para funcionar como mensajeros entre células reside en: 1) la alta selectividad con la cual estas estructuras están dirigidas a sus células destinatarias y 2) la capacidad de las células remitentes para seleccionar el cargo a enviar en las vesículas. Con respecto a la selectividad de las VEs se sabe que, por ejemplo, en el contexto planteado anteriormente, las vesículas derivadas de linfocitos B portadoras del CMH-clase II se dirigen con alta preferencia hacia células dendríticas foliculares cuando se añaden a cultivos primarios derivados de amígdalas palatinas humanas, ignorando células plasmáticas, macrófagos, eritrocitos, mastocitos y basófilos⁴¹. Además de esta preferencia, es destacable que un mismo tipo de células pueda liberar distintas subpoblaciones de VEs que difieren en sus cargos³², e incluso, modificar el cargo de sus vesículas hijas según las vías de señalización intracelular que se encuentran activas⁴². Las características de las VEs liberadas por un determinado tipo de célula varía según el estímulo utilizado para inducir su liberación⁴³.

Dos principales subpoblaciones de VEs son las micropartículas y los exosomas. Las micropartículas surgen directamente de la protrusión de la membrana plasmática y la posterior liberación de la ampolla resultante como una vesícula independiente. Los exosomas por su parte se originan en cuerpos multivesiculares al interior de la célula, los cuales, al fusionarse con la membrana plasmática, liberan sus vesículas intraluminales hacia el espacio extracelular^{31,44,45}.

Dado que exosomas y micropartículas tienen orígenes diferentes, y probablemente cargos diferentes, se ha postulado que algunas moléculas podrían servir en el laboratorio como marcadores para diferenciar entre ambas subpoblaciones. Sin embargo, análisis recientes de proteómica han mostrado que marcadores que clásicamente se entendían como putativos de una u otra subpoblación, como las moléculas del CMH-clase II o la flotilina 1, se encuentran indistintamente en ambos tipos³². Estas limitaciones han llevado a utilizar otros métodos para diferenciar las subpoblaciones de VEs. Así, las guías de Información Mínima para Estudios de Vesículas Extracelulares (MISEV2018) publicadas por la Sociedad Internacional para Vesículas Extracelulares (ISEV) establecen que, en la práctica, utilizar los términos “micropartículas” o

“exosomas” (sugiriendo que las VEs tienen su origen en una determinada vía de biogénesis) resulta “extraordinariamente difícil”, a menos que se utilicen métodos de imagen de célula viva que permitan evidenciar el momento exacto en que las VEs son liberadas. Por este motivo, insta al uso de términos operativos basados en características físicas como el tamaño de las vesículas³¹. En este trabajo utilizamos el término VEm/g para referirnos a partículas de aproximadamente 0.5 a 2 μm , dimensiones que se han relacionado con la subpoblación de las micropartículas. Una descripción más precisa de la definición operativa utilizada durante el trabajo experimental se establece en la sección métodos del anexo 2: *“Extracellular vesicles released upon antiphospholipid antibody stimulus: an actual direct procoagulant mechanism or a new factor in the lupus anticoagulant paradox?”*.

1.2.2. Biogénesis de vesículas extracelulares y su relación con las MAPK

Como se mencionó anteriormente, el proceso de biogénesis de las VEs pequeñas (exosomas), difiere del proceso referido para las VEm/g (micropartículas). Las descripciones tempranas del origen de las VEs pequeñas fueron realizadas en el contexto del proceso de maduración de reticulocitos hacia eritrocitos. Una característica de dicho proceso de maduración es la pérdida del receptor de transferrina, el cual, es internalizado en endosomas y posteriormente liberado al medio extracelular en forma vesicular sin ser degradado. La ruta seguida por el receptor de transferrina fue evidenciada por Pan y colaboradores a través de marcaje por “immunogold” acoplado a microscopía electrónica. Sus imágenes muestran que la proteína marcada es transferida a vesículas dentro del lumen de los endosomas (vesículas intraluminales). El cuerpo multivesicular resultante podría fusionarse con un lisosoma para la degradación de las vesículas intraluminales y sus cargos; en cambio, los autores demuestran su fusión con la membrana plasmática, lo que desencadena la liberación de las vesículas intraluminales hacia el espacio extracelular (VEs pequeñas)⁴⁶. Hallazgos recientes han permitido describir en detalle cómo las proteínas del complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte (ESCRT) actúan en la formación de las vesículas intraluminales y en la selección de sus cargos en un proceso mediado por la ubiquitinación de proteínas transmembrana⁴⁷. Luego, el destino de los cuerpos multivesiculares es decidido por proteínas de la familia de las pequeñas GTPasas^{48,49}. También se han descrito procesos independientes a la maquinaria ESCRT⁴⁹.

A diferencia de las VEs pequeñas, que cuentan con un modelo bien establecido de biogénesis basado en cuerpos multivesiculares, los fenómenos que conducen a la liberación de VEm/g solo

han sido descritos parcialmente. Aun así, hay algunas características conocidas que se pueden enumerar para entender mejor este proceso:

- 1) La biogénesis de las VEm/g depende de un incremento en el calcio intracelular. Tanto el uso de ionóforos de calcio como de inhibidores de la bomba calcio ATPasa del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) son suficientes para inducir la liberación de VEm/g en plaquetas⁵⁰. Dos fenómenos explican cómo el incremento del calcio citosólico resultante influye en la biogénesis de las VEm/g: En primer lugar, se sabe que el calcio activa la proteína TMEM16F⁵¹. Esta es una escramblasa que, al transportar fosfolípidos bidireccionalmente en la membrana plasmática, contribuye a la pérdida de la asimetría y provoca el desplazamiento reversible de fosfatidilserina (normalmente presente en la cara interna) hacia la cara externa⁵¹. Este fenómeno en sí mismo tiene implicaciones en la coagulación. Así, plaquetas deficientes en TMEM16F tienen menor capacidad para generar trombina⁵². Por su parte, también se ha establecido que estas células tienen afectada su capacidad para liberar VEm/g, de modo que se piensa que la exposición de fosfatidilserina está implicada en la protrusión de la membrana plasmática, y en general, la fosfatidilserina se ha utilizado como marcador de las VEm/g⁵³. El segundo fenómeno que conecta el incremento del calcio citosólico con la liberación de VEm/g, es la activación de la proteasa dependiente de calcio, calpaína. Se cree que esta proteína degrada el citoesqueleto en las inmediaciones de la membrana plasmática y permite así que esta se deforme y protruya hacia el exterior⁵⁰. Por esta razón, inhibir químicamente la calpaína suspende el efecto de estímulos que conducen a la liberación de VEm/g⁵⁴. Además, se ha encontrado que las VEm/g contienen calpaína activa⁵⁵.
- 2) La membrana celular cambia durante el proceso de biogénesis de las VEm/g, de hecho, no solo la exposición de fosfatidilserina, sino además otras modificaciones en la composición lipídica de la membrana, pueden conducir a la liberación de VE. Un mecanismo descrito en células expuestas a diferentes estímulos proinflamatorios, que conduce a la liberación de VEm/g, es la activación de la enzima esfingomielina fosfodiesterasa ácida y su movimiento a la hoja externa de la membrana celular^{56,57}. Esta enzima cataliza la conversión de esfingomielina a ceramida.
- 3) El citoesqueleto debe ser remodelado durante el proceso de producción de VEm/g. Esta reorganización incluye la polimerización de actina, la activación de la cadena ligera de miosina no muscular 2 (MLC2) mediada por la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), y consecuentes cambios en la dinámica actina-miosina mediados por proteínas quinasas asociadas a Rho (ROCK)⁵⁸.

La producción de VEm/g puede ser inducida por diferentes tipos de estrés y estímulos que conducen a la activación de las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Tanto la activación de la vía de la proteína quinasa p38 activada por mitógenos (p38MAPK), como la vía de las proteínas quinasas-quinasa de especificidad dual activadas por mitógenos 1 y 2 (MEK1/2), pueden inducir la producción de VEm/g de manera independiente o conjunta según el tipo de estímulo implicado. Por ejemplo, se ha descrito que señales proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en células endoteliales⁵⁹, o agonistas de purinoceptores como ATP en astrocitos⁵⁶, inducen la producción de VEm/g a través de la vía de p38MAPK y de forma independiente a la vía de MEK1/2. Por su parte, mitógenos como ésteres de forbol, inducen la producción de VEm/g mediante la activación de la vía de MEK1/2, en un proceso que se ve inalterado por inhibidores de p38MAPK⁶⁰. Otros estímulos como agonistas del receptor activado por proteasas PAR-2, o el análogo de nucleósido gemcitabina, pueden inducir la producción de VEm/g mediante la activación de ambas vías simultáneamente^{57,58}. En cualquier caso, estudios con inhibidores sugieren que las dos vías actúan de manera paralela e independiente en este proceso⁵⁸; mientras que la vía de p38MAPK se ha asociado especialmente a la activación de la enzima esfingomielina fosfodiesterasa ácida^{56,57}, la activación de la vía de MEK1/2 parece conducir a la fosforilación de MLCK, lo cual tiene efectos directos sobre el citoesqueleto⁵⁸.

En el contexto del SAF, si bien se ha observado que el estímulo con anticuerpos $\alpha\beta 2$ GPI induce la producción de VEm/g a través de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, en un proceso que depende de ROCK y MLCK (sugiriendo que la vía de MEK1/2 podría estar implicada), hasta el momento la vía de señalización responsable permanece sin ser definida⁶¹. Esta discusión resulta relevante, pues la activación de una u otra vía de las MAPK, puede influir en el cargo procoagulante de las VEm/g, como lo demuestra el estudio de la expresión de FT en vesículas liberadas por células endoteliales⁴².

1.3. Cascada de la coagulación

La hemostasia es el equilibrio fisiológico de un conjunto de procesos que tienen como finalidad evitar la pérdida de sangre ante la disrupción del circuito vascular, al cual se acoplan procesos que, simultáneamente, previenen la formación o estabilización inusitada de trombos que podrían impedir el flujo sanguíneo normal⁶². Una parte fundamental de la hemostasia la compone la cascada de la coagulación, también conocida como hemostasia secundaria. Desde su modelo más simple, basado en los cuatro factores descritos en 1905 por Morawitz

(fibrinógeno, trombina, tromboquinasa y calcio), hasta el modelo aún vigente de la cascada (inicialmente “*waterfall*” y posteriormente “*cascade*”), expuesto en 1964 por Davie y Ratnoff, la coagulación se entiende como un proceso en el cual las propiedades físicas de la sangre cambian gracias a la activación secuencial de proteínas que son al tiempo zimógenos/sustratos de proteasas, y, una vez activas, proteasas; con excepción de la fibrina, último eslabón de la cascada cuya función en sí misma es ser material para el coágulo o trombo⁶³⁻⁶⁵.

La coagulación es un proceso complejo. Por un lado, implica un entramado de no menos de 21 reacciones enzimáticas en las cuales, a diferencia de los modelos originales, hoy se entiende que interactúan por lo menos 11 factores de manera no secuencial⁶⁶. Por otro lado, se han descrito diferentes vías a través de las cuales la coagulación interactúa de forma bidireccional, siendo afectada y afectando otros procesos biológicos como la gestación o la respuesta inmune^{67,68}. Una descripción completa de la cascada de la coagulación puede encontrarse en cualquier texto de fisiología, revisiones⁶⁴ y modelos matemáticos⁶⁶. En este trabajo, nos limitaremos a entender las principales reacciones implicadas en la activación del trombo *in vivo* y sus modificaciones *in vitro*, lo que se conoce como “vía extrínseca” y “vía común”.

El evento proteolítico que inicia la cascada de la coagulación *in vivo* es materia de discusión. Los últimos hallazgos describen un bucle de activación recíproca entre dos factores, no obstante, el factor iniciador de dicho bucle se desconoce⁶⁹. Se sabe que el factor VII activado (FVIIa) funciona como una proteasa clave en el inicio de la cascada, dando paso a las siguientes reacciones⁶⁶. Una fracción del FVII permanece activada en sangre bajo condiciones basales, cantidad que se ve reducida a su 10% en individuos con deficiencia severa del FIX (hemofilia B)⁷⁰. La antigua suposición de que el FIX sería el responsable de la presencia de cierta cantidad circulante de FVIIa en sangre, fue confirmada recientemente mediante el uso de factores modificados que impiden la amplificación por retroalimentación positiva entre estos dos factores. Más importante aún, se demostró que la activación del FVII puede darse en ausencia de cofactores, e incluso por formas parcialmente activadas del FIX (FIXα)⁶⁹. Estas dos características hacen del factor IX un candidato promisorio en la iniciación de la cascada de la coagulación. ¿Bajo qué contexto, o en medio de qué reacción proteolítica, surgen formas activadas o parcialmente activadas del FIX que desencadenan la formación del trombo? Como se mencionó anteriormente, se trata de un bucle de activación recíproca; aunque el FIX (antiguamente llamado factor *Christmas*) fue originalmente descrito en el contexto de la vía de la coagulación intrínseca, siendo activado por el FXIa⁷¹, *in vivo*, el mismo FVIIa en complejo con su cofactor (FT), activa el FIX en una vía conocida como vía cruzada (“*crossover pathway*”)^{64,72}.

Así, el FIX y el FVII se activan mutuamente, y ambos, a su vez, pueden conducir por medio de otras reacciones proteolíticas a la activación del FX, puerta de la vía común de la cascada de la coagulación⁶⁹ (Figura 2).

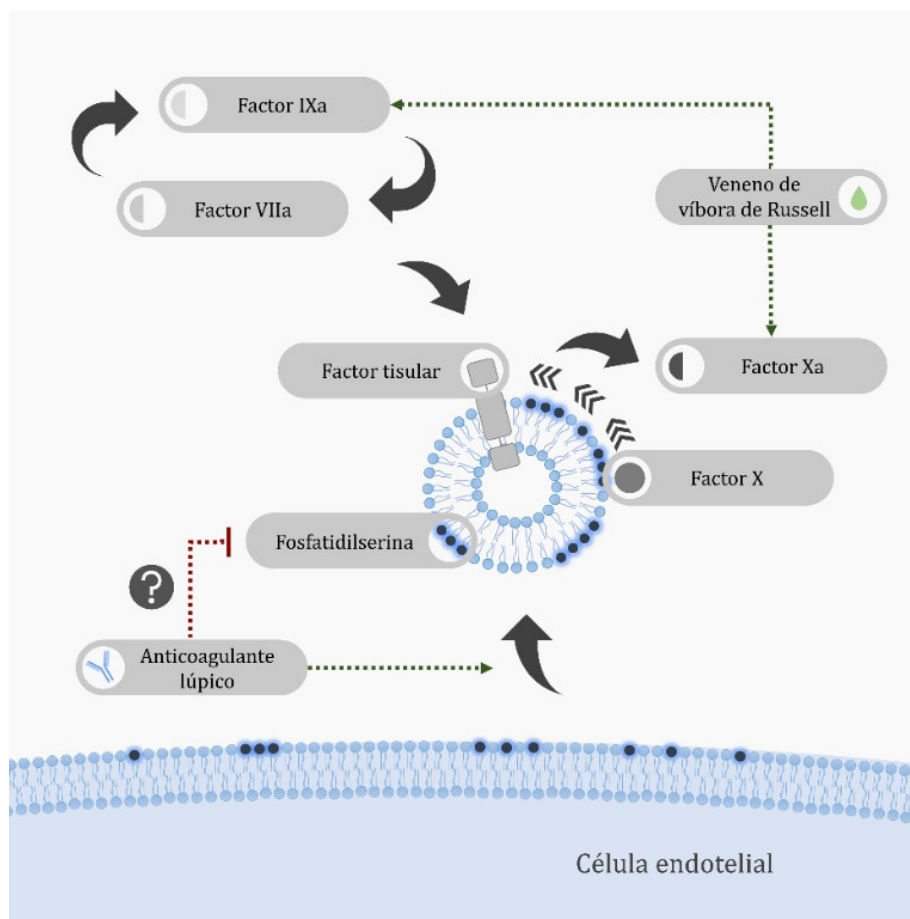


Figura 2. Representación gráfica de la conformación del complejo Xasa y sus posibles interacciones con el veneno de víbora de Russell y los anticuerpos tipo anticoagulante lúpico. Los factores VII y IX se activan en un bucle de retroalimentación positiva. El FVIIa se une a la proteína transmembrana factor tisular. El FX se une a las superficies de fosfolípidos aniónicos y, desde allí, es presentado a los complejos FVIIa:FT para su activación proteolítica en el complejo Xasa. Los anticuerpos tipo anticoagulante lúpico inducen la producción de vesículas extracelulares con fosfolípidos aniónicos, al tiempo que, paradójicamente, funcionan *in vitro* como anticoagulantes por mecanismos sin esclarecer. El veneno de víbora de Russell contiene proteasas activadoras de los factores IX y X.

La razón por la cual, aun cuando el 1% del FVII en estado basal se encuentra activado, la cascada de la coagulación no se desencadena de manera inusitada, es porque para dar paso a la formación del complejo catalítico que permite la activación del factor X (complejo Xasa), es necesaria la presencia de dos componentes adicionales: fosfolípidos aniónicos y FT. De hecho,

la activación del FX en ausencia del complejo Xasa es millones de veces menos eficiente catalíticamente^{66,73}.

El FT es una glicoproteína integral de membrana que funciona como receptor y cofactor del FVIIa⁷⁴. En condiciones basales, el FT funcionalmente activo es expresado por células que se encuentran físicamente separadas de la sangre, de modo que, cuando hay pérdida de la integridad en los vasos sanguíneos, este receptor se expone permitiendo la unión del FVIIa y la consecuente iniciación de la cascada de la coagulación⁷⁵. No obstante, también hay fuentes de FT de origen sanguíneo. Lo anterior implica que, bajo ciertos estímulos como lipopolisacárido, algunas células en contacto directo con la sangre también pueden expresar FT. Junto con los monocitos, las VEs son la principal fuente de FT de origen sanguíneo⁷⁶.

Los fosfolípidos aniónicos por su parte sirven como una plataforma de presentación e interacción entre factores de coagulación que cuentan con dominios del aminoácido catiónico modificado ácido γ -carboxiglutámico (simplificado como “dominios Gla”)⁷⁷. La importancia de la interacción entre factores de la coagulación y superficies de fosfolípidos aniónicos (proceso dependiente de la presencia de calcio) queda de manifiesto cuando se eliminan los dominios Gla de algunos de estos factores, lo cual reduce significativamente la eficiencia catalítica de sus complejos⁷⁸. Modelos matemáticos recientes han sugerido que, por ejemplo, el FX, sustrato del complejo Xasa, no se une a los complejos FVIIa:FT directamente desde la solución. En cambio, debe existir un pool común de FX asociado a membrana que es presentado por los fosfolípidos al complejo, y luego, una vez activado, es removido de las inmediaciones^{79,80}. Los fosfolípidos aniónicos también participan en el ensamblaje del complejo protrombinasa, formado por el FXa y su cofactor, el FV⁸¹.

1.4. Anticoagulante lúpico

1.4.1. Definición y contexto histórico

El AL fue descrito en la década de 1950 por los autores Conley y Hartmann, quienes identificaron la presencia de un inhibidor de la cascada de la coagulación en el plasma de algunos pacientes con LES. En su criterio, el inhibidor de naturaleza desconocida sería responsable de un trastorno hemorrágico⁸². Durante los años posteriores diferentes grupos de investigación, y en especial el grupo del Dr. Hughes del *Hammersmith Hospital* en Londres, reportaron que, paradójicamente, la presencia de AL no se relaciona con la ocurrencia de episodios hemorrágicos, sino con antecedentes de trombosis en pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes^{83,84}.

Después de analizar grandes grupos de pacientes, fue posible asociar el AL a otro fenómeno biológico: la presencia de resultados falsos positivos para la prueba serológica de sífilis, lo que para entonces constituía un criterio diagnóstico del LES⁸⁵. Este hallazgo permitió al grupo del Dr. Hughes postular como hipótesis que, tanto el fenómeno del AL como la trombosis vascular asociada, se podrían explicar por la presencia de anticuerpos dirigidos contra el fosfolípido aniónico cardiolipina, principal antígeno en los preparados complejos empleados en las pruebas serológicas de sífilis. Esta hipótesis fue desarrollada y parcialmente corroborada en 1986 mediante la implementación de un radioinmunoensayo para la detección de anticuerpos aCL⁸⁶, primer anticuerpo antifosfolípido reconocido.

En la actualidad, como se mencionó en secciones anteriores, se acepta que existe una gran variedad de aAFL. La capacidad de algunos de estos autoanticuerpos para ejercer como anticoagulantes *in vitro*, mientras funcionan como agentes procoagulantes *in vivo*, aun constituye una paradoja. Esto es especialmente desconcertante en el ámbito clínico pues, aunque han sido descritos muchos aAFL, la evidencia sugiere que específicamente aquellos con actividad AL están asociados a trombosis^{87,88}.

Por un lado, las propiedades procoagulantes de los aAFL han sido justificadas en su capacidad para inducir en células endoteliales², monocitos⁸⁹ y plaquetas²⁷ un fenotipo procoagulante y proinflamatorio que finalmente se vería reflejado en un estado de hipercoagulabilidad. Estos mecanismos se unen a la evidencia que muestra cómo los aAFL también interactúan con proteínas plasmáticas y de superficie como proteína C activa (PCA)⁹⁰, anexina V⁹¹, o β 2GPI⁹², inhibiendo sus funciones fisiológicamente anticoagulantes. Una descripción más profunda de los mecanismos patogénicos por los cuales los aAFL pueden conducir a trombosis vascular es abordada en el anexo 1.

Por su parte, propiedades anticoagulantes han sido asociadas fundamentalmente a dos tipos de aAFL: anticuerpos a β 2GPI y anticuerpos anti-protrombina (aPT). Según la evidencia hasta ahora disponible, entre otros posibles mecanismos, los complejos formados por los mencionados autoanticuerpos y sus respectivas proteínas antigénicas se unirían a superficies de fosfolípidos aniónicos, compitiendo así con factores de la cascada de la coagulación por sitios necesarios para la formación de los complejos protrombinasa y Xasa⁹³. Persiste la duda con respecto a los mecanismos y las especificidades antigénicas de los anticuerpos responsables del fenómeno AL. Más aún, sigue sin ser esclarecida la razón por la cual, con unas muy pocas excepciones (síndrome hemorrágico de hipoprotrombinemia asociado a anticoagulante lúpico⁹⁴), la capacidad anticoagulante de los aAFL es insignificante en el ámbito clínico.

1.4.2. Principios para la medición del anticoagulante lúpico

Al desconocerse hasta el momento la explicación molecular e identidad exacta de los autoanticuerpos responsables del AL, su detección se sigue llevando a cabo de manera indirecta. El principio básico para este fin, es la exclusión de otras causas que expliquen un tiempo de coagulación anormalmente prolongado^{3,95}. Una estrategia inicial en este proceso es el uso de activadores de la coagulación que actúen directamente en los últimos pasos de la cascada, como el veneno de víbora de Russell (RVV), evadiendo así las reacciones iniciales que no dependen de la presencia de fosfolípidos (Figura 2). El componente mejor documentado del RVV es una metaloproteinasa que funciona como activadora directa del FX (RVV-X)⁹⁶, aunque también se ha documentado que el veneno puede activar el FIX⁷¹. Cuando el tiempo de coagulación en presencia de RVV diluido (dRVVT) se evalúa en ausencia y, posteriormente, en presencia de un exceso de fosfolípidos, se puede establecer si existe un impedimento en el desarrollo de los últimos pasos de la cascada de la coagulación, que es susceptible a ser corregido con un exceso de fosfolípidos. La diferencia entre ambos tiempos, y su comparación con lo ocurrido en el plasma normal, se expresa en un índice normalizado (NR)^{3,95}.

El caso anterior, sin embargo, puede darse en escenarios no relacionados con el AL. Dentro de estos escenarios, resulta especialmente importante descartar que la deficiencia de factores específicos en plasma (por ejemplo, FX), esté conduciendo a la prolongación inicial de los tiempos de coagulación. Con este fin, se mezcla el plasma problema con plasma normal, de tal manera que cualquier deficiencia puede ser subsanada, mientras la presencia de inhibidores permanece evidente (aunque en algunos casos sean indetectables por su dilución)^{3,97}.

En resumen, la detección del AL no se da por la evidencia inequívoca de la presencia de determinados autoanticuerpos, en vez de ello esta se infiere cuando: 1) se detecta un tiempo de coagulación prolongado que, 2) se restablece bajo cantidades aumentadas de fosfolípidos aniónicos, y 3) no es el producto de una deficiencia específica, sino de la presencia de un inhibidor que actúa en los últimos pasos de la cascada de la coagulación. Como se puede esperar, a pesar de las comprobaciones realizadas, otros escenarios aún pueden presentar características similares⁹⁸. Esto supone una limitación importante para la detección del AL.

1.5. Anticuerpos antifosfolípidos y vesículas extracelulares

El endotelio ha sido descrito como un actor importante en el SAF. Los aAFL interactúan con células endoteliales a través de diferentes vías de señalización, desencadenando múltiples respuestas que se pueden agrupar en: 1) activación, manifestada por la expresión de moléculas

procoagulantes y proinflamatorias⁹⁹⁻¹⁰¹, así como por un incremento en la proliferación¹⁰²; y 2) disfunción, evidente en una menor producción de óxido nítrico y una consecuente respuesta atenuada a estímulos vasodilatadores como acetil-colina^{103,104}. Los efectos de la estimulación de células endoteliales con aAFL se resumen en el anexo 1.

Un fenómeno que acompaña la activación del endotelio, es el incremento en la producción de VEm/g^{7,59}. La relación entre aAFL y VEm/g endoteliales ha sido documentada en dos sentidos. Por un lado, se ha descrito que individuos seropositivos (y en especial portadores de AL^{105,106}), tienen una mayor cantidad de VEm/g endoteliales en sangre^{8,9}. También se ha identificado en estos individuos un incremento en los niveles de VEm/g provenientes de plaquetas⁹ y monocitos⁸. Por otro lado, las inmunoglobulinas G (IgG) policlonales de pacientes con SAF vascular han sido utilizadas *in vitro* para inducir en células endoteliales un incremento en la producción de VEm/g²⁹.

Lo anterior es relevante para la fisiopatología del SAF. Aunque las VEm/g en contextos fisiológicos funcionan como mensajeros entre células, estas estructuras también son fuente de fosfolípidos aniónicos, característica intrínseca que hace de una cantidad aumentada de VEm/g en sangre, un factor de riesgo para trombosis¹². Además, algunas VEm/g son fuente de FT de origen sanguíneo, una propiedad especialmente encontrada en contextos patológicos, que dota a las VEm/g de una mayor actividad procoagulante¹⁴. Consecuentemente, las VEm/g endoteliales en el SAF podrían contribuir al estado de hipercoagulabilidad que caracteriza a la enfermedad.

A pesar de lo anterior, es desconcertante que, hasta el momento en que se escribe este trabajo, no se ha encontrado una mayor actividad de coagulación asociada a las VEm/g derivadas de pacientes con aAFL^{18,19}. Esta observación sugiere que otros factores como las condiciones implicadas en la liberación de las VEm/g, o una posible interacción entre aAFL y VEm/g, podrían ser determinantes para entender la actividad de coagulación de estas estructuras en el contexto del SAF.

En cuanto a las condiciones que conducen a la liberación de VEm/g endoteliales a causa del estímulo con aAFL, al menos dos vías de señalización podrían estar involucradas: la vía de p38MAPK y la vía de MEK1/2. Como se mencionó en secciones anteriores, dependiendo del estímulo involucrado, ambas vías de señalización pueden conducir de manera paralela (solas o simultáneamente) a la producción de VEm/g^{56,57,59,60}. Más aún, se sabe que los aAFL pueden activar ambas vías de señalización en monocitos¹⁰⁷. En células endoteliales se ha documentado en especial la activación de la vía de p38MAPK a través de la interacción entre complejos

$\alpha\beta 2\text{GPI}/\beta 2\text{GPI}$ y receptores tipo toll (TLR)^{99,108}. Sin embargo, también se ha descrito que el proceso de producción de VEm/g endoteliales inducido por el estímulo con anticuerpos $\alpha\beta 2\text{GPI}$, está mediado por ROCK y MLCK⁶¹, proteínas que putativamente son activadas por la vía de MEK1/2⁵⁸. En conclusión, existe evidencia que apoya la participación de ambas vías de las MAPK.

Las vías de señalización asociadas al proceso de producción de VEm/g pueden modificar simultáneamente la actividad de coagulación de las estructuras resultantes. Por ejemplo, se sabe que, aunque la activación de la vía de p38MAPK induce un incremento en la producción de VEm/g, simultáneamente y durante las primeras dos horas de estímulo, esta proteína quinasa también previene la incorporación de FT en las VEm/g por medio de la fosforilación de su dominio intracelular en el residuo serina 258, una función que no es llevada a cabo por MEK1/2⁴².

Una segunda variable que podría influir en la actividad de coagulación de las VEm/g es su posible interacción con los aAFL implicados en su producción. Algunos autores han sugerido que ensayos de coagulación basados en la inmovilización de VEm/g por medio de superficies de anexina V podrían verse alterados por la presencia de aAFL¹⁸. Más importante aún, por medio de citometría de flujo se ha descrito que aAFL se unen a las VEm/g, de modo que la fosfatidilserina y la $\beta 2\text{GPI}$ de sus superficies es encriptada¹⁰⁹. Este fenómeno probablemente explique la cantidad anormalmente alta de VEm/g negativas para la expresión de fosfatidilserina reportada por otros autores⁸. Los efectos funcionales de la interacción mencionada en el proceso de la coagulación no han sido estudiados, en cambio, se ha aceptado hasta el momento que la influencia anticoagulante de los aAFL sobre la fisiopatología del SAF es negligible, aunque paradójicamente la actividad tipo AL se relacione con el riesgo de trombosis^{87,88}.

Basados en la interrogante que supone la actividad de coagulación de las VEm/g en el SAF, y una vez identificados los posibles factores que podrían responder a la ya planteada contradicción entre el número de vesículas y su actividad de coagulación, nosotros nos interesamos en la función de las vías de las MAPK y la influencia de los anticuerpos AL en este posible mecanismo patogénico. Así, como pregunta inicial nos planteamos si ¿es la producción de VEm/g inducida por aAFL, y la actividad de coagulación asociada a las VEm/g liberadas, dependiente de las vías de p38MAPK y MEK1/2?

Bajo la hipótesis central de que los aAFL de pacientes con manifestaciones clínicas vasculares del SAF inducen en células endoteliales la producción de VEm/g procoagulantes, en un proceso

mediado por las vías de señalización de p38MAPK y MEK1/2, nos planteamos como objetivo central evaluar el papel de estas dos vías de señalización, en la producción y en el carácter procoagulante de VEm/g endoteliales, inducidas por aAFL de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas del SAF. Con esta finalidad fue propuesto en un principio:

1. Establecer la función de las proteínas p38MAPK y MEK1/2, en la producción *in vitro* de VEm/g endoteliales, inducidas por aAFL de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas del SAF.
2. Determinar la relación entre la actividad de p38MAPK, MEK1/2, y el potencial procoagulante de las VEm/g, obtenidas de células endoteliales estimuladas con aAFL de diferentes grupos de pacientes con SAF.
3. Evaluar el efecto modulador de los medicamentos heparina, aspirina e hidroxiclороquina, sobre la producción de VEm/g y su potencial procoagulante.

Sin embargo, entendiendo que la activación del coágulo en plasma recalcificado es el resultado de la interacción compleja entre diferentes moléculas y estructuras, donde probablemente los anticuerpos con actividad tipo AL también podrían influir, nos planteamos adicionalmente:

4. Describir cómo la interacción entre plasma recalcificado, vesículas extracelulares liberadas a causa del estímulo con anticuerpos antifosfolípidos, y los mismos autoanticuerpos que inducen y condicionan su liberación, influye en la activación del coágulo *in vitro*.

Anexo 1: Microparticles: an alternative explanation to the behavior of vascular antiphospholipid syndrome

Álvarez D. BSN; Rúa C. BS, MSc; Cadavid J. AP. MD, MSc, DSc.

Abstract

Antiphospholipid syndrome is an autoimmune disease characterized by the persistent presence of antiphospholipid antibodies, along with occurrence of vascular thrombosis and pregnancy morbidity. The variety of antiphospholipid antibodies and their related mechanisms, as well as the behavior of disease in wide groups of patients, have led some authors to propose a differentiation of this syndrome into two independent entities: vascular and obstetric antiphospholipid syndrome. Thus, previous studies have discussed whether specific autoantibodies may be responsible for this differentiation or, in contrast, how the same antibodies are able to generate two different clinical presentations. This discussion is yet to be settled. The capability of serum IgG from patients with vascular thrombosis to trigger the biogenesis of endothelial cell-derived microparticles in vitro is one of the previously discussed differences between the clinical entities of antiphospholipid syndrome. These vesicles constitute a prothrombotic mechanism as they can directly lead to clot activation in murine models and recalcified human plasma. Nevertheless, other indirect mechanisms by which microparticles can spread a procoagulant phenotype could be critical to understanding their role in antiphospholipid syndrome. For this reason, questions regarding the cargo of microparticles, and the signaling pathways involved in their biogenesis, are of interest in attempting to explain the behavior of this autoimmune disease.

Keywords

Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, cell-derived microparticles, thrombosis, blood coagulation disorders.

Published in Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2021

Capítulo 2: Trabajo experimental – Actividad de coagulación de vesículas extracelulares liberadas ante el estímulo con anticuerpos antifosfolípidos

Anexo 2: Extracellular vesicles released upon antiphospholipid antibody stimulus: an actual direct procoagulant mechanism or a new factor in the lupus anticoagulant paradox?

Álvarez D, BSN; Rúa C. BS, MSc; Velásquez-Berrío M. BS, MSc; Cataño J.U. MD; Escudero C. MD, PhD; Cadavid J. A.P. MD, MSc, DSc.

Abstract

Antiphospholipid antibodies (aPL) lead to a hypercoagulable state *in vivo*. Paradoxically, some of these autoantibodies perform as inhibitors of the coagulation cascade *in vitro* (a phenomenon referred to as “lupus anticoagulant”). The presence of lupus anticoagulant has been related to an increased quantity of plasma extracellular vesicles, which may constitute a direct procoagulant mechanism in antiphospholipid syndrome. This study investigates whether endothelial cell-derived extracellular vesicles released upon stimulation with aPL (aPL-EDEVs) are related or not to a higher direct coagulation activity. Using an *in vitro* model of endothelium, flow cytometry and a recalcified plasma-based assay, we found that the coagulation activity of aPL-EDEVs is mainly conditioned by the lupus anticoagulant-like activity of autoantibodies. Nevertheless, in the presence of $\beta 2$ glycoprotein I, a cofactor of aPL during the stimulation of endothelial cells, the coagulation activity of EDEVs is restored in a mitogen-activated protein kinase kinases 1 and 2 (MEK1/2)-dependent manner. This phenomenon was especially evident when using immunoglobulins G from patients with vascular and obstetric primary antiphospholipid syndrome who manifest refractoriness to treatment. Our findings suggest that the role of aPL-EDEVs in the antiphospholipid syndrome-related hypercoagulable state may not rely on their capacity to enhance clotting directly. Although $\beta 2$ glycoprotein I performs as an aPL procoagulant cofactor and restores the coagulation activity of extracellular vesicles via MEK1/2 pathway, proportionally, autoantibodies interact with aPL-EDEVs and exhaust their coagulation properties. Further analysis is required to establish whether lupus anticoagulant-like autoantibodies opsonise extracellular vesicles and whether opsonised vesicles may lead to thrombosis by indirect means.

Keywords

Antiphospholipid antibodies, cell-derived extracellular vesicles, lupus coagulation inhibitor, thrombosis, mitogen-activated protein kinase kinases.

Capítulo 3: Conclusiones y perspectivas – Un nuevo abordaje de la paradoja del anticoagulante lúpico

Una discusión amplia de los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental se puede encontrar en la última sección del anexo 2. A continuación, realizamos un resumen basado en puntos relevantes y expandimos cuestiones asociadas a las perspectivas (Figura 3).

- El SAF es una trombofilia adquirida caracterizada por la presencia de aAFL⁴. Los aAFL son un grupo amplio y heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos contra fosfolípidos aniónicos¹, proteínas de unión a fosfolípidos, o complejos proteína/fosfolípido^{1,2}. Aunque se sabe que los aAFL son los causantes directos de trombosis vascular en el SAF⁵, se desconoce la especificidad antigénica exacta de los autoanticuerpos que conducen a la enfermedad.
- Algunos aAFL comparten la capacidad funcional de prolongar los tiempos de coagulación *in vitro*, comportándose como inhibidores de reacciones de la cascada de la coagulación que dependen de fosfolípidos aniónicos como cofactor (AL)^{95,110}. Con unas pocas excepciones, hasta ahora se ha entendido que la capacidad anticoagulante de los aAFL carece de relevancia clínica⁹⁴.
- Múltiples mecanismos moleculares se han descrito *in vitro* para intentar explicar las propiedades protrombóticas de los aAFL *in vivo*. Brevemente, se sabe que estos autoanticuerpos interactúan con proteínas plasmáticas y de superficie, e inhiben sus funciones anticoagulantes^{91,92,111}. También es conocida la capacidad de algunos aAFL (bien sean IgG policlonales de pacientes con SAF o anticuerpos monoclonales) para inducir un estado procoagulante y proinflamatorio en monocitos¹⁰⁰, plaquetas²⁷ y células endoteliales¹⁰⁴.
- La activación del endotelio mediada por aAFL incluye la liberación de VEm/g. De hecho, diferentes autores han descrito que individuos positivos para aAFL (y en especial, positivos para AL), tienen una mayor cantidad de VEm/g de origen endotelial en plasma⁹. Dada su composición lipídica y su capacidad para portar proteínas como el FT, las VEm/g son agentes procoagulantes. En contextos no relacionados con aAFL, el riesgo de trombosis aumenta proporcionalmente a la cantidad de VEm/g en plasma¹².
- A pesar del carácter procoagulante de las VEm/g y de la cantidad aumentada de VEm/g en portadores de aAFL, cuando se ha medido la actividad de coagulación de las VEm/g derivadas de individuos positivos para aAFL, se ha fallado en encontrar una mayor

actividad tipo factor tisular¹⁹ o una mayor disponibilidad de fosfatidilserina para la formación de complejos protrombinasa¹⁸.

- Nuestros resultados muestran que, en la interacción compleja entre plasma, VEm/g endoteliales liberadas a causa del estímulo con aAFL, y los mismos autoanticuerpos que condicionan la liberación de las VEm/g, prevalece un efecto anticoagulante. Este efecto anticoagulante: 1) no puede ser explicado por una menor cantidad de VEm/g en los sobrenadantes enriquecidos, 2) es ejercido directamente por los aAFL sobre las VEm/g, y 3) presenta una relación positiva y estadísticamente significativa con los valores medios de dRVVT. Lo anterior nos conduce a sugerir que la actividad de coagulación de las VEm/g endoteliales liberadas a causa del estímulo con aAFL se encuentra condicionada por la actividad tipo AL de los autoanticuerpos. La especificidad antigénica y los mecanismos de los anticuerpos que conducen al efecto AL no se conoce con certeza, aunque trabajos recientes de otros autores apuntan a la formación de complejos inmunes entre anticuerpos, antígenos y superficies de fosfolípidos aniónicos⁹³.
- La β 2GPI es una proteína plasmática con motivos de unión a fosfolípidos aniónicos¹¹². Entre otras funciones, en un contexto fisiológico, se ha atribuido a esta proteína la capacidad de marcar VEs facilitando su reconocimiento y posterior depuración por fagocitos¹¹³. Por su parte, en el contexto del SAF, la β 2GPI ha mostrado ser un cofactor necesario para el desencadenamiento de muchos de los mecanismos patogénicos de los aAFL, dentro de los cuales se incluye la disfunción endotelial¹⁰³. Durante nuestro trabajo experimental identificamos que la β 2GPI, como cofactor utilizado durante la estimulación de las células endoteliales, conduce a la recuperación de la actividad de coagulación de las VEm/g, hasta entonces amortiguada por la actividad tipo AL de los autoanticuerpos. Para todos los grupos de IgG, la recuperación dependiente de β 2GPI fue proporcional a la actividad tipo AL. Además, al inhibir la vía de MEK1/2, el efecto procoagulante de la β 2GPI fue suspendido (este mismo resultado no ocurre al inhibir p38MAPK).
- El efecto procoagulante de la β 2GPI podría explicarse bien por un incremento en la cantidad de VEm/g liberadas, lo que generaría un exceso de fosfolípidos aniónicos capaz de neutralizar el AL; o bien por modificaciones en los cargos procoagulantes/anticoagulantes de las VEm/g liberadas. Nosotros no detectamos cambios estadísticamente significativos en el conteo de VEm/g al usar β 2GPI o al inhibir MEK1/2.
- Finalmente, el estímulo de células endoteliales con aAFL en presencia de β 2GPI (como ocurriría *in vivo*) es suficiente para suspender, más no para sobrepasar, el efecto AL que

los aAFL ejercen directamente sobre las VEm/g endoteliales. Este hallazgo podría contribuir a explicar por qué el efecto anticoagulante de algunos aAFL no es relevante *in vivo*, pero también, por qué las VEm/g en presencia de aAFL no representan un factor procoagulante directo.

¿Cómo nuestras conclusiones podrían aportar a una mejor comprensión del efecto de los aAFL? Recientemente, esfuerzos se han llevado a cabo en la búsqueda de los aAFL específicos responsables de las manifestaciones vasculares del SAF. Si bien resultados promisorios se han obtenido al evaluar anticuerpos a β 2GPI dirigidos contra el dominio I (a β 2GPI-DI)², y anticuerpos dirigidos contra el complejo protrombina/fosfatidilserina (aPT/PS)^{114,115}, la evidencia sugiere que más de un autoanticuerpo debe ser responsable de la enfermedad. En este sentido, la evaluación de características funcionales que logren agrupar los aAFL con capacidad protrombótica podría ser más útil que la búsqueda de autoanticuerpos específicos.

Lo anterior resulta congruente con la utilización del AL como prueba diagnóstica. Aunque la detección del AL es la prueba más antigua en el diagnóstico del SAF, y refleja una capacidad funcional que contradice, paradójicamente, el significado clínico de la presencia de aAFL, sigue siendo un mejor predictor de trombosis que la evaluación aislada de cualquiera de los otros aAFL utilizados hasta el momento para el diagnóstico de la enfermedad^{87,88}. En otras palabras, dentro del amplio grupo de los aAFL, aquellos con propiedades anticoagulantes *in vitro* constituyen un factor de riesgo independiente para un primer episodio de trombosis.

A pesar de su importancia, las pruebas que permiten la detección del AL enfrentan retos relevantes en la actualidad. El uso de anticoagulantes orales antagonistas de vitamina K, centro de la terapéutica del SAF vascular, obliga a la implementación de técnicas modificadas con sensibilidad reducida^{3,97}. Más aún, anticoagulantes orales inhibidores directos de factores de la cascada de la coagulación se comportan como falsos positivos en esta prueba⁹⁸. Así, encontrar nuevas características funcionales que compartan anticuerpos tipo AL, puede ser clave para la comprensión, el diagnóstico y el pronóstico del SAF.

Otros autores han sugerido recientemente que anticuerpos a β 2GPI podrían opsonizar la β 2GPI unida a las VEm/g¹⁰⁹. Aquí planteamos como una nueva hipótesis que los anticuerpos AL comparten como capacidad funcional la opsonización de VEm/g endoteliales. Nuevas investigaciones son necesarias para establecer si esta hipótesis es correcta, y si las VEm/g opsonizadas pueden conducir a trombosis por medios indirectos, probablemente, a través de su interacción con fagocitos (como se ha mostrado en otros contextos)^{116,117}, y las mismas células endoteliales¹¹⁸.

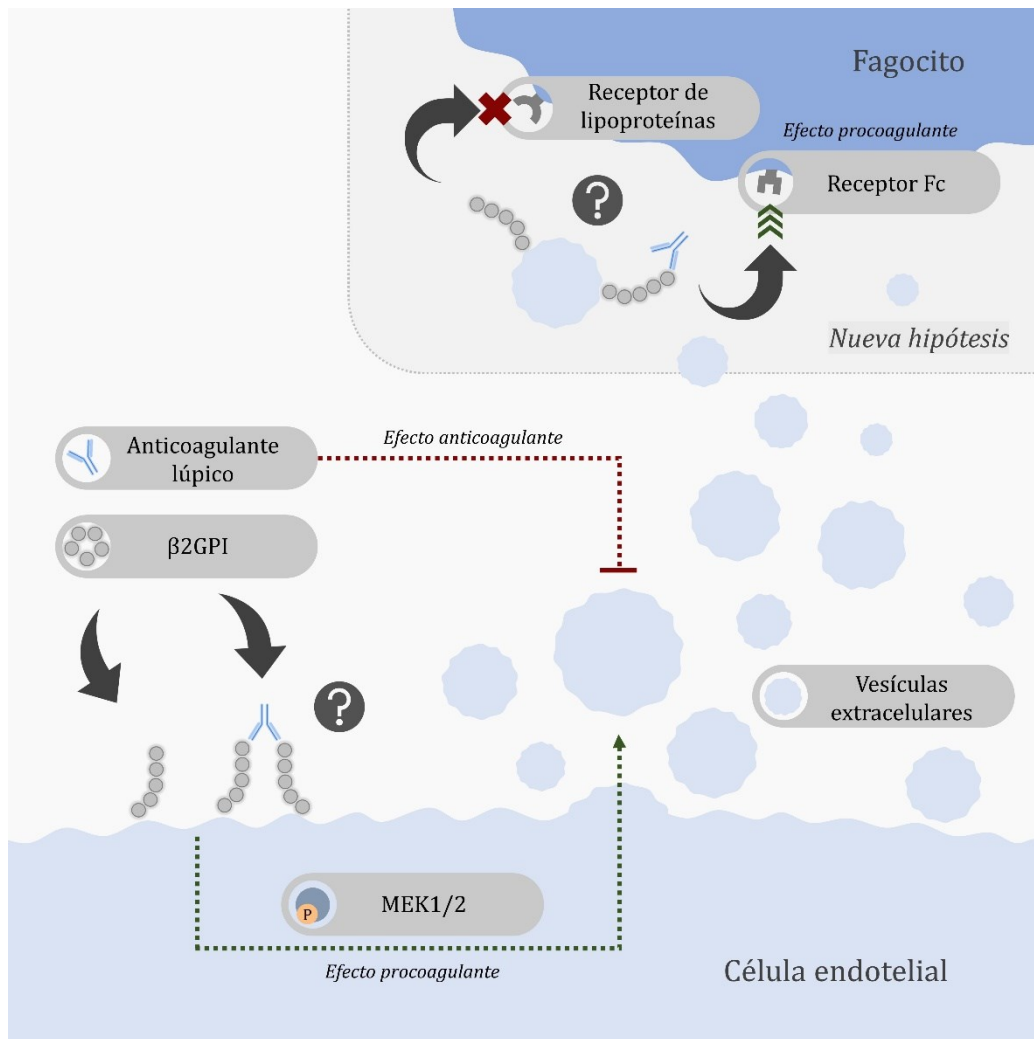


Figura 3. Modelo propuesto y representación gráfica de la hipótesis resultante. La actividad de coagulación de las vesículas extracelulares medianas y grandes liberadas a causa del estímulo con anticuerpos antifosfolípidos se encuentra condicionada por la actividad tipo anticoagulante lúpico de los mismos autoanticuerpos. No obstante, al utilizar la β 2-glicoproteína-I como cofactor de los anticuerpos durante el estímulo de las células endoteliales, se reestablece la actividad de coagulación de las vesículas proporcionalmente y en una manera dependiente de la vía de las proteínas quinasas quinasas activadas por mitógenos de especificidad dual 1 y 2 (MEK1/2). Nuestros resultados y los de otros autores nos llevan a sugerir que, probablemente, los anticuerpos tipo anticoagulante lúpico forman complejos inmunes con las vesículas extracelulares medianas y grandes de origen endotelial. Estos complejos podrían conducir a trombosis por medios indirectos, a través de su interacción con otras células como fagocitos. Así, las vesículas extracelulares en complejo con anticuerpos antifosfolípidos no serían depuradas a través de su reconocimiento por receptores de lipoproteínas como normalmente ocurre, sino a través de vías mediadas por receptores Fc que conducirían a una respuesta proinflamatoria y procoagulante en el fagocito. β 2GPI, β 2 glicoproteína I; MEK1/2, proteínas quinasas quinasas activadas por mitógenos de especificidad dual 1 y 2; Fc, fracción cristalizante.

Referencias

1. von Landenberg C, Lackner KJ, von Landenberg P, Lang B, Schmitz G. Isolation and characterization of two human monoclonal anti-phospholipid IgG from patients with autoimmune disease. *J Autoimmun.* 1999;13(2):215-223. doi:10.1006/jaut.1999.0316
2. Durigutto P, Grossi C, Borghi MO, et al. New insight into antiphospholipid syndrome: Antibodies to β 2glycoprotein i-domain 5 fail to induce thrombi in rats. *Haematologica.* 2019;104(4):819-826. doi:10.3324/haematol.2018.198119
3. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(2):163-171. doi:10.1055/s-0033-1364185
4. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295-306. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x
5. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, et al. Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005;106(7):2340-2346. doi:10.1182/blood-2005-03-1319
6. Girardi G, Berman J, Redecha P, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1644-1654. Accessed May 5, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14660741/>
7. Pericleous C, Clarke LA, Brogan PA, et al. Endothelial microparticle release is stimulated in vitro by purified IgG from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2013;109(1):72-78. doi:10.1160/TH12-05-0346
8. Vikerfors A, Mobarrez F, Bremme K, et al. Studies of microparticles in patients with the antiphospholipid syndrome (APS). In: *Lupus.* Vol 21. *Lupus*; 2012:802-805. doi:10.1177/0961203312437809
9. Chaturvedi S, Cockrell E, Espinola R, et al. Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: Characterization and associations. *Thromb Res.* 2015;135(1):102-108. doi:10.1016/j.thromres.2014.11.011
10. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166(1):189-197. doi:10.1016/S0021-9258(17)34997-9
11. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269-288. doi:10.1111/J.1365-2141.1967.TB08741.X
12. Bucciarelli P, Martinelli I, Artoni A, et al. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2012;129(5):591-597. doi:10.1016/j.thromres.2011.08.020
13. Zong Y, Pruner I, Antovic A, et al. Phosphatidylserine positive microparticles improve hemostasis in in-vitro hemophilia A plasma models. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-10. doi:10.1038/s41598-020-64686-x
14. Thomas GM, Brill A, Mezouar S, et al. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2015;13(7):1310-1319. doi:10.1111/jth.13002

15. Su Y, Deng X, Ma R, Dong Z, Wang F, Shi J. The exposure of phosphatidylserine influences procoagulant activity in retinal vein occlusion by microparticles, blood cells, and endothelium. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/3658476
16. Nielsen CT, Østergaard O, Johnsen C, Jacobsen S, Heegaard NHH. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011;63(10):3067-3077. doi:10.1002/ART.30499
17. Pericleous C, Giles I, Rahman A. Are endothelial microparticles potential markers of vascular dysfunction in the antiphospholipid syndrome? *Lupus*. 2009;18(8):671-675. doi:10.1177/0961203309103062
18. Breen KA, Sanchez K, Kirkman N, et al. Endothelial and platelet microparticles in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Res*. 2015;135(2):368-374. doi:10.1016/j.thromres.2014.11.027
19. Hell L, Ay C, Posch F, et al. Low extracellular vesicle-associated tissue factor activity in patients with persistent lupus anticoagulant and a history of thrombosis. *Ann Hematol*. 2019;98(2):313-319. doi:10.1007/s00277-018-3544-x
20. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(10):1296-1304. doi:10.1136/ANNRHEUMDIS-2019-215213
21. Vega LB, Fresnedo GF, Ventura JI, et al. Non-Criteria Antiphospholipid Antibodies: Risk Factors for Endothelial Dysfunction in Women with Pre-Eclampsia. *Life*. 2020;10(10):1-16. doi:10.3390/LIFE10100241
22. Žigon P, Podovšovnik A, Ambrožič A, et al. Added value of non-criteria antiphospholipid antibodies for antiphospholipid syndrome: lessons learned from year-long routine measurements. *Clin Rheumatol*. 2019;38(2):371-378. doi:10.1007/S10067-018-4251-7
23. Mekinian A, Bourrienne M, Carbillon L, et al. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: Prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46(2):232-237. doi:10.1016/J.SEMARTHTRIT.2016.05.006
24. Zohoury N, Bertolaccini ML, Rodriguez-Garcia JL, et al. Closing the Serological Gap in the Antiphospholipid Syndrome: The Value of “Non-criteria” Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol*. 2017;44(11):1597-1602. doi:10.3899/JRHEUM.170044
25. Rodríguez-García V, Ioannou Y, Fernández-Nebro A, Isenberg DA, Giles IP. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(11):2042-2050. doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEV226
26. 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(7):433-440. doi:10.1038/S41584-018-0032-6
27. Hollerbach A, Müller-Calleja N, Ritter S, et al. Platelet Activation by Antiphospholipid Antibodies Depends on Epitope Specificity and is Prevented by mTOR Inhibitors. *Thromb Haemost*. 2019;119(7):1147-1153. doi:10.1055/s-0039-1685453
28. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Häuser F, Canisius A, Orning C, Lackner KJ. Antiphospholipid antibody-induced cellular responses depend on epitope specificity:

- implications for treatment of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2017;15(12):2367-2376. doi:10.1111/JTH.13865
29. Poulton K, Ripoll VM, Pericleous C, et al. Purified IgG from patients with obstetric but not IgG from non-obstetric antiphospholipid syndrome inhibit trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(5):390-401. doi:10.1111/aji.12341
 30. Lambrianides A, Carroll CJ, Pierangeli SS, et al. Effects of Polyclonal IgG Derived from Patients with Different Clinical Types of the Antiphospholipid Syndrome on Monocyte Signaling Pathways. *J Immunol.* 2010;184(12):6622-6628. doi:10.4049/jimmunol.0902765
 31. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell vesicles.* 2018;7(1). doi:10.1080/20013078.2018.1535750
 32. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(8):E968-E977. doi:10.1073/pnas.1521230113
 33. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596
 34. Barry OP, Kazanietz MG, Praticò D, FitzGerald GA. Arachidonic Acid in Platelet Microparticles Up-regulates Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin Formation via a Protein Kinase C/Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway. *J Biol Chem.* 1999;274(11):7545-7556. doi:10.1074/JBC.274.11.7545
 35. Fullwood NJ, Lawlor AJ, Martin-Hirsch PL, Matanhelia SS, Martin FL. An analysis of benign human prostate offers insights into the mechanism of apocrine secretion and the origin of prostasomes. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/S41598-019-40820-2
 36. Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res.* 1982;10(5):253-257. doi:10.1007/BF00255932
 37. Andrews RE, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4: interaction with constitutive nitric oxide synthases in human sperm and prostasomes which carry Ca²⁺/CaM-dependent serine kinase. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(11):832-843. doi:10.1093/MOLEHR/GAV049
 38. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;183(3):1161-1172. doi:10.1084/JEM.183.3.1161
 39. Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* 2002;3(12):1156-1162. doi:10.1038/NI854
 40. Nikfarjam S, Rezaie J, Kashanchi F, Jafari R. Dexosomes as a cell-free vaccine for cancer immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1). doi:10.1186/S13046-020-01781-X
 41. Denzer K, Eijk M van, Kleijmeer MJ, Jakobson E, De Groot C, Geuze HJ. Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *J Immunol.* 2000;165(3):1259-1265. doi:10.4049/JIMMUNOL.165.3.1259
 42. Ettelaie C, Elkeeb A, Maraveyas A, Collier M. p38 α phosphorylates serine 258 within the

- cytoplasmic domain of tissue factor and prevents its incorporation into cell-derived microparticles. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(3):613-621. doi:10.1016/J.BBAMCR.2012.11.010
43. Koifman N, Biran I, Aharon A, Brenner B, Talmon Y. A direct-imaging cryo-EM study of shedding extracellular vesicles from leukemic monocytes. *J Struct Biol*. 2017;198(3):177-185. doi:10.1016/j.jsb.2017.02.004
 44. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-383. doi:10.1083/JCB.201211138
 45. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. <https://doi.org/10.3402/jev.v427066>. 2015;4(2015):1-60. doi:10.3402/JEV.V4.27066
 46. Pan B, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone R. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985;101(3):942-948. doi:10.1083/JCB.101.3.942
 47. Colombo M, Moita C, Van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 24):5553-5565. doi:10.1242/JCS.128868
 48. Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*. 2005;6(2):131-143. doi:10.1111/J.1600-0854.2004.00257.X
 49. Wei D, Zhan W, Gao Y, et al. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Res*. 2021;31(2):157-177. doi:10.1038/S41422-020-00409-1
 50. Pasquet J, Dachary-Prigent J, Nurden A. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem*. 1996;239(3):647-654. doi:10.1111/J.1432-1033.1996.0647U.X
 51. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*. 2010;468(7325):834-840. doi:10.1038/NATURE09583
 52. Fujii T, Sakata A, Nishimura S, Eto K, Nagata S. TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(41):12800-12805. doi:10.1073/PNAS.1516594112
 53. Öhlinger T, Müllner EW, Fritz M, et al. Lysophosphatidic acid-induced pro-thrombotic phosphatidylserine exposure and ionophore-induced microvesiculation is mediated by the scramblase TMEM16F in erythrocytes. *Blood Cells Mol Dis*. 2020;83. doi:10.1016/J.BCMD.2020.102426
 54. Giannella A, Ceolotto G, Radu CM, et al. PAR-4/Ca²⁺-calpain pathway activation stimulates platelet-derived microparticles in hyperglycemic type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20(1). doi:10.1186/S12933-021-01267-W
 55. Pasquet JM, Toti F, Nurden AT, Dachary-Prigent J. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb Res*. 1996;82(6):509-522. doi:10.1016/0049-3848(96)00101-6
 56. Bianco F, Perrotta C, Novellino L, et al. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J*. 2009;28(8):1043-1054. doi:10.1038/EMBOJ.2009.45

57. Thyagarajan A, Kadam S, Liu L, et al. Gemcitabine Induces Microvesicle Particle Release in a Platelet-Activating Factor-Receptor-Dependent Manner via Modulation of the MAPK Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;20(1). doi:10.3390/IJMS20010032
58. Das K, Prasad R, Singh A, et al. Protease-activated receptor 2 promotes actomyosin dependent transforming microvesicles generation from human breast cancer. *Mol Carcinog.* 2018;57(12):1707-1722. doi:10.1002/MC.22891
59. Curtis A, Wilkinson P, Gui M, Gales T, Hu E, Edelberg J. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost.* 2009;7(4):701-709. doi:10.1111/J.1538-7836.2009.03304.X
60. Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor–stromal interactions. *Oncogene* 2004 234. 2004;23(4):956-963. doi:10.1038/sj.onc.1207070
61. Betapudi V, Lominadze G, Hsi L, Willard B, Wu M, McCrae KR. Anti- β 2GPI antibodies stimulate endothelial cell microparticle release via a nonmuscle myosin II motor protein-dependent pathway. *Blood.* 2013;122(23):3808-3817. doi:10.1182/blood-2013-03-490318
62. Lippi G, Adcock D, Favaloro EJ. Understanding the “philosophy” of laboratory hemostasis. *Diagnosis (Berlin, Ger.* 2019;6(3):223-226. doi:10.1515/DX-2018-0099
63. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science.* 1964;145(3638):1310-1312. doi:10.1126/SCIENCE.145.3638.1310
64. Winter W, Flax S, Harris N. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med.* 2017;48(4):295-313. doi:10.1093/LABMED/LMX050
65. Key NS, Geng JG, Bach RR. Tissue factor; from Morawitz to microparticles. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007;118:165-173. Accessed December 16, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18528500/>
66. Zhu D. Mathematical modeling of blood coagulation cascade: kinetics of intrinsic and extrinsic pathways in normal and deficient conditions. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007;18(7):637-646. doi:10.1097/MBC.0B013E3282A167BB
67. Castillo MM, Yang Q, Solis-Sigala A, et al. The endothelial protein C receptor plays an essential role in the maintenance of pregnancy. *Sci Adv.* 2020;6(45). doi:10.1126/SCIADV.ABB6196
68. Brünnert D, Kumar V, Kaushik V, et al. Thrombin impairs the angiogenic activity of extravillous trophoblast cells via monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1): A possible link with preeclampsia. *Reprod Biol.* 2021;21(3). doi:10.1016/J.REPBIO.2021.100516
69. Misenheimer TM, Kumfer KT, Bates BE, Nettesheim ER, Schwartz BS. A candidate activation pathway for coagulation factor VII. *Biochem J.* 2019;476(19):2909-2926. doi:10.1042/BCJ20190595
70. Wildgoose P, Nemerson Y, Hansen LL, Nielsen FE, Glazer S, Hedner U. Measurement of Basal Levels of Factor VIIa in Hemophilia A and B Patients. *Blood.* 1992;80(1):25-28. doi:10.1182/BLOOD.V80.1.25.25
71. Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest.* 1978;61(6):1528. doi:10.1172/JCI1109073

72. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5260-5264. doi:10.1073/PNAS.74.12.5260
73. Bom VJJ, Bertina RM. The contributions of Ca²⁺, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem J*. 1990;265(2):327. doi:10.1042/BJ2650327
74. Sen P, Neuenschwander PF, Pendurthi UR, Rao LVM. Analysis of factor VIIa binding to relipidated tissue factor by surface plasmon resonance. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010;21(4):376. doi:10.1097/MBC.0B013E328333B084
75. Kothari H, Pendurthi UR, Rao LVM. Analysis of tissue factor expression in various cell model systems: cryptic vs. active. *J Thromb Haemost*. 2013;11(7):1353-1363. doi:10.1111/JTH.12272
76. Østerud B, Breimo ES, Olsen JO. Blood borne tissue factor revisited. *Thromb Res*. 2008;122(3):432-434. doi:10.1016/J.THROMRES.2007.10.006
77. Muller M, Wang Y, Morrissey J, Tajkhorshid E. Lipid specificity of the membrane binding domain of coagulation factor X. *J Thromb Haemost*. 2017;15(10):2005-2016. doi:10.1111/JTH.13788
78. Neuenschwander PF, Morrissey JH. Roles of the membrane-interactive regions of factor VIIa and tissue factor. The factor VIIa Gla domain is dispensable for binding to tissue factor but important for activation of factor X. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8007-8013. doi:10.1016/S0021-9258(17)37152-1
79. Kovalenko T, Panteleev M, Sveshnikova A. Substrate delivery mechanism and the role of membrane curvature in factor X activation by extrinsic tenase. *J Theor Biol*. 2017;435:125-133. doi:10.1016/J.JTBI.2017.09.015
80. Hathcock J, Rusinova E, Gentry R, Andree H, Nemerson Y. Phospholipid regulates the activation of factor X by tissue factor/factor VIIa (TF/VIIa) via substrate and product interactions. *Biochemistry*. 2005;44(22):8187-8197. doi:10.1021/BI050338B
81. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JWP, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem*. 1980;255(1):274-283. doi:10.1016/S0021-9258(19)86294-4
82. Conley C, Hartmann R. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1952;31:621-622. Accessed March 31, 2021. <https://www.scienceopen.com/document?vid=257b0345-8f00-414c-967f-53c5fb572885>
83. Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, Elkon KB, Loizou S, Hughes GR. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: Striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J*. 1983;287(6398):1021-1023. doi:10.1136/bmj.287.6398.1021
84. Bowie EJW, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med*. 1963;62(3):416-430. doi:10.5555/uri:pii:0022214363900416
85. Schleider MA, Nachman RL, Jaffe EA, Coleman M. A clinical study of the lupus anticoagulant. *Blood*. 1976;48(4):499-509. doi:10.1182/blood.v48.4.499.499
86. Harris EN, Boey ML, Mackworth-Young CG, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by

- radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1983;322(8361):1211-1214. doi:10.1016/S0140-6736(83)91267-9
87. Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: A prospective multicentre follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):1083-1086. doi:10.1136/ard.2010.142042
 88. Tonello M, Calligaro A, Favaro M, et al. The first thrombotic event in purely obstetric antiphospholipid syndrome patients and in antiphospholipid antibody carriers: comparison of incidence and characteristics. *Arch Gynecol Obstet*. 2021;303(2):455-461. doi:10.1007/s00404-020-05766-1
 89. Prinz N, Clemens N, Strand D, et al. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2011;118(8):2322-2332. doi:10.1182/blood-2011-01-330639
 90. De Laat B, Eckmann CM, Van Schagen M, Meijer AB, Mertens K, Van Mourik JA. Correlation between the potency of a beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant and the level of resistance to activated protein C. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19(8):757-764. doi:10.1097/MBC.0b013e32830f1b85
 91. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, et al. Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: Evidence from atomic force microscopy and functional assay. *Am J Pathol*. 2003;163(3):1193-1200. doi:10.1016/S0002-9440(10)63479-7
 92. Bu C, Gao L, Xie W, et al. β 2-glycoprotein I is a cofactor for tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation. *Arthritis Rheum*. 2009;60(2):559-568. doi:10.1002/art.24262
 93. Noordermeer T, Molhoek JE, Schutgens REG, et al. Anti- β 2-glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies cause lupus anticoagulant through different mechanisms of action. *J Thromb Haemost*. 2021;19(4):1018-1028. doi:10.1111/jth.15241
 94. Ieko M, Yoshida M, Naito S, Ohmura K, Takahashi N. Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome and similar diseases: experiences at a single center in Japan. *Int J Hematol*. 2019;110(2):197-204. doi:10.1007/S12185-019-02674-2
 95. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1737-1740. doi:10.1111/J.1538-7836.2009.03555.X
 96. Takeda S, Igarashi T, Mori H. Crystal structure of RVV-X: an example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. *FEBS Lett*. 2007;581(30):5859-5864. doi:10.1016/J.FEBSLET.2007.11.062
 97. Moore GW. Mixing studies for lupus anticoagulant: Mostly no, sometimes yes. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(4):492-495. doi:10.1515/CCLM-2019-1248/PDF
 98. Murer LM, Pirruccello SJ, Koepsell SA. Rivaroxaban Therapy, False-Positive Lupus Anticoagulant Screening Results, and Confirmatory Assay Results. *Lab Med*. 2016;47(4):275-278. doi:10.1093/LABMED/LMW029
 99. Wang M, Kong X, Xie Y, He C, Wang T, Zhou H. Role of TLR-4 in anti- β 2-glycoprotein I-induced activation of peritoneal macrophages and vascular endothelial cells in mice. *Mol*

Med Rep. 2019;19(5):4353. doi:10.3892/MMR.2019.10084

100. Prinz N, Clemens N, Canisius A, Lackner KJ. Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and endothelial cells. Lessons from the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2013;109(3):525-531. doi:10.1160/TH12-06-0421
101. Allen KL, Fonseca F V., Betapudi V, Willard B, Zhang J, McCrae KR. A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Blood.* 2012;119(3):884-893. doi:10.1182/blood-2011-03-344671
102. Canaud G, Bienaimé F, Tabarin F, et al. Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2014;371(4):303-312. doi:10.1056/NEJMOA1312890
103. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2. *J Clin Invest.* 2011;121(1):120-131. doi:10.1172/JCI39828
104. Miranda S, Billoir P, Damian L, 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(3). doi:10.1371/journal.pone.0212614
105. Dignant-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: A potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2004;91(4):667-673. doi:10.1160/th03-07-0487
106. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *Jour1 Combes V al J Clin Invest 1999;104(1).nal Clin Investig.* 1999;104(1):93-102. doi:10.1172/JCI4985
107. López-Pedrerera C, Buendía P, Cuadrado MJ, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):301-311. doi:10.1002/ART.21549
108. Vega-Ostertag M, Ferrara D, Romay-Penabad Z, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost.* 2007;5(9):1828-1834. doi:10.1111/J.1538-7836.2007.02680.X
109. Mobarrez F, Gunnarsson I, Svenungsson E. Altered β 2-glycoprotein I expression on microparticles in the presence of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost.* 2017;15(9):1799-1806. doi:10.1111/jth.13765
110. Galli M, Béguin S, Lindhout T, Hemker CH. Inhibition of phospholipid and platelet-dependent prothrombinase activity in the plasma of patients with lupus anticoagulants. *Br J Haematol.* 1989;72(4):549-555. doi:10.1111/j.1365-2141.1989.tb04322.x
111. Shibata S, Harpel P, Gharavi A, Rand J, Fillit H. Autoantibodies to Heparin From Patients With Antiphospholipid Antibody Syndrome Inhibit Formation of Antithrombin III-Thrombin Complexes. *Blood.* 1994;83(9):2532-2540. doi:10.1182/BLOOD.V83.9.2532.2532
112. Bevers EM, Janssen MP, Comfurius P, et al. Quantitative determination of the binding of β 2- glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets.

Biochem J. 2005;386(2):271-279. doi:10.1042/BJ20041167

113. Balasubramanian K, Schroit AJ. Characterization of phosphatidylserine-dependent beta2-glycoprotein I macrophage interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(44):29272-29277. doi:10.1074/JBC.273.44.29272
114. Núñez-Álvarez CA, Hernández-Molina G, Bermúdez-Bermejo P, et al. Prevalence and associations of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies with clinical phenotypes in patients with primary antiphospholipid syndrome: aPS/PT antibodies in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2019;174:141-147. doi:10.1016/J.THROMRES.2018.12.023
115. Cifù A, Domenis R, Pistis C, Curcio F, Fabris M. Anti- β 2-glycoprotein I and anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies exert similar pro-thrombotic effects in peripheral blood monocytes and endothelial cells. *Auto- Immun highlights.* 2019;10(1). doi:10.1186/S13317-019-0113-9
116. Burbano C, Villar-Vesga J, Orejuela J, et al. Potential Involvement of Platelet-Derived Microparticles and Microparticles Forming Immune Complexes during Monocyte Activation in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2018;9(MAR). doi:10.3389/FIMMU.2018.00322
117. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood.* 2002;99(11):3962-3970. doi:10.1182/BLOOD.V99.11.3962
118. Wu M, Barnard J, Kundu S, McCrae KR. A novel pathway of cellular activation mediated by antiphospholipid antibody-induced extracellular vesicles. *J Thromb Haemost.* 2015;13(10):1928-1940. doi:10.1111/jth.13072