

**DISRUPCIÓN HOMEOSTÁTICA ENDOTELIAL INDUCIDA POR LOS ANTICUERPOS
ANTIFOSFOLÍPIDOS: CAMBIOS EN EL POTENCIAL MITOCONDRIAL,
ACTIVACIÓN DE AUTOFAGIA Y mTOR COMO MECANISMOS REGULADORES.**

Carlos Mario Rodríguez Colorado, Odontólogo.

**Trabajo escrito en cumplimiento de los requisitos para la obtención del título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en inmunología.**

Tutora

Ángela Patricia Cadavid MD, MSc, Dr. Sci.

Cotutora

Ángela María Álvarez, QF, MSc, Dr. Sci.

Comité tutorial

Gloria María Vásquez, MD, Reumatóloga, Dr. Sci

Juan Camilo Calderón. MD, PhD

Juan Carlos Hernández, Microbiólogo, Dr. Sci

Universidad de Antioquia

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Reproducción

Medellín-Colombia

2019

PRESENTACIÓN

El Síndrome Antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune en la cual se presentan autoanticuerpos dirigidos contra fosfolípidos aniónicos de membrana celular, cuyos pacientes presentan manifestaciones clínicas como morbilidad gestacional y trombosis vascular.

En esta investigación se pretende describir algunos aspectos que ayuden a comprender los mecanismos fisiopatológicos del SAF, desde el punto de vista, inflamatorio y metabólico donde la autofagia está implícita, ya que a través de este mecanismo se regulan los aspectos anteriormente mencionados. También se ocupa de describir algunos puntos específicos de la señalización a través de la vía PI3K/Akt/mTOR en células endoteliales, la cual está involucrada en la proliferación y crecimiento celular. Además, se quiere aportar en el entendimiento de los mecanismos de acción de la aspirina, que es uno de los medicamentos utilizados en el manejo del SAF. Particularmente, se quiere hacer énfasis en las acciones de las lipoxinas inducidas por aspirina (ATL), y del efecto que estas tienen sobre las funciones celulares alteradas por los anticuerpos antifosfolípido (aAFL) en el contexto de la inducción de estrés celular e inflamación, las cuales podrían explicar algunas de las manifestaciones clínicas del SAF. De esta forma, se quiere aportar al esclarecimiento de la fisiopatología del SAF y a comprender los mecanismos de acción asociados a algunos de los tratamientos, empleados actualmente para su manejo.

Tabla de contenido

PRESENTACIÓN	2
1. RESUMEN.	6
1.1 INTRODUCCIÓN	10
1.2 Generalidades del Síndrome Antifosfolípido.	10
1.3 Fisiopatología del SAF.	12
1.4 Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR: implicaciones en el metabolismo celular e inmunidad.	14
1.4.1 mTOR como activador metabólico.	16
1.4.2 mTOR en inmunidad y autoinmunidad.	17
1.4.3 Activación de mTOR en SAF.	18
1.5 Mitocondria: papel regulador en homeostasis y disfunción en autoinmunidad. .	21
1.6 Autofagia: ¿un mecanismo regulador de la homeostasis celular que debe ser modulado?	22
1.6.1 Inflamación: ¿un mecanismo activador o inhibidor de a autofagia?	24
1.7 Lipoxinas inducidas por aspirina (ATL) como moduladoras de la respuesta inflamatoria.	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo General.	29
2.2 Objetivos específicos.	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
3.1 Población de estudio.	29
3.2 Obtención de las muestras de sangre.	31
3.3 Determinación de los anticuerpos antifosfolípidos aceptados en los criterios revisados de Sapporo.	31
3.4 Determinación de los anticuerpos antifosfolípidos no-criterio.	31
3.5 Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales de Venas de Cordón Umbilical Humano (HUVEC).	33
3.6 Determinación de la pureza de las células endoteliales.	34
3.7 Purificación de las IgG de los sueros de las mujeres de los grupos de estudio.	34
3.8 Verificación de la integridad de las IgG.	35
3.9 Determinación de marcadores de función mitocondrial, lisosomal y proliferación celular.	35

3.9.1 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial con DIOC-6 por citometría de flujo.	35
3.9.2 Evaluación de la acidificación lisosomal con LysoTracker Green por citometría de flujo.	36
3.9.3 Evaluación de la proliferación celular con Ki-67 e IP por citometría de flujo.	37
3.10 Determinación de marcadores moleculares de proliferación y autofagia.	37
3.10.1 Evaluación de expresión y fosforilación de S6 ribosomal.	37
3.10.2 Evaluación de expresión y fosforilación de ULK1.	39
3.10.3 Evaluación de la expresión de LC3 I-II.	39
3.11 Determinación de la producción de IL-8 e IL-1 β por las células endoteliales.	40
3.12 Análisis estadístico.	41
4. RESULTADOS.	41
4.1 Descripción de las características clínicas y de laboratorio de las pacientes incluidas en el estudio.	41
4.2 Verificación de la pureza y rendimiento de las células HUVEC.	43
4.3 Verificación de la integridad de las IgG policlonales obtenidas de los sueros de las pacientes incluidas en el estudio.	43
4.4 Acidificación lisosomal inducida por los aAFL en las células endoteliales.	45
4.5 Inducción de hiperpolarización mitocondrial por los aAFL sobre células endoteliales.	48
4.6 Los aAFL promueven la entrada al ciclo celular de las células endoteliales de la misma forma que lo hace la IgG del grupo MG.	51
4.7 Activación de mTOR inducida por los aAFL como un mecanismo inductor de proliferación celular.	54
4.8 La activación de ULK1 indica una inducción de eventos autofágicos tempranos generados por los aAFL.	56
4.9 Maduración de LC3 inducida por los aAFL como indicador de eventos autofágicos tardíos.	57
4.10 Efecto de los aAFL sobre la producción de IL-8 e IL-1 β en células endoteliales.	58
5. DISCUSIÓN.	60
5.1 Los aAFL generan disfunción endotelial mediante la disrupción de la homeostasis celular: papel de la mitocondria en la generación de estrés oxidativo y daño endotelial.	61
5.2 La autofagia como un mecanismo activado por el estrés celular.	64
5.3 Coexistencia de autofagia y actividad de mTOR como mecanismos de supervivencia celular.	65

5.4 Terapias emergentes en el SAF de acuerdo con los mecanismos activados por los aAFL. 69

6. CONCLUSIONES.....	71
AGRADECIMIENTOS Y FINANCIAMIENTO.....	75
Financiamiento.....	75
ANEXOS.....	76
.....	77
.....	78
.....	79
.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81

Índice de figuras.

Figura 1. Vía PI3k/Akt/mTOR y efectos sobre el metabolismo celular.....	16
Figura 2. Esquema de inducción de hiperplasia endotelial por los aAFL.....	20
Figura 3. Autofagia como mecanismo celular degradativo.....	24
Figura 4. Modelo celular de inducción de inflamación y trombosis por los aAFL.....	28
Figura 5. Verificación de la pureza de las células HUVEC.....	43
Figura 6. Verificación de la pureza e integridad de la IgG policlonal.....	44
Figura 7. Acidificación lisosomal inducida por los aAFL.....	45
Figura 8. Inducción de hiperpolarización mitocondrial por los aAFL en células endoteliales.....	48
Figura 9. Los aAFL promueven la entrada al ciclo celular de las células endoteliales de la misma forma que lo hace la IgG del grupo MG.....	52
Figura 10. Evaluación de la activación de mTOR, a través de la fosforilación de S6RP por los aAFL.....	55
Figura 11. Activación de ULK1 por los aAFL.....	56
Figura 12. Inducción de autofagia por los aAFL en células endoteliales.....	57
Figura 13. Efecto de los aAFL sobre la producción de citoquinas proinflamatorias.....	58
Figura 14. Modelo de la activación de autofagia y mTOR, inducido por estrés celular en células endoteliales por los aAFL.....	74

Índice de tablas.

Tabla 1. Análisis clínico y de laboratorio de las pacientes incluidas en el estudio.....	42
Tabla 2. Resumen de los efectos de los aAFL sobre células HUVEC.....	73

1. RESUMEN.

Disrupción homeostática endotelial inducida por los anticuerpos antifosfolípidos: cambios en el potencial mitocondrial, activación de autofagia y mTOR como mecanismos reguladores.

Introducción.

El SAF es una enfermedad autoinmune en la cual anticuerpos antifosfolípidos (aAFL) causan alteraciones tromboticas y de la gestación. Actualmente, se conocen muchos de los mecanismos implicados en la patogénesis asociados a trombosis y morbilidad gestacional, sin embargo, recientemente se han descrito mecanismos subyacentes que cobran importancia por su asociación con alteraciones metabólicas, inflamatorias y, en general, de la homeostasis celular, que afectan organelas de forma específica y generan desregulación en procesos celulares de vital importancia.

Uno de estos mecanismos es la alteración del potencial mitocondrial, ya que por el papel que juega esta organela en la regulación de procesos energéticos y metabólicos, afecta mecanismos reguladores de la homeostasis. Algunos de los mecanismos influenciados por la función mitocondrial son la activación de autofagia y la proliferación celular; lo último, relacionado con la activación de proteínas que hacen parte de la señalización vía PI3K, como mTOR. Este complejo de proteínas tiene la capacidad de activar la proteína S6 ribosomal (S6RP) lo cual induce un aumento de síntesis de proteínas y la entrada al ciclo celular. La activación de estos mecanismos se ha descrito en otras enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), y también en el cáncer, donde se ha observado que dichos mecanismos se asocian a la supervivencia celular y pueden llevar a un descontrol de los procesos metabólicos.

Materiales y métodos.

Se realizó una aproximación *in vitro*, usando un modelo de células endoteliales, que fueron estimuladas con IgG de pacientes con y sin aAFL y manifestaciones clínicas como morbilidad gestacional, trombosis vascular o ambas, así como pacientes con antecedentes de éxito gestacional y con morbilidad gestacional sin presencia de aAFL.

Se seleccionaron algunos parámetros como la función mitocondrial, la autofagia, la activación de mTOR y su repercusión en la proliferación celular, además de algunos marcadores de inflamación. Sobre los parámetros afectados por los aAFL se determinó el efecto de las ATL. Para evaluar dichos parámetros se usaron técnicas de citometría de flujo, Western blotting y ELISA.

Resultados.

Los aAFL de pacientes con morbilidad gestacional y trombosis vascular aumentaron la hiperpolarización mitocondrial, la activación de mTOR, la entrada al ciclo celular y la autofagia; esta última también aumentada por aAFL de pacientes con trombosis vascular aislada. No se observaron efectos de los aAFL sobre la producción de las dos citoquinas proinflamatorias seleccionadas, ni tampoco efectos importantes de las ATL sobre los parámetros evaluados.

Conclusiones.

En el SAF se observan alteraciones metabólicas similares a las observadas en el cáncer o en otras enfermedades autoinmunes como el LES, en las cuales se genera un descontrol de mecanismos como la proliferación celular y la autofagia, partiendo de una alteración de la función mitocondrial. En esta enfermedad, esto se refleja clínicamente en manifestaciones como la trombosis vascular por hiperplasia de la íntima, la cual causa oclusión de la luz de los vasos sanguíneos, pero también en un SAF de fenotipo inflamatorio en el cual la activación de autofagia y de proteínas como mTOR, inducen un aumento en la proliferación no solo de células endoteliales sino de linfocitos que lleva a diferentes tipos de daño celular y podría explicar la variedad de manifestaciones clínicas de los pacientes con SAF. Teniendo en cuenta los resultados de este estudio, se propone usar en futuras investigaciones fármacos como la rapamicina y la hidroxiclороquina, ya que de esa forma se podría obtener más información que ayude a promover el uso entre pacientes con manifestaciones del SAF asociadas a la activación de mTOR y la autofagia.

ABSTRACT

Endothelial homeostatic disruption induced by the antiphospholipid antibodies: changes in the mitochondrial potential, activation of autophagy and mTOR as regulatory mechanisms.

Introduction

The Antiphospholipid Syndrome (APS) is an autoimmune disease in which antiphospholipid antibodies (aPL) trigger thrombosis and pregnancy morbidity.

Evidence shows several mechanisms in APS that can explain the development of thrombosis and pregnancy morbidity and their association with alteration in the coagulation cascade and some inflammatory events. Recently has been described other mechanisms related to homeostatic disruption observed in some diseases such as cancer and systemic lupus erythematosus (SLE).

Activation of autophagy and increased cell proliferation was observed in these diseases, originated in mitochondria by potential membrane alterations, which disturbs cellular homeostasis. One of the intracellular pathways affected is PI3K signaling, specifically proteins as mammalian target of rapamycin (mTOR), that activates S6 ribosomal protein (S6RP) which induces an increase of protein synthesis and entrance to the cell cycle. This results in cell proliferation and it can be potentiated by autophagy activity for survival induction, which has implications in tumors growth, lymphocyte proliferation, development of cancer and autoimmunity.

We propose that autophagy and mTOR signaling can play role as two pathways involved in development of thrombotic APS, affecting particularly endothelial cells, leading to a vascular intimal hyperplasia that prompt patients to thrombotic events.

Material and methods.

An *in vitro* approach was performed using a human vein endothelial cell model, stimulated with IgG of patients with and without aPL and clinical manifestations of APS, such as

pregnancy morbidity, vascular thrombosis, or both, as well as women with successful pregnancy and pregnancy morbidity without aPL.

Mitochondrial function, autophagy and mTOR activation were evaluated using a molecular approach and its repercussion in cell proliferation, also the evaluation of some inflammation markers was performed. The modulator action of aspirin triggered lipoxins (ATL) was evaluated for all parameters altered in the presence of aPLs. The selected techniques for evaluations were: flow cytometry, western blott and ELISA.

Results.

The aPL from patients with pregnancy morbidity and vascular thrombosis increased the mitochondrial hyperpolarization, mTOR activation, cell cycle entrance and autophagy; the last one was also increased by aPL from patients with only vascular thrombosis. No effects have found in inflammation biomarkers and in the same way, no effects were observed with co-treatment with ATL and aPLs.

Conclusions.

In the present manuscript, we described autophagy and mTOR pathway as two mechanisms hyperactivated in endothelial cells induced by aPL from patients with different clinical manifestations of APS. This one was also observed in cancer and other autoimmune diseases as SLE, with increased cell proliferation in addition to the autophagy activity. Cell proliferation is evidenced by vascular endothelial hyperplasia, which promotes the occlusion of vessel lumen and a prothrombotic environment in APS patients. In addition, the increased endothelial cell proliferation impacts other cells like lymphocytes, monocytes and trophoblasts, and according to their function triggers activation of several mechanisms, and in consequence different clinical manifestations in APS. These findings allow promoting the use of rapamycin and hydroxychloroquine in future research for therapeutics of APS, due to selective inhibition of the two pathways activated by aPL in our model.

1.1 INTRODUCCIÓN

1.2 Generalidades del Síndrome Antifosfolípido.

El SAF es una enfermedad autoinmune caracterizada clínicamente por trombosis y morbilidad gestacional, en presencia persistente de aAFL (1), los cuales están dirigidos contra fosfolípidos aniónicos de las membranas celulares o proteínas de unión a fosfolípidos como la β 2 glicoproteína I (β 2GPI) (2), la vimentina (3), la protrombina (4) o la anexina V (5) las cuales actúan como cofactores para los aAFL. El síndrome es además clasificado de acuerdo a la presencia o no de otras enfermedades autoinmunes que permite diferenciar el SAF primario (ausencia de otras enfermedades autoinmunes), del SAF secundario (cuando se presenta con otra enfermedad autoinmune, generalmente LES) (1).

Los aAFL se presentan entre 1-5% de la población general, sin embargo, la presencia de estos no necesariamente se asocia con el desarrollo del SAF, debido a que estos pueden ser detectados en condiciones sistémicas como infecciones e incluso con el uso de ciertos fármacos (6). La incidencia del SAF es de cinco casos nuevos por cada 100.000 personas y una prevalencia de 40-50 casos por cada 100.000 personas según un estudio en Europa (Euro-phospholipid), en el cual se incluyó una muestra de 1.000 pacientes con esta enfermedad (7). En Latinoamérica se realizó un estudio siguiendo el mismo protocolo del Euro-phospholipid con una muestra de 100 pacientes, donde no se encontraron diferencias respecto a la distribución de los aAFL y las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes en el estudio europeo (8). En Colombia no existen estudios con una cohorte de pacientes amplia, sin embargo en algunos de estos estudios realizados en localizaciones específicas del país, muestran un comportamiento similar en cuanto a las manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio (9)

A nivel clínico, en el SAF la trombosis puede ser arterial o venosa, de pequeños o grandes vasos: asociada a accidentes cerebrovasculares 14%, infarto de miocardio 11% y trombosis venosa profunda 10% (1, 10). La morbilidad gestacional se presenta como *i*) una pérdida fetal después de la décima semana de gestación con morfología normal; *ii*) partos prematuros antes de la semana 34 asociado a eclampsia, preeclampsia o

características de insuficiencia placentaria; *iii*) tres o más abortos consecutivos antes de la décima semana de gestación, descartando causas como anomalías cromosómicas u hormonales (1). Esta distribución de manifestaciones clínicas ha permitido distinguir el síndrome antifosfolípido como dos entidades diferentes: el SAF vascular cuya manifestación principal es la trombosis y el SAF obstétrico caracterizado principalmente por pérdidas gestacionales.

De acuerdo con los criterios revisados de Sapporo (Sídney, 2006), los aAFL con los que se realiza el diagnóstico son el anticoagulante lúpico (AL), los anticuerpos IgG o IgM anticardiolipina (aCL) y anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI). El diagnóstico se realiza con al menos un criterio clínico y uno de laboratorio, este último con 12 semanas de diferencia entre cada test, debido a que estos anticuerpos pueden producirse en presencia de condiciones clínicas como las infecciones, entre otras (1).

Adicional a estos criterios, existen otros que no han sido considerados para el diagnóstico porque aún se desconoce su prevalencia y que se han denominado como no-criterio; a pesar de esto han sido tenido en cuenta en estudios, como el realizado en el marco del 13º Congreso Internacional de Anticuerpos Antifosfolípido en Galveston (TX, USA), donde se revisaron diferentes aAFL no-criterio, su mejor forma de detección y su asociación con las manifestaciones clínicas del SAF (11) (12).

Respecto a los anticuerpos no-criterio, se han detectado anti- β_2 GPI contra dominios no clásicos, también contra proteínas implicadas en la coagulación como la trombina, anexina y fosfatidilserina. Algunos de estos se han encontrado aumentados en pacientes con morbilidad gestacional en ausencia de trombosis, lo cual soporta la idea de la existencia de dos entidades clínicas diferentes en el SAF (13).

La necesidad de estudiar los anticuerpos no-criterio surge de diferentes estudios en los que se han encontrado pacientes con un fenotipo de SAF pero que persisten en su negatividad para los anticuerpos aceptados para el diagnóstico en los consensos internacionales, y se ha sugerido definir a estos pacientes como SAF seronegativos, además de la demostrada heterogeneidad de los mismos en cuanto a especificidad y función (12). Adicionalmente, existen manifestaciones clínicas no-criterio, entre las que

se encuentran el livedo reticularis, trombocitopenia, alteraciones renales, neurológicas y cardíacas (1).

1.3 Fisiopatología del SAF.

Los aAFL desencadenan diversos mecanismos a nivel intracelular, lo cual puede explicarse por la heterogeneidad de dichos anticuerpos. Esto también puede explicarse porque los aAFL se dirigen contra diferentes fosfolípidos y proteínas de membrana, tanto plasmática como contra la de organelas, entre las que se incluye la mitocondria (14).

Dependiendo del antígeno, sea proteico o fosfolipídico, los anticuerpos desencadenan la activación de receptores y cascadas de señalización celular de forma patológica, alterando los procesos que mantienen la homeostasis, terminando generalmente en daño y muerte de las células afectadas (14).

Los blancos celulares de los aAFL incluyen células trofoblásticas (15), plaquetas (16), monocitos (17) y células endoteliales (18). Estos generan una disfunción celular, manifestada con trombosis, oclusión vascular no trombótica y morbilidad gestacional (14, 19-21). Uno de los blancos más estudiados en el SAF han sido las células endoteliales debido a su relación directa con la regulación de la homeostasis vascular, dado que, en estas células convergen algunos mecanismos relacionados con la generación de trombosis, además de la ya demostrada disfunción endotelial en pacientes con SAF obstétrico. Se ha evidenciado en diferentes modelos experimentales que estas células al estar en presencia de los aAFL inician procesos de disfunción mediada por mecanismos como la disminución del óxido nítrico (NO), debido a la activación de receptores de membrana como apolipoproteína E receptor 2 (ApoER2), lo cual se asocia con la inactivación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (22). Esta reducción de NO, disminuye la relajación del músculo liso vascular y aumenta el riesgo de trombosis.

Otro de los mecanismos de daño en células endoteliales es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), observado en un modelo *in vitro* de células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC), las cuales en presencia de los aAFL, aumentaron la producción del anión superóxido de origen mitocondrial (23). En otros modelos se ha visto la producción de ROS asociado a daño en organelas celulares como la mitocondria

(24) y de igual forma, a la disminución de linfocitos Treg, asociado a LES (25). Las ROS en el SAF también se han visto relacionadas con procesos inflamatorios, en los cuales existe un aumento en la actividad de células como los neutrófilos. En estas células se detectó explosión respiratoria y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET); todo esto relacionado con la activación del receptor tipo toll 4 (TLR4), y de igual manera con la trombosis por aumento de trombina de forma dependiente de ADN, el cual está presente en altas cantidades en las NET (26).

En el contexto del metabolismo celular también existen alteraciones mediadas por los aAFL, evidenciado en células endoteliales tratadas con anticuerpos de pacientes con SAF. En estas células se observó un incremento en la proliferación, principalmente del endotelio de la microvasculatura renal, provocando oclusión de los vasos y llevando a una coagulopatía no trombotica en pacientes con nefropatía renal asociada a SAF (27).

Respecto a los mecanismos celulares alterados en el SAF obstétrico, una inadecuada función del trofoblasto extraveloso, inducida por los aAFL, altera la remodelación de las arterias espirales uterinas. Este último es un proceso importante para el crecimiento normal del feto, sobre todo en la segunda mitad de la gestación (28). A este nivel se ha observado que el mayor daño no se produce por la trombosis, sino por factores proinflamatorios que causan injuria placentaria (28), y por lo tanto un inadecuado desarrollo fetal o incluso la muerte en los casos más severos.

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos desencadenados por los aAFL en el SAF obstétrico se han visto asociados a eventos inflamatorios más que a los tromboticos, y adicionalmente a la presencia de anticuerpos considerados no-criterio (29). Entre estos eventos se ha visto la alta producción de citoquinas proinflamatorias en trofoblasto extraveloso, lo cual inhibe la migración celular e incrementa la producción y secreción de moléculas anti-angiogénicas, de una manera dependiente de TLR4/MyD88 (20).

A nivel clínico, la evidencia demuestra que las placentas de mujeres con SAF presentan más infiltrado celular inflamatorio comparado con mujeres sanas, específicamente en la zona de la decidua, lo cual impide una adecuada remodelación de los tejidos placentarios, necesario para el normal intercambio de nutrientes entre la madre y el feto (30). Sumado a esto, la trombosis placentaria no es el hallazgo más frecuente en estas

mujeres y por el contrario se han encontrado desórdenes en la diferenciación de las células trofoblásticas, invasión endovascular defectuosa y pobre remodelación de la vasculatura materna (31).

Los aAFL pueden interactuar con los fosfolípidos de membrana de forma directa sin necesidad de cofactores. Esto se observó en un estudio *in vitro* donde se realizaron estímulos con aAFL independientes de cofactor sobre monocitos. Allí se demostró la importancia de la activación del inflammasoma NLRP3 en el SAF de fenotipo inflamatorio, ya que esta activación indujo la producción de ROS por la enzima (NADPH oxidasa) NOX y a su vez la de citoquinas como IL-1 β e IL-18 (32).

Teniendo en cuenta la variedad de mecanismos intracelulares activados por los aAFL, se propone evaluar este aspecto desde el contexto de la señalización celular, dado que se ha observado que los aAFL pueden activar rutas celulares asociadas al crecimiento, proliferación y migración celular. Debido a esto, es importante describir en particular la vía fosfatidilinositol 3 quinasa, Akt y el blanco de rapamicina en mamíferos (PI3K/Akt/mTOR), ya que este trabajo está enfocado en la descripción de los eventos moleculares y funcionales asociados con esta vía al ser activada por los aAFL en células endoteliales específicamente, y también de la asociación de esta activación con las manifestaciones clínicas en SAF.

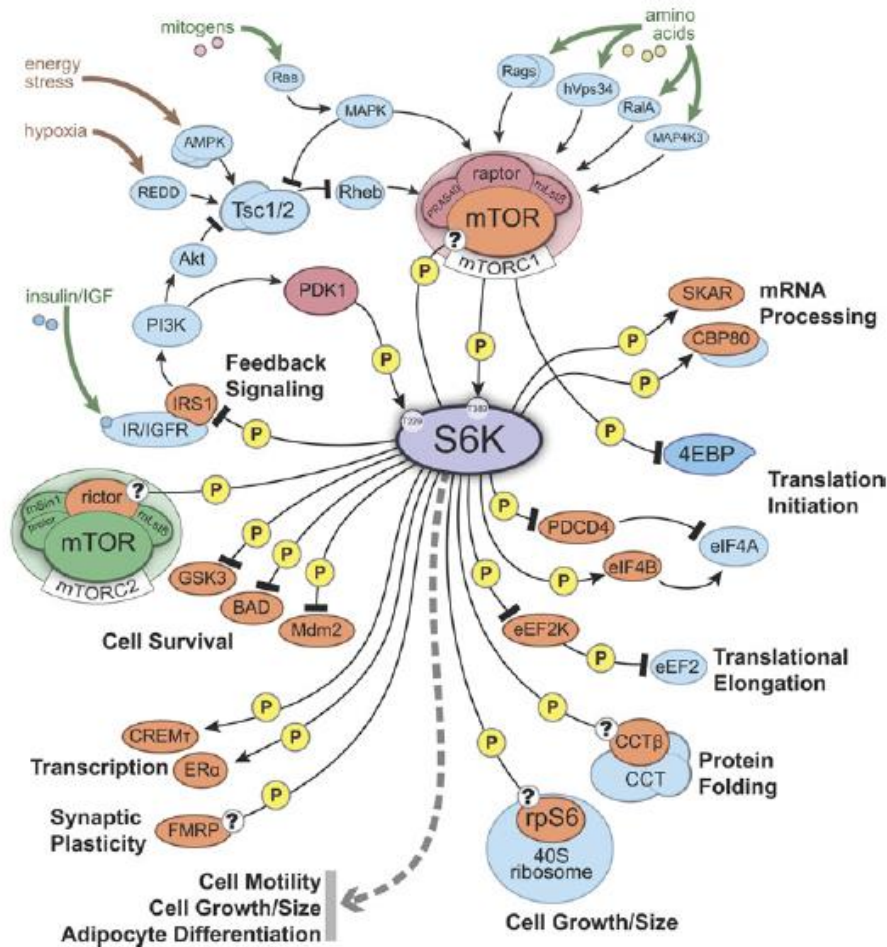
1.4 Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR: implicaciones en el metabolismo celular e inmunidad.

A nivel intracelular existen diferentes mecanismos por los cuales se regula el crecimiento, metabolismo y supervivencia celular. Estos procesos pueden depender de la activación inicial de algunos receptores ubicados principalmente en la membrana celular, cuyos ligandos son generalmente factores de crecimiento que, dependiendo de su tipo, desencadenan la activación de múltiples vías de señalización, regulando así procesos celulares para el mantenimiento de la homeostasis celular (33). A pesar de que la mayor parte de la activación de estos receptores se da por factores de crecimiento, también puede ocurrir en condiciones como la hipoxia, el estrés metabólico y la suficiencia o no de nutrientes (34).

Como se observa en la figura 1, la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR tiene en general, efectos positivos sobre la proliferación, crecimiento y supervivencia celular, y efectos negativos sobre procesos catabólicos en los que se reciclan productos no viables para la célula. Estos procesos catabólicos ayudan a controlar procesos crónicos no beneficiosos para los tejidos, como la inflamación, la hiperplasia de carácter patológico o la producción de ROS que inducen estrés oxidativo, cuya perpetuación termina en degeneración tisular y en un desbalance homeostático (35).

Los principales receptores para la activación de PI3K son los Receptores Tirocína Quinasa (RTK, por sus siglas en inglés). Estas son proteínas ubicadas principalmente en la membrana celular, donde interactúan con ligandos, que pueden ser factores tróficos como la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), entre otros. Los RTK también pueden ubicarse intracelularmente y cumplir o no funciones catalíticas de acuerdo a su estructura proteica (34). Clásicamente, se ha descrito que estos receptores tienen la capacidad intrínseca de autofosforilarse en residuos específicos de tirocína, los cuales a su vez adquieren la capacidad de unirse a proteínas con dominios de homología Src 2 (SH2). Una vez las proteínas con esos dominios se activan, interactúan con proteínas de andamiaje que activan la proteína Rat Sarcoma GTPasa (Ras GTPasa), induciendo así la fosforilación y activación de la PI3K (33) (36).

Figura 1. Vía PI3k/Akt/mTOR y efectos sobre el metabolismo celular.



Esta vía de señalización tiene como principales efectores, proteínas asociadas al crecimiento y proliferación celular, al iniciar el proceso de síntesis de proteínas. Tomado de Brian Magnuson Bilgen Eki y Diane C. Fingar. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 2012.

1.4.1 mTOR como activador metabólico.

La PI3K activada induce la producción de fosfoinositol 3 fosfato (PIP₃); dicha molécula se une a Akt, e induce la exposición de sus sitios de fosforilación como la serina 473, que pueden ser activados por proteínas con afinidad para estos sitios. Una de las proteínas con afinidad para Akt es mTOR, la cual existe en forma de los complejos mTORC1 y mTORC2, y tienen las subunidades raptor y rictor respectivamente que les

dan especificidad funcional a los mismos. El complejo mTORC2 posee la capacidad de activar Akt y este a su vez activa mTORC1, generando así un efecto de retroalimentación positiva (35). De mTORC1 se han descrito diferentes sustratos para inducir cambios en el metabolismo celular, tales como el aumento de la proliferación, el crecimiento, entre otros. Esto se explica por la activación de proteínas efectoras como el factor de iniciación para elongación de proteínas (eIF4E) o la S6 ribosomal (S6RP). Esta última con la capacidad de inducir entrada al ciclo celular, crecimiento (entiéndase como aumento de volumen celular) y proliferación(37).

Respecto a la activación de S6RP, se ha observado que también puede ser activado a través de la vía de la Proteína Quinasa Activada por Mitógenos (AMPK), mediante la fosforilación de la quinasa S6K2(38).

1.4.2 mTOR en inmunidad y autoinmunidad.

En el proceso de activación de los linfocitos T, mTOR juega un papel importante, debido a que se ha evidenciado que después del reconocimiento del antígeno se presenta una alta actividad proliferativa en respuesta a este evento, lo cual es controlado por una gran variedad de mecanismos metabólicos que llevan a la diferenciación en subpoblaciones de linfocitos T. El papel de mTOR en estos procesos se ha demostrado en ratones *knock out* para este complejo de proteínas, donde se observó que en los linfocitos T ayudadores se expresaban marcadores de activación, pero no se observaba una adecuada diferenciación sobre todo hacia la subpoblación Th2 y Th17 en respuesta al antígeno, evidenciando la importancia de mTOR en el adecuado desarrollo de estas subpoblaciones de linfocitos T (39).

Otra subpoblación de linfocitos afectado por la regulación de mTOR es la del fenotipo regulador o Treg. En estos se ha observado que la ausencia de esta proteína induce la expresión de los marcadores CD25 y Foxp3, lo cual se relaciona con tolerancia inmunológica como respuesta al antígeno. Esta respuesta, en ausencia de mTOR, se debe a una deficiencia en la fosforilación de la proteína activadora de transcripción y transductora de señales 3 (STAT 3), de modo que induce disminución en la producción de IL-12, INF- γ , IL-4 e IL-6 (40).

En enfermedades autoinmunes, se ha observado una elevada activación de linfocitos T y B, reflejado en la producción de autoanticuerpos y linfocitos T autorreactivos. En el caso del LES, estos linfocitos autorreactivos producen anticuerpos contra el ADN de doble cadena asociado clínicamente con proteinuria severa por daño renal. En un modelo de LES en ratones, se observó indirectamente la activación de mTOR, debido a que el tratamiento con rapamicina disminuyó los niveles de autoanticuerpos y de albúmina en orina, lo cual se evidenció también por la disminución en la tasa de proliferación de los linfocitos T efectores (41).

1.4.3 Activación de mTOR en SAF.

Los aAFL se dirigen contra fosfolípidos de membrana, directamente o mediante cofactores como la β_2 GPI, y se ha observado una relación directa entre la presencia de anticuerpos anti- β_2 GPI y casos severos de trombosis. Esto se ha explicado por la capacidad de unión de esta proteína a receptores de membrana como los TLR, o el ApoER2, activando así mecanismos como la producción de ROS, inhibición de proteínas anticoagulantes o disminución de NO que aumentan el riesgo de trombosis. Sin embargo, en estudios recientes, se ha demostrado un posible mecanismo no asociado a defectos en la coagulación, mediante la hiperplasia vascular endotelial patológica que conlleva a oclusión de la luz de los vasos sanguíneos, y por ende a desencadenar los eventos trombóticos. Este mecanismo se resume en la figura 2, en la cual se observa como los eventos trombóticos se relacionan directamente con la tasa de proliferación de las células endoteliales, específicamente asociada a una alta activación de mTOR lo cual se demostró mediante la actividad de su proteína efectora S6 ribosomal y de Akt, la cual es activada por mTORC2 (27).

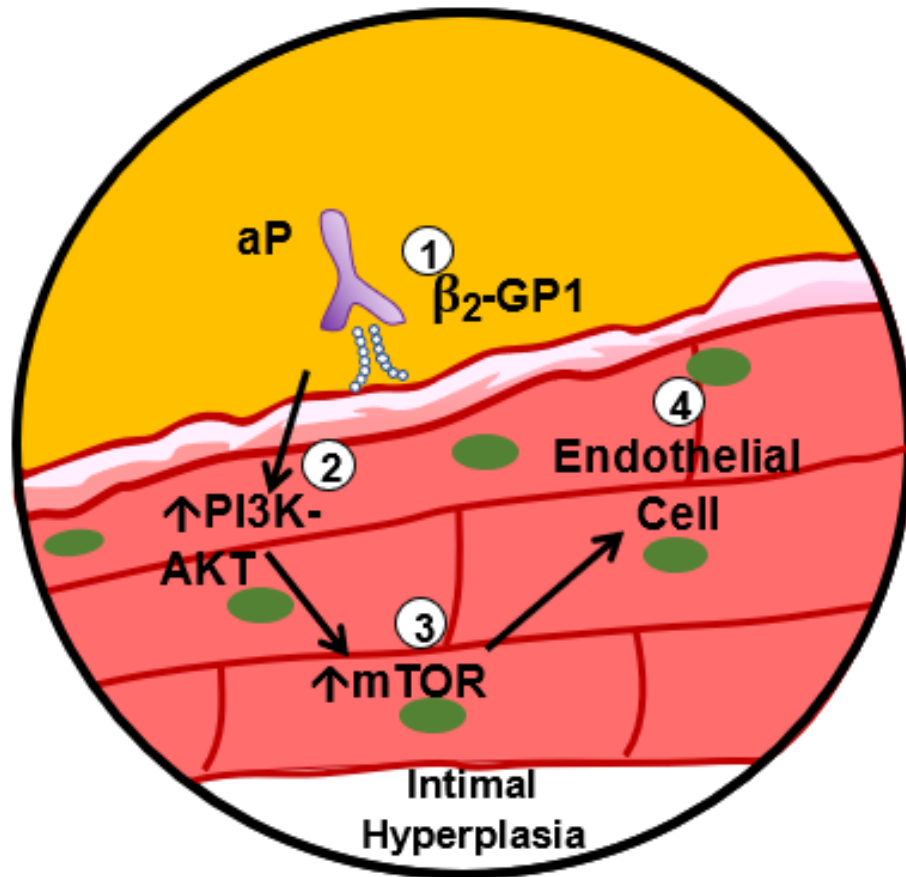
De otro lado se ha visto pérdida de la función mitocondrial en el SAF, asociado a la activación de mTOR, en modelos murinos que desarrollan aAFL de manera espontánea. En este estudio se evidenció disminución en la expresión y activación de la proteína relacionada con dinamina (Drp1), que está relacionada con el control homeostático en las mitocondrias de hepatocitos, debido a que esta activa el proceso de mitofagia o autofagia mitocondrial. Esta disfunción fue disminuida al tratar los ratones con rapamicina, incluso se observó una disminución de aAFL con este tratamiento (24).

En modelos in vitro se encontró una asociación entre la presencia de anticuerpos anti- β_2 GPI, la activación de factor tisular y la producción de IL-8 en monocitos, lo cual se relaciona con eventos trombóticos e inflamatorios en SAF. También se logró observar que en presencia de estos anticuerpos, se aumentaba la activación de mTOR en los monocitos, y al adicionar rapamicina, se lograba disminuir tanto la activación de mTOR como la del factor tisular y la producción de IL-8, lo cual tiene un significado importante respecto a posibles terapias en el SAF trombótico e inflamatorio; esto último relacionado con morbilidad gestacional ya que se ha observado que los anticuerpos anti- β_2 GPI interactúan con el TLR4 (induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias) y receptores asociados al control de la homeostasis celular en trofoblasto extraveloso y células endoteliales (21).

A pesar de los diferentes mecanismos asociados a la activación de mTOR en SAF, aún no se ha logrado dilucidar cuál es el receptor que media la activación de la vía PI3K, o si pudiera haber una activación directa de mTOR, a través de una alteración en la vía de las pentosas en la que se genera un subproducto del metabolismo del triptófano conocido como kinurenina; esta interactúa con mTOR directamente y genera su activación, lo cual ha sido evidenciado en enfermedades como el LES (42).

La relación entre el metabolismo celular y mTOR se ha demostrado en otras enfermedades no autoinmunes, en especial en el cáncer, donde se evidencia una alteración del metaboloma, asociado a cambios en el funcionamiento de organelas como la mitocondria, y la activación de mTOR a modo de mecanismo de supervivencia celular. Debido a esto, recientemente la mitocondria se ha convertido en uno de los blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer (43).

Figura 2. Esquema de inducción de hiperplasia endotelial por los aAFL.



Los aAFL al unirse a la membrana celular, por medio de la β_2 GPI, inducen la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR e inician procesos de proliferación celular patológica que generan hiperplasia vascular endotelial y predisponen los pacientes con SAF a eventos trombóticos. Tomado y modificado de: Corban MT, Duarte-Garcia A, McBane RD, Matteson EL, Lerman LO, Lerman A. Antiphospholipid syndrome: role of vascular endothelial cells and implications for risk stratification and targeted therapeutics. Journal of the American College of Cardiology. 2017

1.5 Mitocondria: papel regulador en homeostasis y disfunción en autoinmunidad.

Una de las funciones mitocondriales es la producción de ATP, y consecuentemente de producción de energía en la célula; debido a esto y a otras funciones como la señalización vía ROS y la regulación del calcio intracelular, la mitocondria tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis celular. Diferentes enfermedades se han relacionado con disfunción o alteración en las funciones de esta organela; un ejemplo de esto se ha observado en enfermedades como el cáncer, específicamente en modelos *in vivo* de ratones susceptibles a desarrollar melanomas por sobreactivación de la proteína Ras, de la cual se conoce su importancia en la activación de la PI3K. En este modelo se evidenció un aumento de la actividad mitocondrial con un aumento del consumo de oxígeno y liberación de subproductos del ciclo de Krebs en paralelo a la activación de mTOR, del cual ya se describieron sus efectos positivos en la supervivencia y proliferación celular, procesos que se aumentan durante el crecimiento tumoral (44).

En el LES se ha demostrado también la importancia de la función mitocondrial, como fue descrito en un estudio usando un modelo de ratones susceptibles a esta enfermedad. En este modelo, sumado a un incremento en la proliferación de linfocitos, se observó producción de aAFL, entre ellos anti-cardiolipina (aCL), asociado a defectos en la función mitocondrial, por daño en el complejo II de la cadena transportadora de electrones e hiperpolarización mitocondrial. Estos defectos en la función mitocondrial también se relacionaron con la ausencia de mecanismos reguladores como la mitofagia. Lo último se ha evidenciado por la disminución de proteínas relacionados con estos procesos (Drp1) y un aumento en el número de mitocondrias (algunas de estas posiblemente inviables) al interior de la célula. Esto lleva a pensar que mecanismos de reciclaje celular, como la autofagia, son necesarios para mantener un ambiente libre de productos inviables que pueden inducir estrés celular y la producción de autoantígenos que llevan a la producción de autoanticuerpos (como aCL), derivados de mitocondrias dañadas, lo cual promueve el desarrollo de enfermedades autoinmunes (24).

1.6 Autofagia: ¿un mecanismo regulador de la homeostasis celular que debe ser modulado?

La autofagia es un mecanismo celular catabólico y evolutivamente conservado; es el principal proceso por el cual se degradan organelas y detritos celulares inviábiles y ayuda a mantener la homeostasis celular. En este mecanismo se involucran una serie de vesículas de doble membrana, que en su fase madura se conocen como autofagosomas, los cuales se fusionan con lisosomas, para así formar autofagolisosomas, donde se degrada el contenido de los mismos (45).

Existen tres tipos de autofagia: a) microautofagia; b) autofagia mediada por chaperona; y c) macroautofagia; esta última siendo la mejor caracterizada y de la cual se ocupa este texto, por lo tanto, se hará referencia a este mecanismo, simplemente como autofagia. Hay diferentes genes que codifican para las proteínas envueltas en la autofagia, conocidos como genes relacionados con la autofagia (Atg's), identificados inicialmente en levaduras, y algunos de los cuales se conservan en mamíferos (46). Este proceso puede dividirse en tres fases: iniciación, nucleación y expansión, en los cuales intervienen diferentes complejos de proteínas ATG.

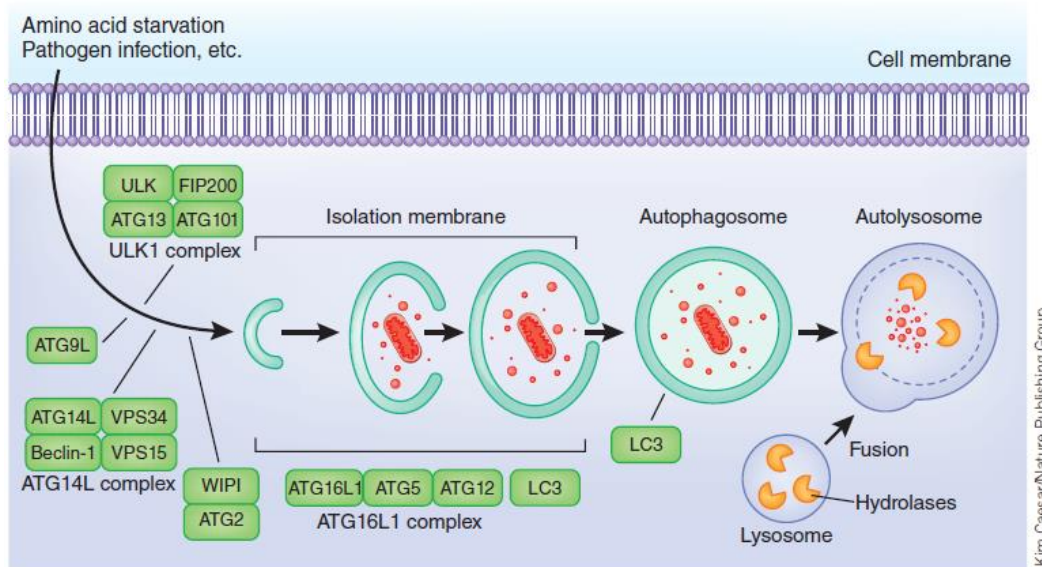
Inicialmente se requiere la formación del complejo ULK, encontrándose proteínas como UNC51 Ser/Thr tipo quinasa 1 y 2 (ULK1 y 2), ATG13, familia de quinasas de interacción con FAK (FIP200) y ATG101, que se activan principalmente por estímulos como la privación de nutrientes (47). Este complejo es reclutado al sitio de iniciación de la formación de la doble membrana, donde se forman los vestigios de los autofagosomas, conocidos como membranas de aislamiento o fagóforos, derivados principalmente de retículo endoplásmico (ER), pero también de proteínas asociadas a mitocondrias y aparato de Golgi. A este sitio se reclutan proteínas PI3K clase III conocidas como el complejo Beclin-1, el cual es regulado por ULK y la proteína de linfoma de células B (Bcl-2); esta última relacionada con la regulación de procesos apoptóticos a través de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

Una vez reclutadas estas proteínas, se asocia el complejo ATG16L, que específicamente interactúa con la membrana de aislamiento y funciona como un sistema tipo ubiquitina

que se encarga de generar una lipidación en la proteína asociada a microtúbulos LC3, la cual se une a una molécula de fosfatidiletanolamina (LC3-PE) generando así un cambio conformacional que le permite al autofagosoma entrar en su fase madura y de expansión, para luego fusionarse con lisosomas a través de proteínas asociadas a membrana lisosomal (LAMP). Este mecanismo de degradación celular se resume en la figura 3, donde se describe paso a paso el proceso de formación y maduración de los autofagosomas.

La autofagia se ha descrito clásicamente como un proceso de degradación dependiente de lisosomas, sin embargo, puede haber situaciones, en las que no se genera esta degradación por disrupción de las vesículas, y se toman vías alternas entre las cuales la más estudiada es la vía secretoria. En esta vía secretoria juega un papel importante el sistema de endomembranas en el cual se interrelacionan organelas como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática. Esto se ha demostrado específicamente por los mecanismos compartidos entre la biogénesis de los exosomas y la autofagia en diferentes contextos celulares, como en la fisiología del cáncer o las enfermedades neurodegenerativas, en las cuales juegan un papel importante los sistemas del control de homeostasis celular y la secreción de vesículas(48). En el contexto de la homeostasis, la autofagia participa tanto de forma positiva como negativa, y se ha demostrado que el exceso o déficit de esta, se relaciona con procesos patológicos al activarse como un mecanismo de supervivencia celular (49).

Figura 3. Autofagia como mecanismo celular degradativo.



La autofagia es un mecanismo de degradación celular que implica la activación de complejos de proteínas relacionados con la formación de vesículas de doble membrana conocidos como autofagosomas, estos se fusionan con lisosomas y generan hidrolasas al interior de estas para degradar y reciclar partes del citoplasma. Tomado de Shusaku T Shibutani, Tatsuya Saitoh, Heike Nowag, Christian Münz & Tamotsu Yoshimori, Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system, Nature Immunology 2015.

1.6.1 Inflamación: ¿un mecanismo activador o inhibidor de a autofagia?

Otro mecanismo importante de supervivencia celular es la inflamación, la cual involucra aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, y se activa por diferentes estímulos como trauma, infección por patógenos, agentes físicos (radiación UV, rayos X), entre otros. La inflamación juega un papel protector y a su vez destructivo, debido a que inicialmente se producen cambios hemodinámicos y sustancias que controlan la entrada y actividad de microorganismos patógenos en el sitio donde se produce la injuria, sin embargo, la excesiva actividad del sistema inmune en el contexto inflamatorio permite que se afecten los tejidos circundantes por la exacerbada actividad celular y humoral. En la inflamación se ha visto implicada la autofagia como un mecanismo de control que regula funciones

como producción de citoquinas proinflamatorias, fagocitosis, presentación de antígenos por el CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) clase II, modulación y supervivencia de macrófagos, entre otros (45).

Existen mediadores inflamatorios que pueden promover la activación de autofagia a través de diferentes vías de señalización, como es el caso del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que induce la expresión de los genes LC3, Beclin-1 y Atg7, y de igual forma inhibe la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, inhibiendo así la proliferación celular. De este mismo modo se activan procesos de autofagia asociados a apoptosis cuando estos genes se sobreexpresan (50). Adicionalmente, en células de la inmunidad innata como los macrófagos, se ha visto implicada la autofagia como un mecanismo que potencia la actividad fagocítica, al aumentar la supervivencia y disminuir procesos de apoptosis, en este caso asociado al uso de mediadores lipídicos que regulan a su vez procesos inflamatorios. Particularmente la actividad autofágica en estas células no se observa como dependiente de la inhibición de mTOR con rapamicina, lo que lleva a pensar que pueden activarse vías no clásicas en autofagia y además puede haber una coexistencia entre la activación de mTOR y procesos autofágicos (51).

En autoinmunidad se ha visto implicada la autofagia como un mecanismo que regula diferentes procesos patológicos, que en general llevan las células a un estado de estrés, donde se ven afectadas, de forma específica, organelas tales como la mitocondria o el retículo endoplásmico.

En el SAF la autofagia ha sido poco estudiada y se ha visto asociada al control de la respuesta inflamatoria(20), lo cual realiza la importancia de realizar más estudios acerca de la activación de este mecanismo, dada su relación con la actividad de proteínas como mTOR, del cual se conocen sus implicaciones en la respuesta inflamatoria. En otras enfermedades autoinmunes como el LES en el cual se puede presentar positividad para aAFL se demostró, por estudios *in vitro* y clínicos, que la desregulación en los procesos autofágicos, lleva a la pérdida de control de la actividad inmunológica y esta ha sido asociada tanto a factores genéticos como a condiciones medio ambientales; además se evidenció un papel importante en la inhibición de mTOR con rapamicina (un inductor de autofagia) en el tratamiento de los pacientes con esta patología (49).

1.7 Lipoxinas inducidas por aspirina (ATL) como moduladoras de la respuesta inflamatoria.

Uno de los medicamentos usados en enfermedades autoinmunes, específicamente en el SAF obstétrico, es la aspirina, debido a sus efectos antiinflamatorio y antiagregante plaquetario, ya que posee la capacidad de inhibir las enzimas ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y -2). Esto se traduce en reducción de los eventos trombóticos e inflamatorios, que en el contexto de la gestación, logran disminuir la tasa de morbilidad, previniendo pérdidas fetales y restricción de crecimiento intrauterino, entre otras alteraciones de la gestación (52).

En modelos murinos, los aAFL inducen alteraciones de la gestación como la reabsorción fetal, relacionada con abortos recurrentes, sin embargo al tratar los ratones a los cuales se les inducen los aAFL con bajas dosis de aspirina, se disminuyó la tasa de reabsorción fetal sumado a una recuperación del peso de los embriones a un rango normal, comparado con los no tratados con aspirina (53).

Las propiedades anti-inflamatorias de la aspirina se dan gracias a su capacidad de inhibir la acción de las ya mencionadas (COX) -1 y -2, impidiendo la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Sin embargo, también han sido ampliamente descritos los efectos de la aspirina por la acetilación de la COX-2, lo cual redirecciona su actividad catalítica, para que a partir del ácido araquidónico, se produzca el intermediario 15-(R)-HETE (15-R-hidroxi-eicosa-tetraenoico), el cual por biosíntesis transcelular, es tomado por la 5-lipoxigenasa derivada de neutrófilos y convertido en 15-epi-LXA₄ o lipoxinas inducidas por aspirina (ATL) (54).

En modelos de trofoblasto, se evaluó la modulación de los efectos de los aAFL por las ATL y se encontró que revertían los efectos negativos sobre la migración trofoblástica - el cual es un factor importante para la adecuada remodelación de las arterias espirales uterinas- además de restaurar la interacción entre células endoteliales y trofoblásticas, también afectada por los aAFL (55).

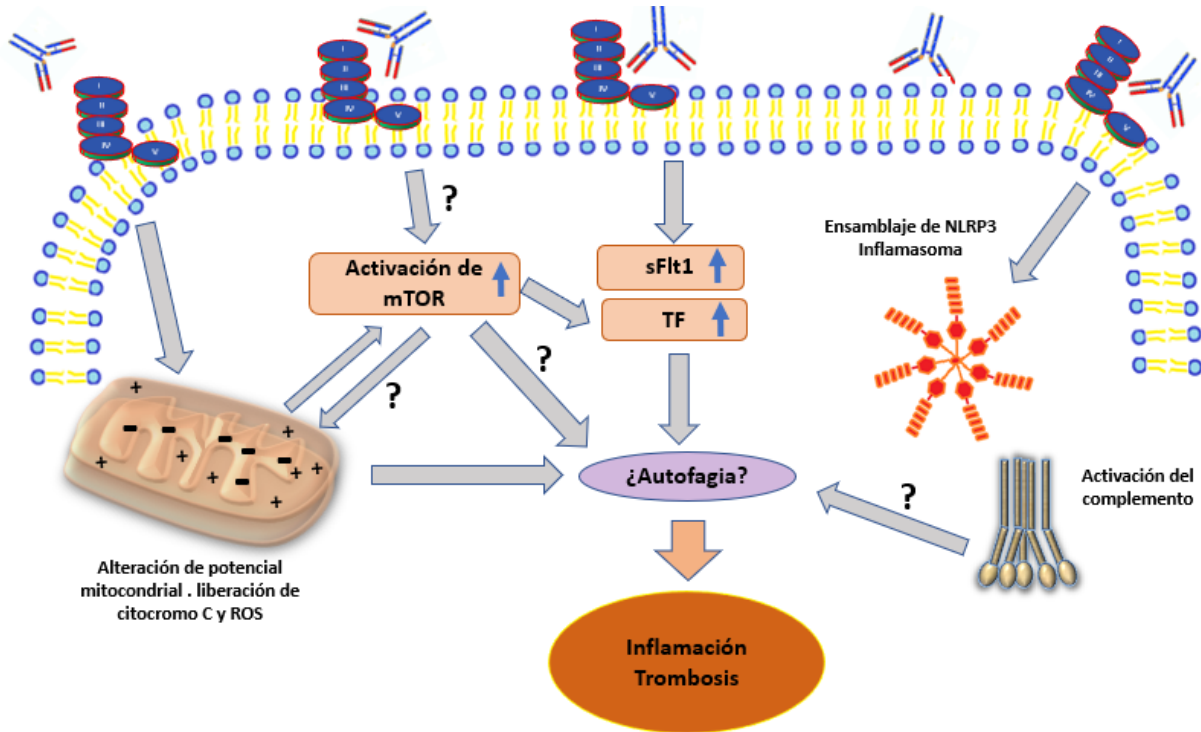
En condiciones como la preeclampsia, caracterizada por hipertensión y proteinuria en el período de la gestación, se ven aumentados procesos inflamatorios y de activación endotelial, lo cual puede explicar las condiciones clínicas de las pacientes (56). A nivel molecular se ha visto un aumento en la cantidad de citoquinas proinflamatorias y anti-angiogénicas, en modelos *in vitro* de células endoteliales estimuladas con plasma de mujeres con preeclampsia. En este mismo estudio se observó que al tratar estas células con ATL, disminuyeron algunos parámetros que se vieron aumentados por estos plasmas, como la adhesión de monocitos al endotelio que es un indicador de inflamación (57).

En la resolución de la inflamación, las células como los macrófagos tienen un rol importante, ya que por medio de procesos como la eferocitosis, evitan la acumulación de detritos celulares que pueden ocasionar injuria a los tejidos, por la generación de patrones moleculares asociados a daño (58). En macrófagos murinos se probaron las ATL, y se demostró que disminuían procesos de apoptosis, lo cual incrementó su supervivencia. Otras moléculas con características similares a las ATL respecto a los mecanismos antiinflamatorios, son las resolvinas, las cuales se generan a partir del ácido docosahexaenoico (DHA), y se demostró que en este mismo modelo, indujeron procesos de autofagia, de la cual se sabe es un mecanismo de supervivencia celular y que se encuentra involucrada en el control de la respuesta inflamatoria (51).

Teniendo en cuenta lo anterior, y que las células endoteliales son un blanco importante para los aAFL, planteamos el modelo representado en la Figura 1: Los aAFL de pacientes con SAF inducen daño mitocondrial en células endoteliales, por lo que puede generar cambios en el potencial de membrana como la hiper o despolarización, llevando a un aumento en la producción y liberación de ROS que a su vez generan la activación de mTOR y la autofagia como mecanismos de supervivencia. Los aAFL también inducen un incremento en la producción de moléculas inductoras de apoptosis y aumento de moléculas procoagulantes y proinflamatorias; esto último asociado a la activación del inflammasoma NLRP3 y el complemento, que en general promueven estrés celular que pueden activar o inhibir mecanismos de rescate como la autofagia, lo cual lleva a la célula

a un estado de estrés metabólico, que a nivel clínico se manifiesta como aumento de inflamación y trombosis.

Figura 4. Modelo celular de inducción de inflamación y trombosis por los aAFL.



Los aAFL interactúan directa o indirectamente con los fosfolípidos de membrana y activan mecanismos celulares de daño como: alteración de la función mitocondrial, activación patológica de mTOR, producción de moléculas protrombóticas e inducción de eventos inflamatorios, que tienen efectos sobre la autofagia lo cual puede llevar a la célula a un estado proinflamatorio y protrombótico. *Imagen: Carlos Mario Rodríguez C.*

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los aAFL inducen en células endoteliales, activación de mecanismos proinflamatorios y protrombóticos, mediante la alteración mitocondrial, proliferación celular y autofagia, lo cual puede ser modulado por las ATL.

2.1 Objetivo General.

Evaluar la participación del potencial mitocondrial, la actividad del complejo mTORC1 y la autofagia, en la fisiopatogénesis del SAF y la modulación por las lipoxinas inducidas por aspirina.

2.2 Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto de los aAFL sobre la función mitocondrial, la acidificación lisosomal, la proliferación celular y la producción de citoquinas proinflamatorias en células endoteliales como procesos inductores de inflamación y trombosis.
2. Determinar la actividad de mTORC1 y la expresión de proteínas involucradas en la formación de autofagosomas en las células endoteliales tratadas con aAFL como marcadores moleculares de los mecanismos evaluados en el objetivo # 1.
3. Evaluar el efecto de las ATL en los parámetros evaluados en el objetivo #1, la actividad de mTORC1 y la autofagia en presencia de los aAFL.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Estudio de corte transversal, donde se evaluó en un modelo *in vitro* de células endoteliales, el efecto de los aAFL sobre marcadores de función mitocondrial, lisosomal y de proliferación celular. De igual forma, se evaluaron algunos marcadores moleculares de proliferación celular y autofagia, así como la producción de algunas citoquinas proinflamatorias. Por último, se determinó el efecto modulador de las ATL sobre los marcadores que se encontraron alterados por los aAFL.

3.1 Población de estudio.

En el estudio participaron 50 mujeres, ninguna de estas en embarazo con los siguientes *criterios de inclusión*: antecedentes clínicos de trombosis y morbilidad gestacional

(MG/TV+) o de trombosis aislada **(TV+)**, y positividad de alguno de los aAFL aceptados en los criterios de Sapporo. Se incluyó otro grupo de mujeres con antecedente de criterios clínicos de morbilidad gestacional sola, negativas para los aAFL criterio, pero positivas para algunos de los aAFL no-criterio, que según la literatura se pueden denominar como seronegativas **(MG-SN)** (12) (59).

Como grupos control se incluyeron mujeres con morbilidad gestacional sola **(MG)** y mujeres con éxito gestacional comprobado y sin complicaciones en los embarazos previos, designado como suero humano normal **(SHN)**, ambos grupos negativos para los aAFL, tanto criterio como no-criterio. Todos los grupos tenían un n=10. El tamaño de la muestra se calculó a conveniencia, debido a la ausencia de datos acerca de la prevalencia del SAF en el país, y por la dificultad de captar un número grande de pacientes que cumplan criterios de trombosis o morbilidad gestacional y que sean positivas para los aAFL mencionados.

Las pacientes fueron captadas en la consulta médica del Programa Aborto Recurrente del Grupo Reproducción de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Antioquia y en la Clínica de Anticoagulación del Hospital San Vicente Fundación, Medellín, Colombia. Las mujeres sanas se contactaron entre la población general de la Universidad de Antioquia. Todas las mujeres aceptaron voluntariamente participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia acta 001, de 1 de febrero de 2018, y que se acoge a la declaración de Helsinki (octubre 3 de 2000) y las normas del Ministerio de la Protección Social de Colombia (Resolución 8430 de 1993) en los que se exige el respeto de los derechos y la dignidad de los pacientes, sin manipulación o alteración de la información en el manejo de las historias clínicas. Este estudio se clasificó con riesgo mínimo.

Como criterios de exclusión del estudio se tuvieron: la negativa de la paciente, médico tratante o familiares para participar en el estudio; mujeres con otras enfermedades asociadas como infecciones, diabetes, cáncer o cualquier otra enfermedad crónica diferente a las enfermedades autoinmunes LES y artritis reumatoidea, debido a la inclusión de pacientes con SAF secundario.

3.2 Obtención de las muestras de sangre.

De cada una de las participantes del estudio, se recolectó sangre venosa periférica en tubo sin anticoagulante (Fenwal, Estados Unidos) y en un tubo con citrato de sodio a 3,2% (Fenwal, Estados Unidos) como anticoagulante. La sangre del tubo sin anticoagulante se centrifugó a 460g por 10 minutos para separar el suero de la masa celular, y el tubo con anticoagulante se centrifugó a 2.268g por 10 minutos dos veces para separar el plasma. Los sueros se almacenaron a -80°C hasta su uso, y el plasma se utilizó fresco. Ninguna de las participantes se encontraba en embarazo al momento de la toma de las muestras.

3.3 Determinación de los anticuerpos antifosfolípidos aceptados en los criterios revisados de Sapporo.

En todos los sueros se midieron los anticuerpos IgG anti-cardiolipina por el estuche comercial Anticardiolipin Antibodies (Biosystem, España), y los anticuerpos IgG anti- β 2 glicoproteína I por el estuche comercial Aeskulisa β ₂-Glyco-GM (Aesku Diagnostics) y el estuche comercial Imtec- β ₂-glycoprotein I (Human, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Para la determinación del anticoagulante lúpico en plasma, se siguieron las recomendaciones de la CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) (60). Se utilizó APTT-SP (Instrumentation Laboratory, USA), para evidenciar la dependencia de los anticuerpos a los fosfolípidos, y para la detección del AL con el tiempo de víbora de Russell se utilizó dRVVT screen y dRVVT Confirm (Instrumentation Laboratory).

3.4 Determinación de los anticuerpos antifosfolípidos no-criterio.

Como se mencionó previamente, diferentes estudios presentan pacientes manifestaciones clínicas de SAF con persistente negatividad para los anticuerpos aceptados como criterio diagnóstico en los consensos internacionales. Por lo tanto, se evaluaron los anticuerpos antifosfolípidos no-criterio, además de aCL como un tipo de control entre las pruebas ya que se sugiere la presencia de anticuerpos aCL no

dependientes de β 2GPI. Se evaluaron los anticuerpos IgG contra los siguientes fosfolípidos: cardiolipina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol utilizando un ELISA estandarizado en el laboratorio a partir de la técnica publicada por Kwak y cols (23) (61). A microplatos en U Maxisorp Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) se adicionaron 30 μ L de una suspensión de 50 μ g/mL de cardiolipina en etanol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) o 50 μ g/mL en metanol de los otros cinco fosfolípidos mencionados (Sigma-Aldrich).

Los platos se dejaron secar a 4°C durante 18 horas, luego se lavaron con una solución de buffer fosfato salino, PBS (Gibco, Estados Unidos) y se bloquearon con una solución 10% de suero bovino adulto (Gibco) en PBS (SBA-10%), durante 90 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después de otro lavado con PBS, se agregaron por duplicado, 50 μ L de los sueros de las pacientes a una dilución 1:50 en SBA-10%, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y después se lavaron tres veces con PBS. Se agregaron 50 μ L del segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen, Estados Unidos) a una dilución 1:1000 en SBA-10%, se incubaron por 90 minutos y se lavaron como se indicó anteriormente. Se agregaron 50 μ L de la solución reveladora de paranitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich) a 1mg/mL en solución sustrato (dietanolamina 10%, $MgCl_2$ 0,005% y azida de sodio 0,02%, pH 9,8).

La reacción se detuvo con 50 μ L de una solución 3M de NaOH. La densidad óptica (DO) de cada pozo se determinó en un lector de microplatos de Elisa Multiskan FC (Fisher Thermo Scientific) a una longitud de onda de 405-410 nm. En cada plato se incluyó un blanco con solución de revelado y solución de parada, un control positivo y un control negativo para cada uno de los antígenos. Además, se incluyó un control de unión inespecífica de los sueros, sembrando cada uno de los sueros en un pozo sin antígeno cuyo valor se resta del promedio de las DO de las muestras.

Para clasificar a las mujeres como positivas para cualquiera de los anticuerpos antifosfolípidos, estas debían presentar resultados positivos en dos ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas. Los valores positivos de cada una de las pruebas se especifican en la Tabla 1.

3.5 Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales de Venas de Cordón Umbilical Humano (HUVEC).

Las células HUVEC se obtuvieron a partir de cordones umbilicales de placentas, provenientes de mujeres embarazadas a término, con parto vaginal o por cesárea, con desarrollo gestacional normal y luego de firmar un consentimiento informado aprobado por el comité de ética en las instituciones de salud donde fueron recolectados.

Previo al aislamiento, se preservaron los cordones a 4°C para luego realizar lavados con PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺ (Gibco), adicionando 50 µg/gentamicina (Genfar, Colombia), 100 U/mL penicilina (Sigma-Aldrich) y 0,25 µg/mL de fungizona (Vitalis, Colombia) con el fin de remover coágulos, restos de sangre y detritos y prevenir la contaminación de las células obtenidas. Siguiendo el protocolo previamente establecido en nuestro laboratorio (62), se realizó punción de la vena umbilical con aguja pericraneal #21 y se perfundió con PBS más antibióticos ocluyendo el extremo distal con pinzas portaagujas, asegurando que el PBS no se escapara por perforaciones de la vena. Posterior a esto se descartó el líquido y se perfundió con 5 a 7 mL de colagenasa tipo I (Invitrogen) a una concentración de 100 µg/mL, calentada previamente a 37°C por 15 min.

Se incubó el cordón por 20 min a 37°C y se recuperó el contenido de la vena masajeando suavemente, para complementar la digestión enzimática de forma mecánica. Este contenido se centrifugó a 50g por 5 min a 22°C; el sobrenadante se descartó y el pellet obtenido se resuspendió en frascos de cultivo de 75 cm² con filtro, marca Nunc (Thermo Fisher Scientific) con 10 mL de medio de cultivo basal de células endoteliales suplementado con factores de crecimiento (extracto de cerebro bovino, factor de crecimiento epidermal, hidrocortisona y 2% de suero bovino fetal (SBF) (Promocell, Alemania), más los antibióticos usados con el PBS. Los frascos se mantuvieron en una incubadora de CO₂ al 5%, humedad relativa 50-80% y 37°C durante 4 horas. Para optimizar el cultivo, se realizaron lavados con PBS más antibióticos para retirar eritrocitos, detritos y células no adherentes. Se dejaron nuevamente en medio de cultivo para células endoteliales hasta llegar a una confluencia del 100%. Las células se usaron entre los pases 1 y 2 para los ensayos posteriores.

3.6 Determinación de la pureza de las células endoteliales.

A los cuatro días de cultivo se evaluó la pureza de las células endoteliales, mediante la detección de la expresión de la molécula de adhesión CD31 o molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1 (por su sigla en inglés, PECAM-1). La molécula CD31 es útil para evaluar la pureza de las células endoteliales, debido a que es una glicoproteína constitutiva de estas, que les proporciona estabilidad en la monocapa y adhesión intercelular. La expresión de la molécula CD31 se determinó por citometría de flujo para lo cual las células se marcaron con IgG anti-CD31 conjugado con FITC (Thermo Fisher Scientific) con un control de isotipo IgG anti-humano con FITC (BioLegend Estados Unidos) y los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (IP) (Thermo Fisher Scientific). Las lecturas de citometría se realizaron en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson, Estados Unidos); se adquirieron 10.000 eventos en cada una de las lecturas realizadas. Para el análisis de los datos se usó el software FlowJo™ versión 7.6 (Becton Dickinson).

3.7 Purificación de las IgG de los sueros de las mujeres de los grupos de estudio.

Previo al proceso de aislamiento de la IgG policlonal, se cuantificó la cantidad de proteína de cada pool de sueros de los grupos de estudio, para cargar 25 mg de proteína en cada columna. Esta cuantificación se realizó con el método de ácido bicinonínico con el estuche comercial BCA (Pierce Biotechnology, Estados Unidos) y se realizó la lectura en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

El pool de las muestras de suero se centrifugó y se filtró a través de membranas de 0,2 µm, previamente a la purificación de IgG por cromatografía de afinidad con proteína G-Sefarosa usando el kit MAb Trap™ (GE Healthcare, Estados Unidos). La solución de suero diluido 1:1 con el tampón de unión del kit se pasó a través de la columna a una velocidad de 1 gota por segundo, después se adicionó el buffer de unión para eliminar las uniones inespecíficas y finalmente, con el tampón de elución suministrado en el estuche comercial, se obtuvieron las IgG unidas a la columna. Se cuantificó la concentración de proteínas por Nanodrop, y los títulos de anticuerpos antifosfolípidos por un ELISA tipo sandwich en cada preparación de IgG. Las IgG obtenidas se almacenaron

a -20°C (usualmente entre 3 y 6 meses) hasta su uso. Adicionalmente, para descartar la presencia de endotoxinas en las muestras, se realizó el ensayo de lisado de amebocitos con el estuche comercial Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000™ (Lonza, Estados Unidos).

3.8 Verificación de la integridad de las IgG.

La integridad de las IgG se determinó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras. Una muestra de 30 µg de IgG de cada uno de los grupos de estudio se mezcló en una relación 5:1 (vol/vol) con buffer de carga con β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), glicerol 30% (Amresco, Estados Unidos), azul de bromofenol 0,25% (Merck-Millipore, Alemania) y dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% (Amresco), y se calentaron a 100°C por 10 minutos para desnaturalizarlas según el procedimiento descrito por Laemmli en 1970 (63). Se sembraron 30 µL de la suspensión correspondiente a 30 µg de proteína y el tiempo del corrido electroforético fue de 2 horas a 90 voltios. Posteriormente se realizó tinción del gel con 0.1% de azul de Coomassie y se evaluaron las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y livianas de las IgG con el marcador de peso molecular Kaleidoscope™ (Bio-Rad, Estados Unidos). Como control, se realizó el corrido electroforético de las IgG en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones no reductoras.

3.9 Determinación de marcadores de función mitocondrial, lisosomal y proliferación celular.

3.9.1 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial con DIOC-6 por citometría de flujo.

El DIOC-6(3) (3,3'-Dihexyloxacarboyanine Iodide) (Invitrogen), es una sonda catiónica y lipofílica permeable a las células, que emite fluorescencia verde la cual es selectiva para las mitocondrias de células vivas, cuando es usado a bajas concentraciones. A pesar de esto la concentración debe ser estandarizada dependiente del tipo celular a evaluar (64, 65).

Inicialmente se sembraron 5×10^4 células HUVEC en platos de poliestireno de 24 pozos (Corning ®, Estados Unidos) con medio para células endoteliales, hasta obtener una confluencia del 90-100%. Luego se retiró el medio y se realizaron estímulos con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la IgG de cada uno de los grupos de estudio en un volumen total de 300 μL en medio Opti-MEM (Gibco). Como control positivo se usó 500 ng/mL de TNF- α (Thermo Fisher Scientific); como control negativo se usaron células en estado basal con medio Opti-MEM, todo en presencia o ausencia de 100 nM de ATL comercial 15(R) LXA₄ (Cayman Chemical, Estados Unidos); se incluyó el control del vehículo para las ATL, que en este caso fue etanol 3,5% (J.T. Baker, Estados Unidos).

Después de 24 horas del estímulo, se realizaron dos lavados de las células con PBS y se desprendieron con 80 μL de tripsina al 0,025% (Sigma-Aldrich) por 2 min, la cual se inactivó con medio de cultivo para células endoteliales. El contenido de los pozos se depositó en tubos de citometría (Becton Dickinson), se realizó un lavado por centrifugación a 580g por 5 min con 600 μL de PBS, y a cada tubo se le agregaron 0,45 μL de DIOC-6 de una solución stock a 2uM más 0,06 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de IP en un volumen total de 300 μL . Las lecturas se realizaron en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson) y se adquirieron 10.000 eventos. Para el análisis de los datos se usó el software FlowJo versión 7.6.

3.9.2 Evaluación de la acidificación lisosomal con Lysotracker Green por citometría de flujo.

Lysotracker Green DND-26 TM (Thermo Fisher Scientific) es una amina básica con fluorescencia verde que tiñe compartimentos celulares ácidos en células vivas con excitación/emisión Máx. 504/511 nm.

Las células fueron sembradas en platos de 24 pozos siguiendo el protocolo mencionado anteriormente para DIOC-6 con los mismos estímulos, y usando como control positivo rapamicina (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) a una concentración de 5 μM . Las células se tiñeron con una solución de Lysotracker Green a 25 nM (concentración definida en el proceso de estandarización) en PBS. Las lecturas se realizaron en el

citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson) y se adquirieron 10.000 eventos. Para el análisis de los datos se usó el software FlowJo versión 7.6.

3.9.3 Evaluación de la proliferación celular con Ki-67 e IP por citometría de flujo.

Se describen cuatro fases del ciclo celular: G1, S, G2 y M en las cuales la cantidad de ADN es variable, y aprovechando esto, se han usado sondas con especificidad para componentes nucleares como el IP, Hoechst o DAPI las cuales emiten fluorescencia que puede ser detectada por técnicas como la microscopía de fluorescencia o la citometría de flujo. Ki-67 es un antígeno nuclear de proliferación ampliamente usado en el diagnóstico del cáncer ya que es un predictor de entrada al ciclo celular y es un marcador específico de proliferación. Posee baja expresión en las fases G1 y S, pero se aumenta en mitosis (66).

Las células HUVEC se sembraron como se indicó anteriormente y se estimularon con 250 ug/mL de IgG por 24 horas, teniendo como control positivo factor de crecimiento epidermal (EGF, Thermo Fisher) 20 ng/mL y como control negativo rapamicina 5 μ M. Las células fueron desprendidas con tripsina, fijadas y permeabilizadas con una solución de etanol-metanol 1:1 (vol/vol) durante 5 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con 600 μ L de PBS por centrifugación a 580g por 5 min y se adicionó al pellet 200 μ L de IP a una concentración de 50 μ g/mL, se incubó por 20 min, se realizó lavado nuevamente con PBS y se adicionaron 3 μ L de anticuerpo IgG anti-Ki-67 conjugado con FITC (BD Biosciences, Estados Unidos) en 300 μ L de PBS. Las lecturas se realizaron en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson) y se adquirieron 10.000 eventos. Para el análisis de los datos se usó el software FlowJo versión 7.6.

3.10 Determinación de marcadores moleculares de proliferación y autofagia.

3.10.1 Evaluación de expresión y fosforilación de S6 ribosomal.

La S6RP es un componente de la subunidad ribosomal de eucariotas 40S, y hace parte de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Sus efectos celulares se dan por la integración de diversas señales que dan como resultado efectos positivos sobre la biosíntesis de proteínas, crecimiento celular y proliferación. Su activación se da mediante la

fosforilación en Ser 235/236 por la proteína S6 quinasa (S6K), como consecuencia de la activación del complejo mTORC1.

Para evaluar la expresión y fosforilación de S6 en células HUVEC, se sembraron 10^5 células en platos de 24 pozos en medio de cultivo para células endoteliales hasta alcanzar confluencia del 90-100% y se pusieron en ayuno por 6 horas en medio Opti-MEM (Gibco) sin suero bovino fetal para eliminar factores de crecimiento presentes en el medio para células endoteliales. Se realizaron estímulos por 1 hora con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG de las mujeres incluidas en el estudio además del tratamiento con 100 nM de ATL; como control positivo se usó 20 ng/mL de EGF y como control negativo 5 μM de rapamicina. Se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS, luego se adicionó a cada pozo 120 μL de buffer de lisis Laemlii (Tris 1M pH=6,8, 20% de SDS, 20% de glicerol, 3,8% de β -mercaptoetanol y 8% de azul de bromofenol) a 4°C. Se realizó barrido mecánico y se recuperó el buffer con el producto de la lisis celular, el cual fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Para la técnica de Western blot se realizó una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 8%, previo al calentamiento de los extractos celulares a 95°C por 5 min (condiciones reductoras), para luego cargar 40 μL de cada muestra y hacer el corrido electroforético durante 60 min a 150 V en buffer de corrido Tris-Glicina 1x. Se realizó transferencia de proteínas con técnica húmeda (buffer Tris-Glicina 1x, metanol 10% y 0,1% SDS (Amresco) en membranas de difluoruro de polivinilideno (por su sigla en inglés, PVDF) (Amresco) a 4°C/70V por 3 horas.

Se realizó un bloqueo de las membranas con 5% de leche en polvo semidescremada en TBS-T 1x (Tris Buffer Salino más Tween-20) durante 1 hora. Se usaron anticuerpos primarios IgG anti-pS6RP Ser235/236 y anti-S6RP total, ambos originados en conejo, y anticuerpo anti- α -Tubulina originado en ratón como control interno de carga, diluidos 1:500 en albúmina sérica bovina 10% (BSA, VWR, Estados Unidos) y se usaron 6 mL para incubar con las membranas durante 12 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBS-T 1x, y se adicionaron anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (Cell Signalling Technology, Estados Unidos) diluidos 1:2000 y 1:5000 respectivamente, durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con

TBS-T y se adicionó 1mL de Luminol (Thermo Fisher Scientific) por cada membrana. La adquisición de imágenes se realizó en el fotodocumentador G: Box (Syngene, Estados Unidos), con un tiempo de revelado promedio de 3 min y la densitometría de las bandas observadas se realizó con el software Image J versión 1.51(NIH, Estados Unidos).

3.10.2 Evaluación de expresión y fosforilación de ULK1.

En los eventos iniciales de la autofagia se genera la activación de proteínas como ULK1, la cual es requerida para reclutar proteínas PI3K de clase III. Esta activación puede ser inhibida por mTORC1 al fosforilar ULK1 en Ser757, disminuyendo así los procesos autofágicos.

Se realizó Western blot con el protocolo mencionado anteriormente para S6 ribosomal, usando anticuerpos primarios anti-pULK1 (Ser757), anti-ULK1 total originados en conejo y anti- α -Tubulina originado en ratón (Cell Signalling Technology), diluidos 1:500 en PBS más BSA 10%.

3.10.3 Evaluación de la expresión de LC3 I-II.

Se siguió el protocolo descrito anteriormente para los ensayos de Western blot.

En los eventos tardíos de autofagia, después de formarse los autofagosomas, estos requieren procesos de maduración para su posterior fusión con lisosomas y generar la degradación de los cargos en estas vesículas. Un marcador de maduración de los autofagosomas es la lipidación de la proteína asociada a microtúbulos MAPLC3 I que cuando está conjugada con fosfatidiletanolamina, se conoce como MAPLC3 II y adquiere un cambio conformacional que permite la interacción con proteínas del lisosoma.

Para evaluar la expresión de las dos isoformas de LC3, se realizó el Western blot con los estímulos usados en los ensayos descritos anteriormente, pero prolongando el tiempo de incubación con las IgG hasta 24 horas. Se introdujo una variación en la preparación de los geles de poliacrilamida: los geles se hicieron a una concentración del 15% y se adicionó glicerol 30% (Amresco), ya que esto permite separar proteínas con valores muy cercanos de peso molecular. En este caso, las isoformas LC3 I y II tienen un peso molecular de 14 y 16 kDa, por lo que se requiere un tamaño pequeño del poro en el gel,

el cual es proporcionado por la alta concentración de poliacrilamida del gel y la adición de glicerol. Se usaron los anticuerpos anti-LC3 I y anti-LC3 II originados en conejo (Cell Signalling Technology) con dilución de 1:1000 en BSA 10%.

3.11 Determinación de la producción de IL-8 e IL-1 β por las células endoteliales.

Las citoquinas proinflamatorias IL-8 (CXCL8) e IL-1 β (IL-1F2) son moléculas que actúan en sitios de inflamación, reclutando células inflamatorias como neutrófilos; se encuentran relacionadas con diferentes enfermedades con componentes inflamatorios como artritis reumatoide, diabetes mellitus y sepsis, entre otras.

Las células HUVEC fueron estimuladas por 24 horas con 250 μ g/mL de la IgG de los grupos de estudio en medio Opti-MEM (Gibco) teniendo como control positivo 500 ng/mL de TNF- α . Se recolectaron los sobrenadantes de las células estimuladas y fueron almacenados a -80°C hasta su uso. Se realizó un ELISA tipo sándwich con los estuches comerciales para IL-8 e IL-1 β (R&D Systems, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los microplatos proporcionados en el kit se encontraban previamente recubiertos con anticuerpos dirigidos contra IL-8 e IL-1 β , se agregaron 50 μ L y 200 μ L de los sobrenadantes respectivamente (cada muestra una sola vez) más 100 μ L y 50 μ L del diluyente, y se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas.

Se realizaron cuatro lavados con 400 μ L del buffer de lavado con previo aspirado de los pozos. Se adicionó 100 μ L del conjugado y se incubó nuevamente por 1 hora a temperatura ambiente, y se repitieron los lavados realizados anteriormente. Se adicionaron 100 μ L de la solución de sustrato y se incubó por 30 minutos protegiendo las microplacas de la luz, se adicionó 50 μ L de la solución de parada y se realizaron lecturas a 450nm con corrección a 570nm en un lector de microplatos de Elisa Multiskan FC (Fisher Thermo Scientific). En cada plato se incluyó un blanco con solución de revelado y solución de parada. La concentración en pg/mL se determinó mediante interpolación de los datos usando la curva de estándares.

3.12 Análisis estadístico.

Para determinar la distribución de los datos se aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk. Cuando se realizó comparación entre dos grupos se usó una t de Student no pareada, o su prueba no paramétrica correspondiente en caso de no haber distribución normal de los datos. Cuando se realizaron comparaciones entre varios grupos de estudio, se usó un ANOVA de una vía o su prueba no paramétrica correspondiente en caso no existir distribución normal de los datos. Se usó en todas las pruebas un intervalo de confianza del 95% existiendo significancia estadística para $p < 0,05$. En general se realizaron al menos tres ensayos independientes especificando el número de ensayos (n) en cada descripción de las figuras. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graph Pad Prism 6™ (Graph Pad Software Inc., Estados Unidos).

4. RESULTADOS.

4.1 Descripción de las características clínicas y de laboratorio de las pacientes incluidas en el estudio.

Los grupos de mujeres sanas (SHN) y morbilidad gestacional negativos (MG) no presentaron positividad para ninguno de los anticuerpos antifosfolípido (aAFL).

El grupo de morbilidad gestacional y trombosis (MG/TV+) en su mayoría presentó positividad para todas las pruebas aprobadas en los criterios revisados de Sapporo (1). A pesar de que el grupo morbilidad gestacional-seronegativo (MG-SN) no presentó positividad para los aAFL criterio, se decidió incluir en el estudio, ya que presentaron un fenotipo de SAF y positividad para algunos anticuerpos considerados no-criterio (principalmente anti-fosfatidilglicerol), detectados por un ELISA casero fabricado y estandarizado en nuestro grupo de investigación. La aceptación de estas pacientes como SAF ha sido un tema de debate, debido a que se han asociado los aAFL no-criterio con la activación de mecanismos inflamatorios más que trombóticos con una morbilidad importante (12). En estudios de nuestro grupo se halló una disminución en la invasión trofoblástica por esta población de aAFL del grupo MG-SN (65), por lo cual se quiso

evaluar los efectos de estos sobre células endoteliales. En el grupo de pacientes trombosis aislada (TV+), se presentó positividad para la mayoría de las pruebas realizadas, lo cual lo hace un grupo interesante de evaluar ya que se podrían ver diferentes mecanismos de daño, activados por este grupo de mujeres con SAF trombótico solamente. Los datos clínicos y de laboratorio se presentan en la Tabla 1.

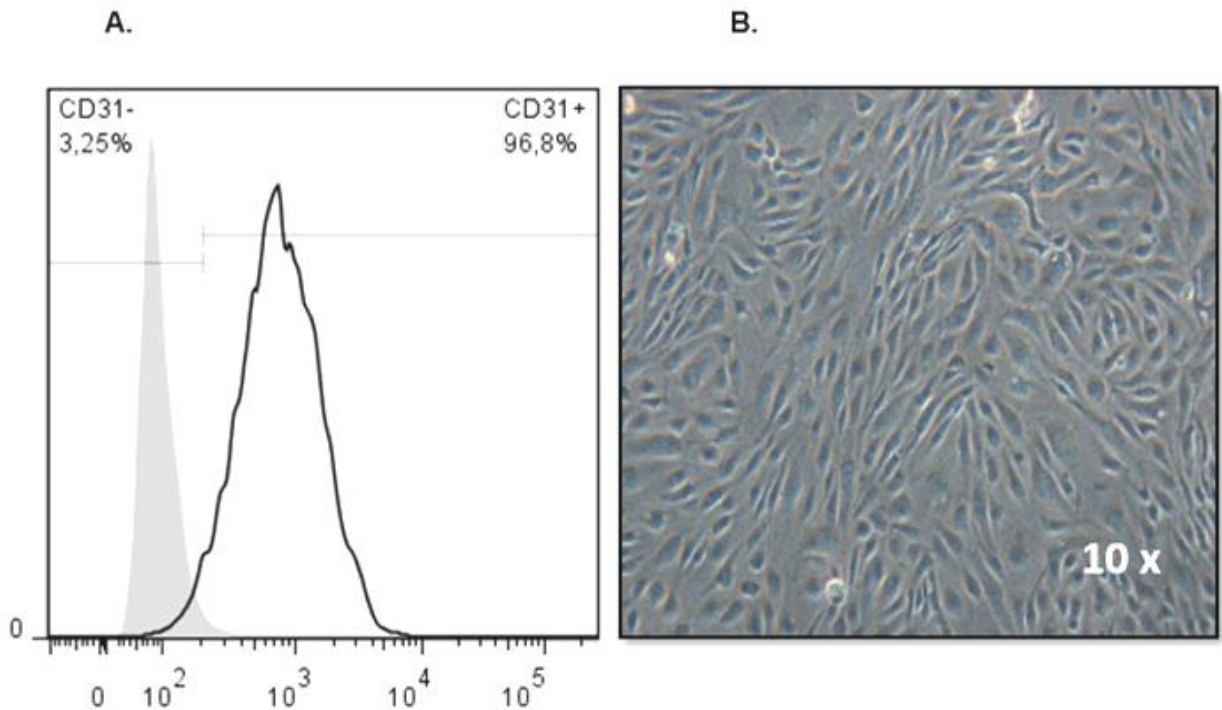
Tabla 1. Análisis clínico y de laboratorio de las pacientes incluidas en el estudio.

Parámetro	SHN (n=10)	MG (n=10)	MG/TV+ (n=10)	MG-SN (n=10)	TV+ (n=10)	
Edad (media de años +/- SD)	37,6 +/- 7,6	30,9 +/- 5,5	36,2 +/- 5,8	32,5 +/- 4,6	32,8 +/- 9,9	
Pérdidas gestacionales (media y rango)						
≤ 10 semanas de gestación	0	1,9 (1-3)	1,3 (1-5)	1,2 (1-2)	0	
> 10 semanas de gestación	0	0,7 (1-3)	1,7 (1-5)	0,9 (1-4)	0	
Preeclampsia <34 semanas (número de pacientes)	0	0	6	0	0	
Restricción del crecimiento intrauterino	0	0	2	0	0	
Trombosis arterial/venosa (número de pacientes)	0	0	10	0	10	
Anticoagulante lúpico (promedio +/- SD) (Valor positivo > 1.2)	1,06+/-0,05	1,13+/-0,01	2,38 +/- 0,28	1,13+/-0,09	2,48 +/- 0,13	
IgG Anti-β2 glicoproteína I en suero (U/mL) (Valor positivo > 15 U)	6,69	0	148,2	0	105,1	
IgG Anti-cardiolipina en suero por el ELISA comercial (GPL/mL) Valor positivo >10 GPL	2,29	2,29	85,3	1,82	24,62	
IgG Anti-cardiolipina en suero por el ELISA estandarizado en laboratorio (% del control) Valor positivo >25%	24	19	49,1	100	20,6	
IgG Anti-β2 glicoproteína I en 250 µg/mL de IgG purificada de los sueros (U/mL) Valor positivo > 7U	3,34	1,88	74,8	2,37	28,11	
IgG Anti-cardiolipina por el ELISA comercial en 250 µg/mL de IgG purificada de los sueros (GPL/mL) Valor positivo >10 GPL	4,95	3,85	82,9	4,97	21,8	
Anticuerpos antifosfolípidos “no-criterio” (% del control) Valor positivo >25%	GPG	17,0	24,0	66,5	176,9	4,5
	GPA	0,9	3,7	114,8	23,0	44,7
	GPS	0,9	4,6	18,2	20,5	26,7
	GPE	4,3	16,8	3,6	25,5	53,1

4.2 Verificación de la pureza y rendimiento de las células HUVEC.

Las células HUVEC fueron cultivadas en frascos de 75T hasta obtener confluencia, con un rendimiento aproximado de 1×10^6 células por frasco. En la Figura 5A se puede observar un histograma representativo del marcador CD31, realizado en cuatro clones de estas células. La pureza de las células HUVEC, se mantuvo en un 96,8% del cultivo. Imagen de células HUVEC en cultivo Figura 5B.

Figura 5. Verificación de la pureza de las células HUVEC.



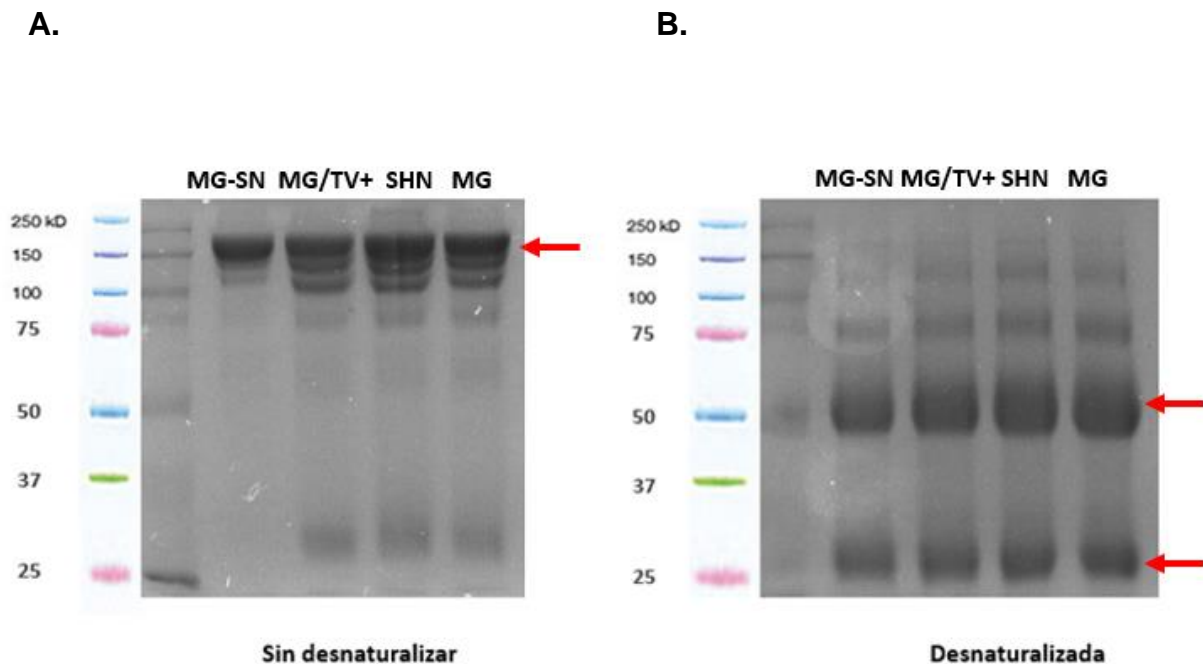
A) Se determinó la expresión del marcador de células endoteliales CD31 por citometría de flujo, obteniéndose un 96,8% de las células positivas e indicando un alto grado de pureza del cultivo. **B)** Imagen representativa de las células HUVEC después de 4 días en cultivo, observadas con una magnificación a 10X.

4.3 Verificación de la integridad de las IgG policlonales obtenidas de los sueros de las pacientes incluidas en el estudio.

La purificación de la IgG total se realizó por cromatografía de afinidad a partir de pool de sueros conformados por los grupos de estudio; luego de esto se verificó su pureza e integridad por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones reductoras y no reductoras. En la Figura 6A, se observan las IgG sin desnaturalizar en la banda de 150 kDa, y en la Figura 6B se observan dos bandas en condiciones reductoras, correspondientes a la cadena pesada (50 kDa) y a la cadena liviana (25 kDa). Se puede observar algunas bandas de más de 75 kDa que podrían corresponder a fragmentos

Figura 6. Verificación de la pureza e integridad de la IgG policlonal.

peptídicos, como resultado de la presión del sistema de purificación sobre la IgG según lo descrito por Velásquez G. y cols (67).



Se realizó electroforesis SDS-PAGE en geles al 8% de acrilamida, cargando 30 μ g de la IgG purificada de cada uno de los grupos de estudio. **A)** Se observa una banda (flecha roja) en condiciones no reductoras a la altura de 150 kDa correspondiente a la IgG sin desnaturalizar. **B)** En condiciones reductoras, se observan dos bandas bien definidas correspondientes a la cadena pesada y liviana (50 y 25 kDa respectivamente, indicadas por las flechas rojas).

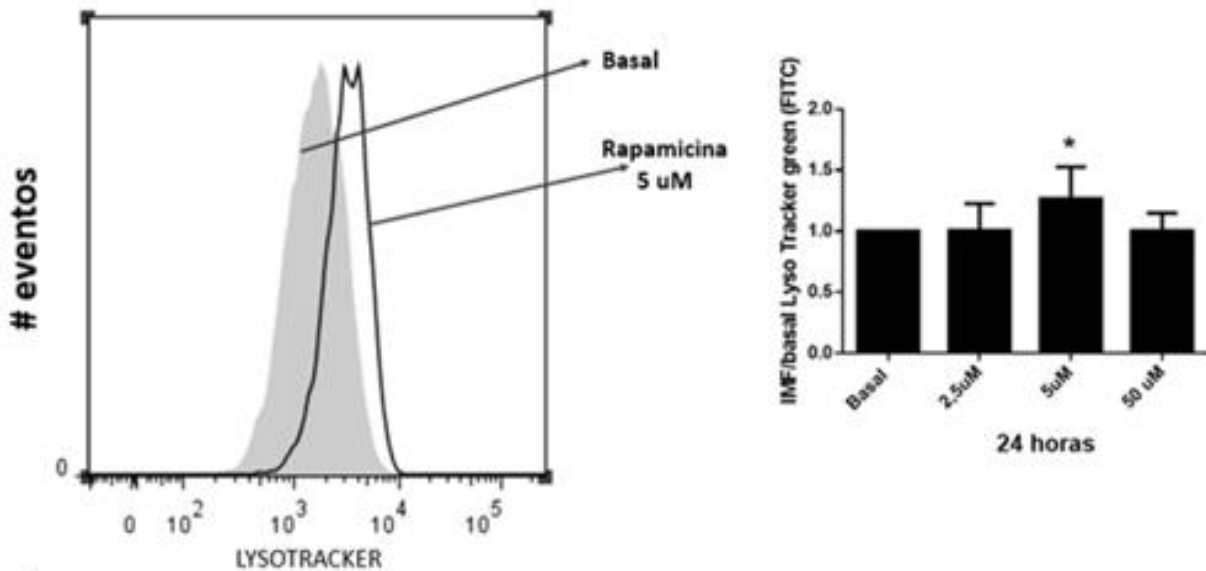
4.4 Acidificación lisosomal inducida por los aAFL en las células endoteliales.

Se realizó citometría de flujo para evaluar acidificación lisosomal con LysoTracker green. Sobre la población de células viables, se tuvo en cuenta el parámetro de intensidad mediana de fluorescencia (IMF). Se trataron las células HUVEC con rapamicina (inhibidor de mTOR) a concentraciones de 2.5, 5 y 50 μM durante 24 horas (Figura 7A), observando un incremento significativo en la intensidad mediana de fluorescencia (IMF) con 5 μM e indicando acidificación lisosomal.

Después de realizar los estímulos con diferentes concentraciones de IgG de los grupos SHN y MG/TV+ (100 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas, se observó un incremento significativo en la acidificación lisosomal con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la IgG del grupo MG/TV+, comparado con el de la IgG del grupo SHN (Figura 7B). De acuerdo con esto, se definió 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como la concentración para los posteriores ensayos. Se realizaron estímulos con la IgG de todos los grupos de estudio, observando un aumento estadísticamente significativo en la acidificación lisosomal con la IgG del grupo TV+ respecto al SHN (Figura 7C). Posteriormente se evaluó la modulación por las ATL sobre los efectos de los aAFL, incubando simultáneamente las células endoteliales con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG más ATL 100 nM, y se observó un aumento significativo en la acidificación lisosomal cuando se usó ATL con IgG del grupo MG/TV+ (Figura 7D).

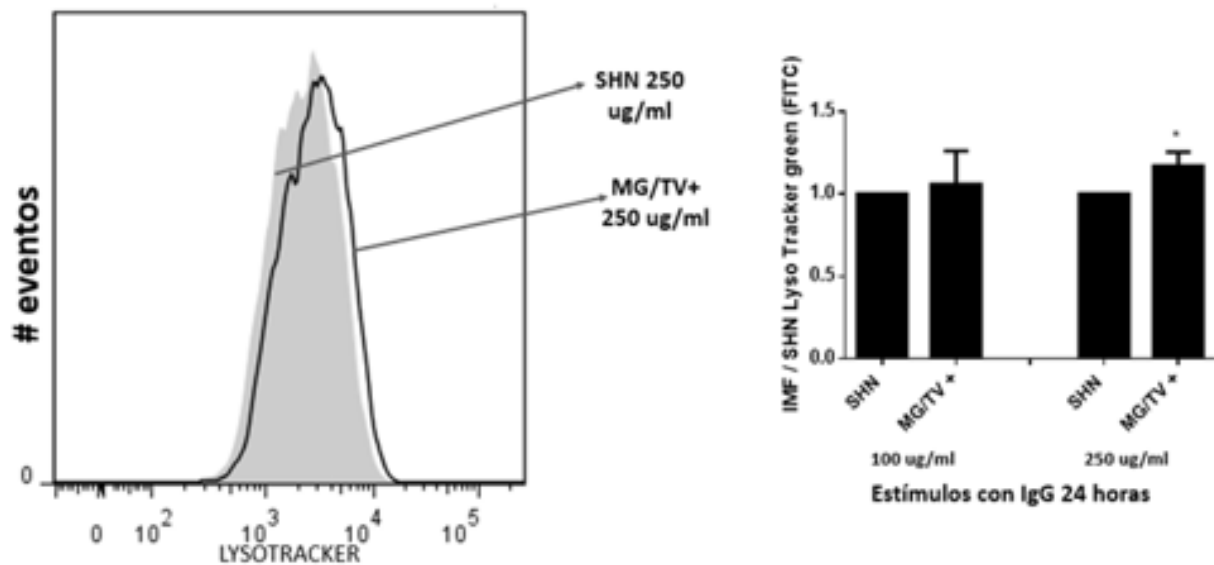
Figura 7. Acidificación lisosomal inducida por los aAFL.

A.



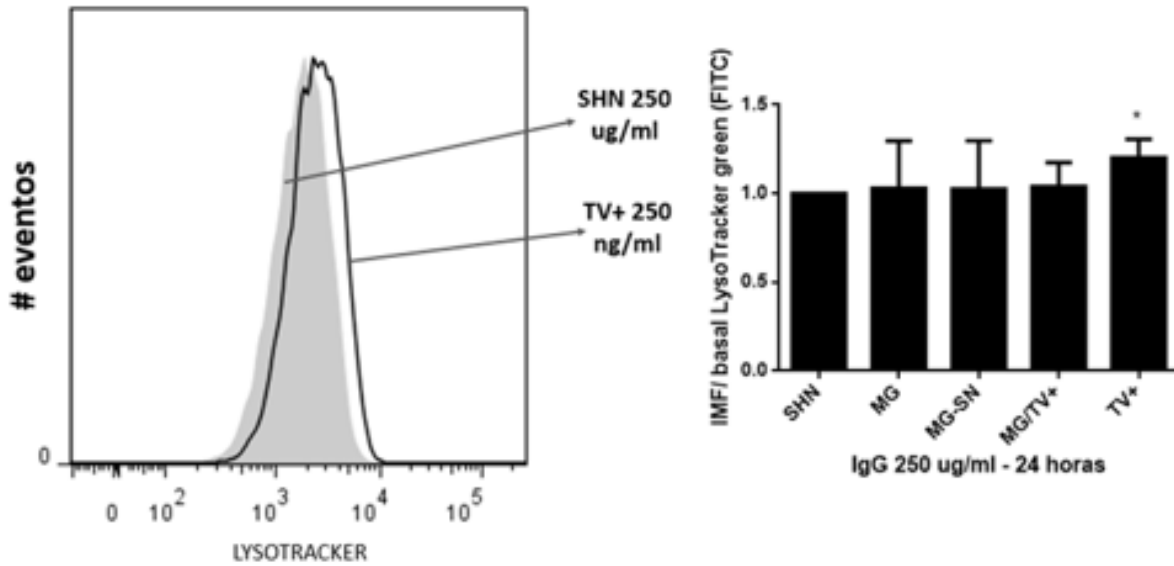
Las células HUVEC fueron incubadas con rapamicina a concentraciones de 2.5, 5 y 50 μ M, por 24 horas. Se observa aumento en IMF/Lyso tracker green con 5 μ M, (* p <0,05 Kruskal-Wallis más post-test de Dunns n =5).

B.



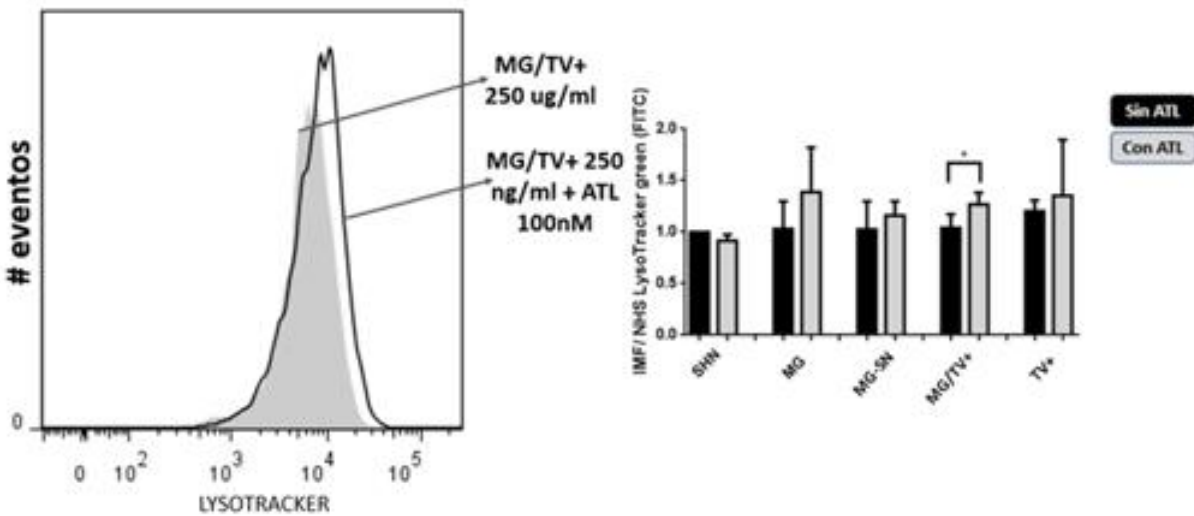
Estandarización de la respuesta celular a diferentes concentraciones de IgG, (* p <0,05 t-Student n =3). Se estimularon las células HUVEC con 250 μ g/mL de IgG de todos los grupos, encontrándose un aumento significativo con IgG del grupo TV+, (* p <0,05 Kruskal-Wallis más post-test de Dunns n =6).

C.



Se estimularon las células HUVEC con 250 $\mu\text{g/mL}$ de IgG de todos los grupos, encontrándose un aumento significativo con IgG del grupo TV+, (* $p < 0,05$ Kruskal-Wallis más post-test de Dunns $n=6$).

D.



Ensayos para evaluar efectos de ATL sobre la acidificación lisosomal, observándose aumento de IMF/LysoTracker para el grupo MG/TV+ con ATL a 100 nM, (* $p < 0,05$ t-Student $n=6$). Los datos son expresados como la media más la desviación estándar y fueron normalizados con el grupo SHN.

4.5 Inducción de hiperpolarización mitocondrial por los aAFL sobre células endoteliales.

Se evaluó el potencial mitocondrial con DIOC-6 en células HUVEC estimuladas con aAFL de las mujeres incluidas en el estudio. las células viables se discriminaron con el uso de yoduro de propidio (IP) el cual marca el ADN y en este caso las células permeables al IP, que se consideran no viables. (Figura 8A). Sobre la población de células viables, se determinó la intensidad mediana de fluorescencia (IMF).

Se usó como control positivo el TNF- α (Figura 8B), obteniéndose aumento estadísticamente significativo del potencial mitocondrial con 500 ng/ml por 24 horas. Los estímulos con la IgG se realizaron con 250 μ g/mL durante 24 horas, observando que la IgG del grupo MG/TV+ incrementó la hiperpolarización mitocondrial de forma significativa respecto al grupo control SHN (Figura 8C). También se observa una tendencia al aumento de hiperpolarización mitocondrial con el grupo TV+, pero no fué significativo. Posteriormente, se evaluó la capacidad de las ATL de modular el efecto inducido por la

Figura 8. Inducción de hiperpolarización mitocondrial por los aAFL en células endoteliales.

IgG, estimulando las células con la misma cantidad de IgG con y sin ATL a una concentración de 100 nM, sin embargo, no se observó ningún efecto de las ATL (Figura 8D).

A.

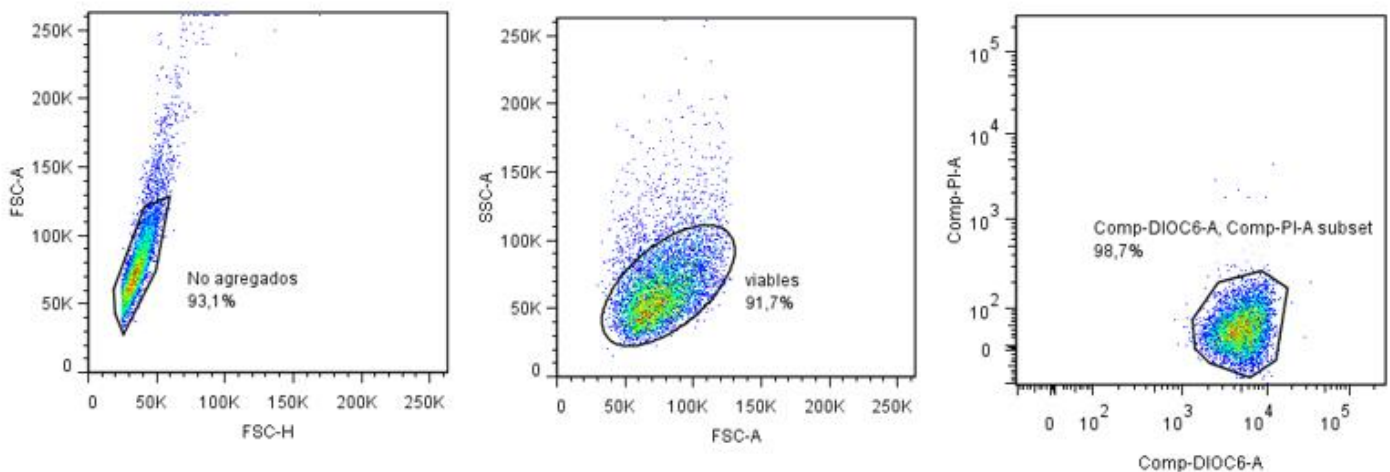
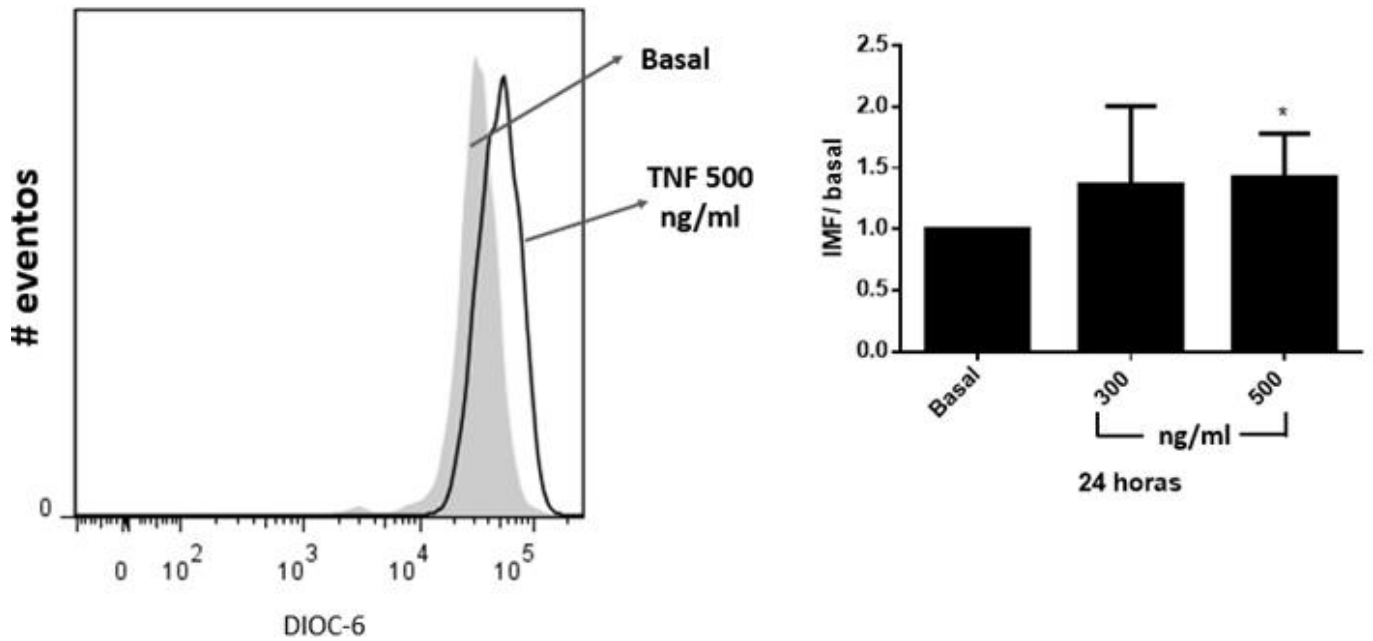


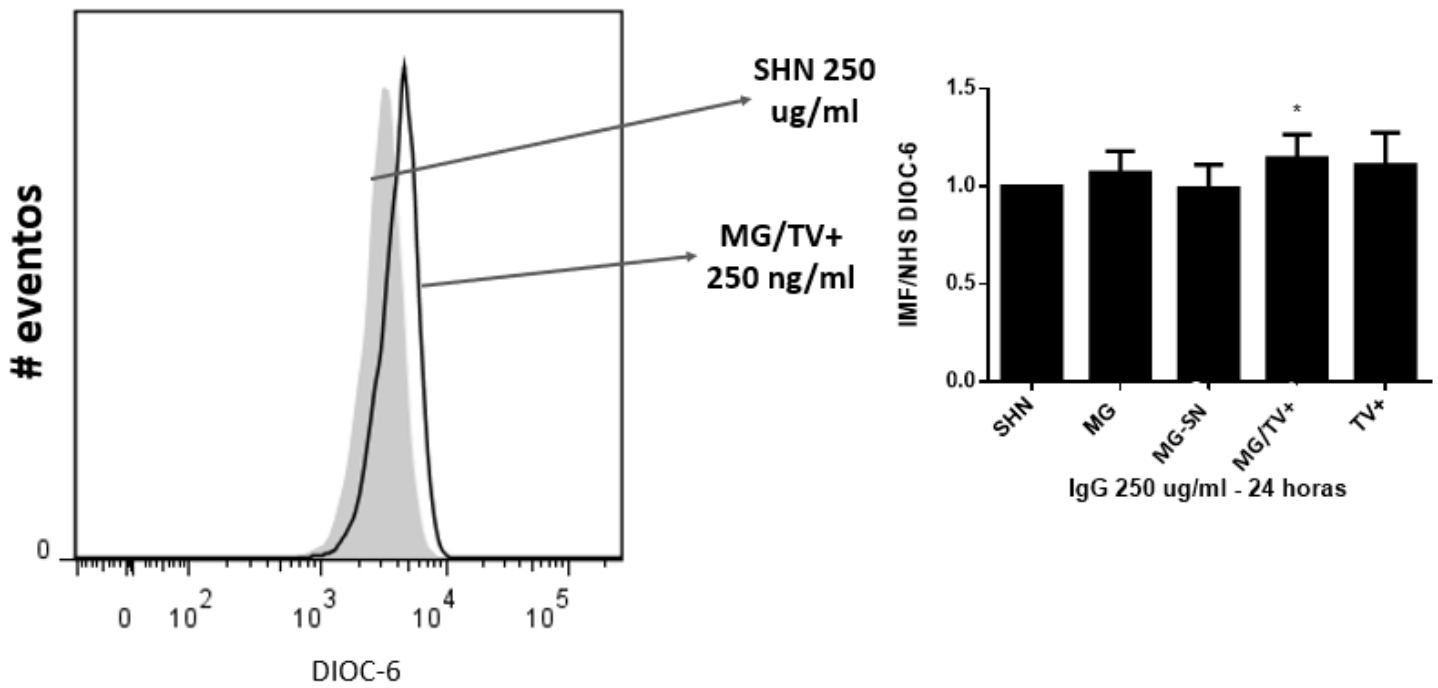
Imagen representativa del análisis de citometría de flujo para seleccionar la población de células analizada.

B.



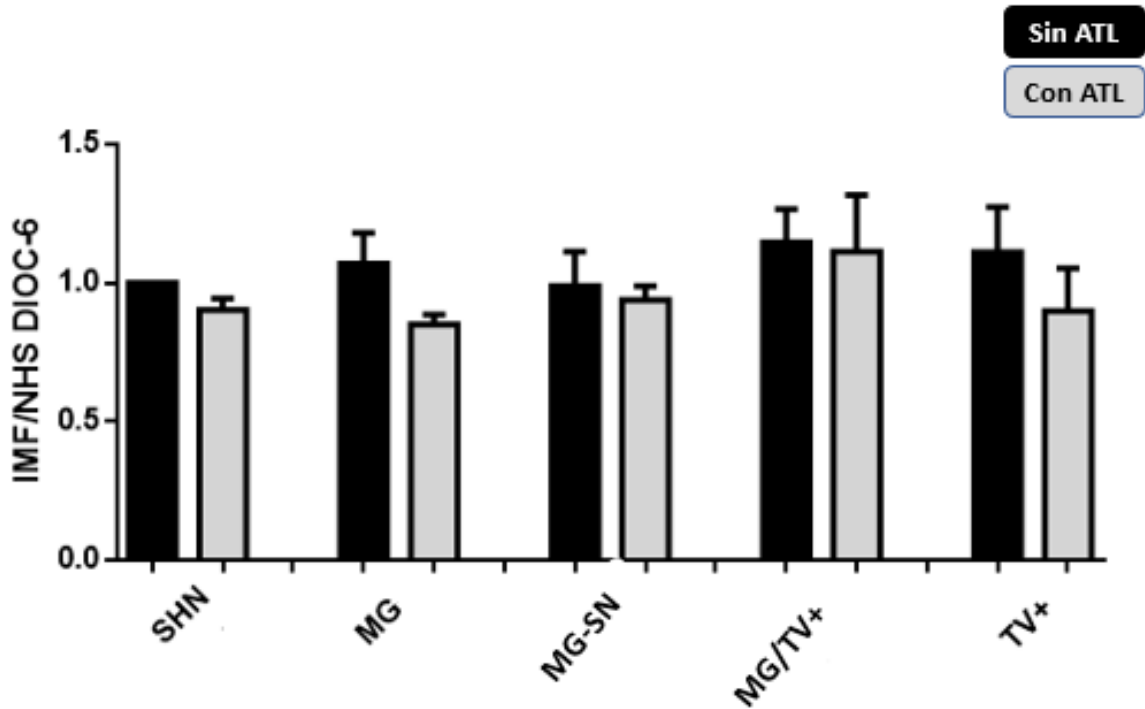
Inducción de hiperpolarización mitocondrial por TNF- α determinado por la IMF de DIOC-6 a concentraciones de 300 y 500 ng/ml por 24 horas. Se observó aumento significativo con 500 ng/mL, respecto al estado basal, (* $p < 0,05$ Kruskal-Wallis más post-test de Dunns $n=5$).

C.



Las células HUVEC fueron estimuladas con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG de todos los grupos de estudio. Se observa aumento en la hiperpolarización con IgG del grupo MG/TV+, (* $p < 0,05$ Kruskal-Wallis más post-test de Dunns $n=6$).

D.



No se observan diferencias significativas con el uso de ATL 100 nM respecto a los efectos de los aAFL, (Mann Whitney test; n=6) Los datos son expresados como la media más la desviación estándar y fueron normalizados con el grupo SHN.

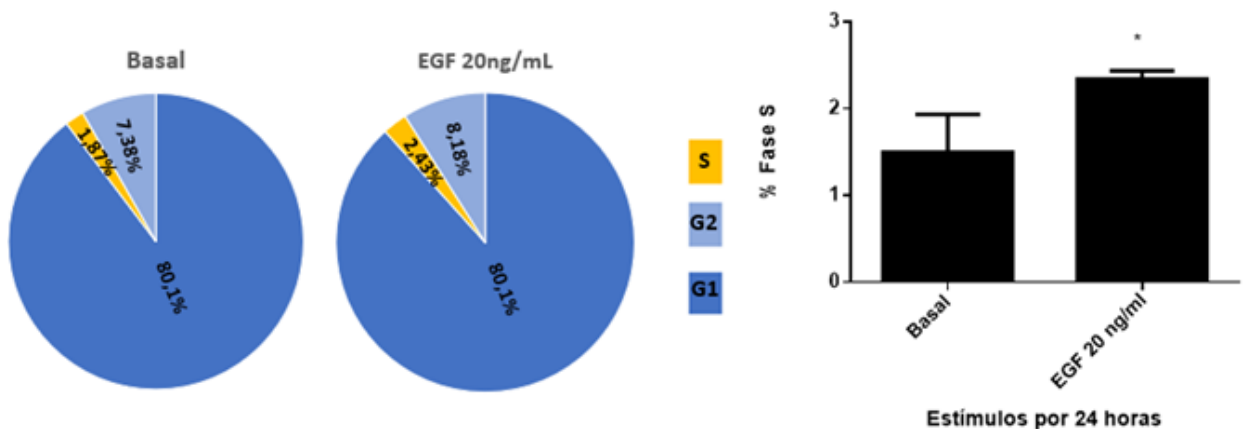
4.6 Los aAFL promueven la entrada al ciclo celular de las células endoteliales de la misma forma que lo hace la IgG del grupo MG.

Se evaluó el ciclo celular mediante marcación con yoduro de propidio (IP) que permite analizar el contenido de ADN y la expresión de Ki-67 para evaluar la proliferación celular por citometría de flujo. Las células HUVEC fueron estimuladas con EGF 20 ng/mL como control positivo, o con IgG de cada uno de los grupos a 250 µg/mL durante 24 horas. Para el análisis de la expresión de Ki-67 se tuvo en cuenta la intensidad mediana de fluorescencia, y para evaluar el ciclo celular, se determinó el porcentaje de células en las fases G1, S y G2 según la incorporación del IP. Se encontró que el EGF indujo aumento en el porcentaje de células en fase S del ciclo celular respecto al estado basal (Figura9A). Adicionalmente, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células en fase

S al ser tratadas con IgG de los grupos MG, MG-SN, MG/TV+ y TV+ respecto al grupo SHN (Figura 9B), lo cual puede asociarse al aumento en la proliferación celular observada en otros estudios con aAFL sobre células endoteliales (27). Por último, se evaluó el efecto de las ATL sobre el aumento del porcentaje de células en fase S (Figura 9C), pero no se obtuvo diferencias significativas respecto a los efectos de las IgG solas. En estos mismos ensayos se evaluó la expresión del antígeno nuclear, sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de esta proteína inducidos por los aAFL (Figura 9D).

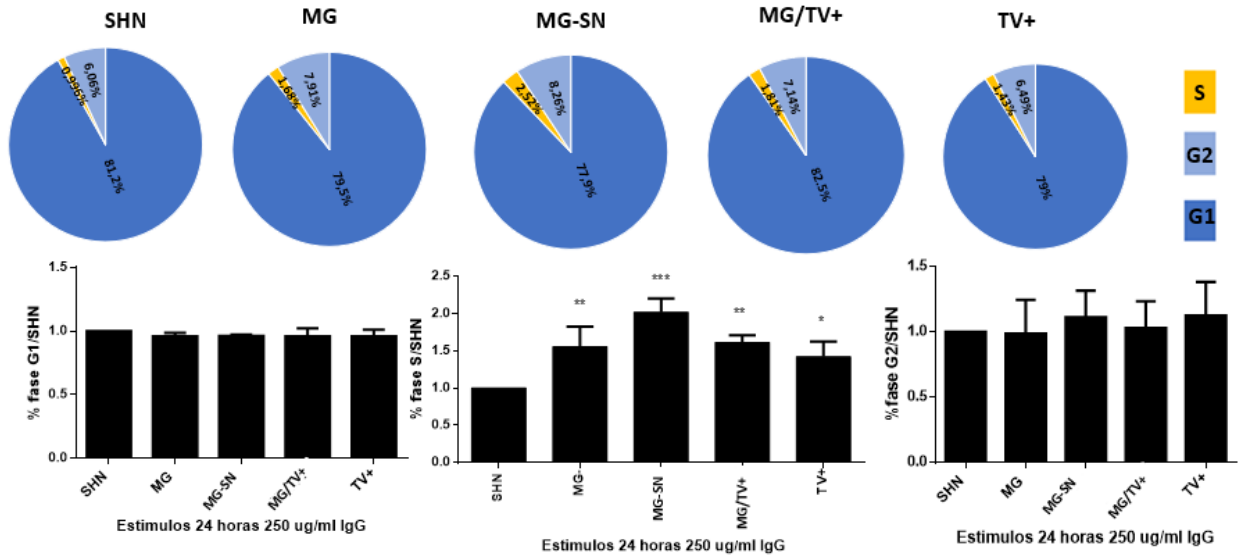
Figura 9. Los aAFL promueven la entrada al ciclo celular de las células endoteliales de la misma forma que lo hace la IgG del grupo MG.

A.



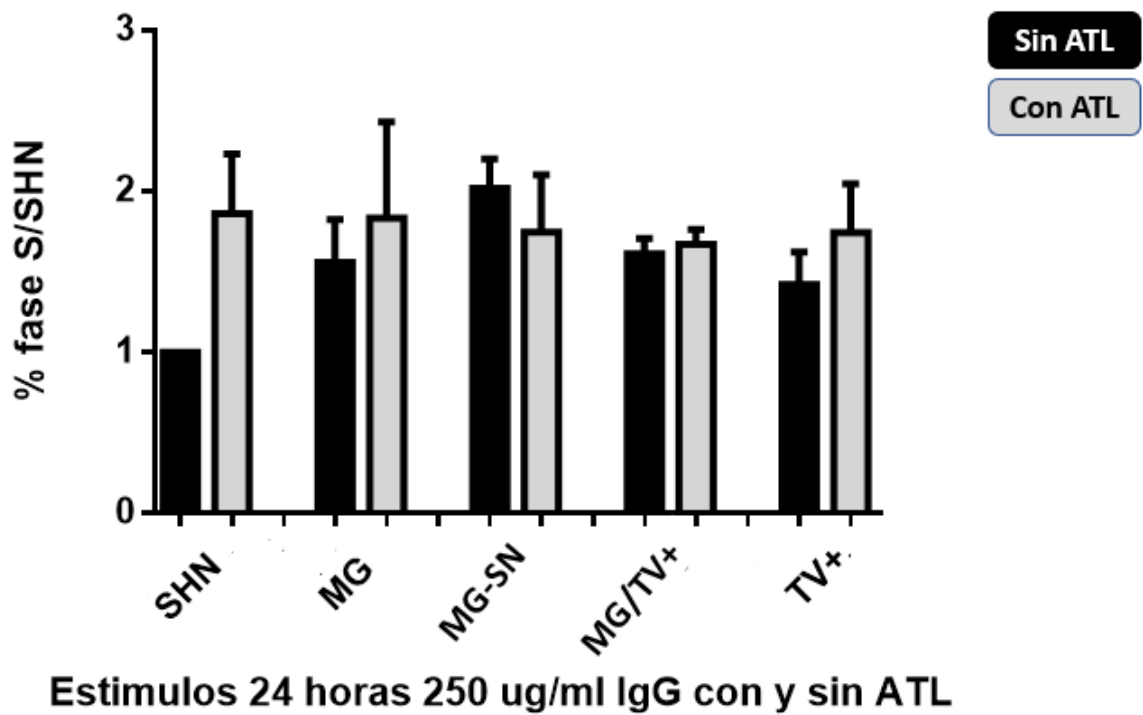
Estandarización de la técnica para evaluar el ciclo celular con IP en las células HUVEC, usando 20 ng/mL EGF como control positivo, (* $p < 0,05$ t-Student $n=3$).

B.



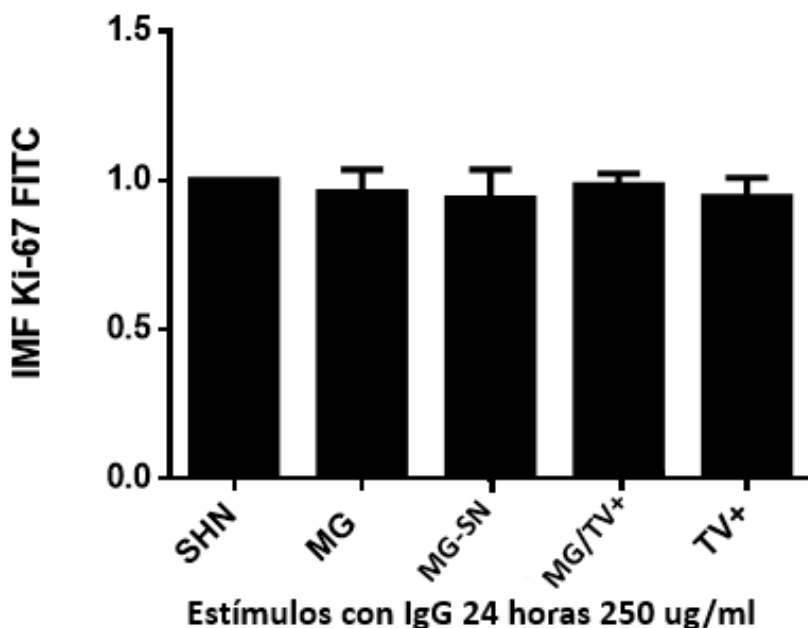
Células HUVEC estimuladas con 250 µg/mL de la IgG de los grupos de estudio por 24 horas, evaluando las fases G1, S y G2. La IgG de los grupos MG, MG-SN, MG/TV+, TV+ indujeron un aumento en el porcentaje de las células en fase S, (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; Kruskal Wallis más post-test de Dunns n=3).

C.



Estímulos con IgG y 100 nM de ATL, no se observaron diferencias entre células con y sin ATL, sin embargo, al observar el comportamiento del grupo SHN, se observa un aumento en el porcentaje de células en fase S, probablemente por un aumento de viabilidad de las mismas al usar ATL, lo cual no se logra rescatar cuando se adicionan los aAFL (t-Student n=3).

D.



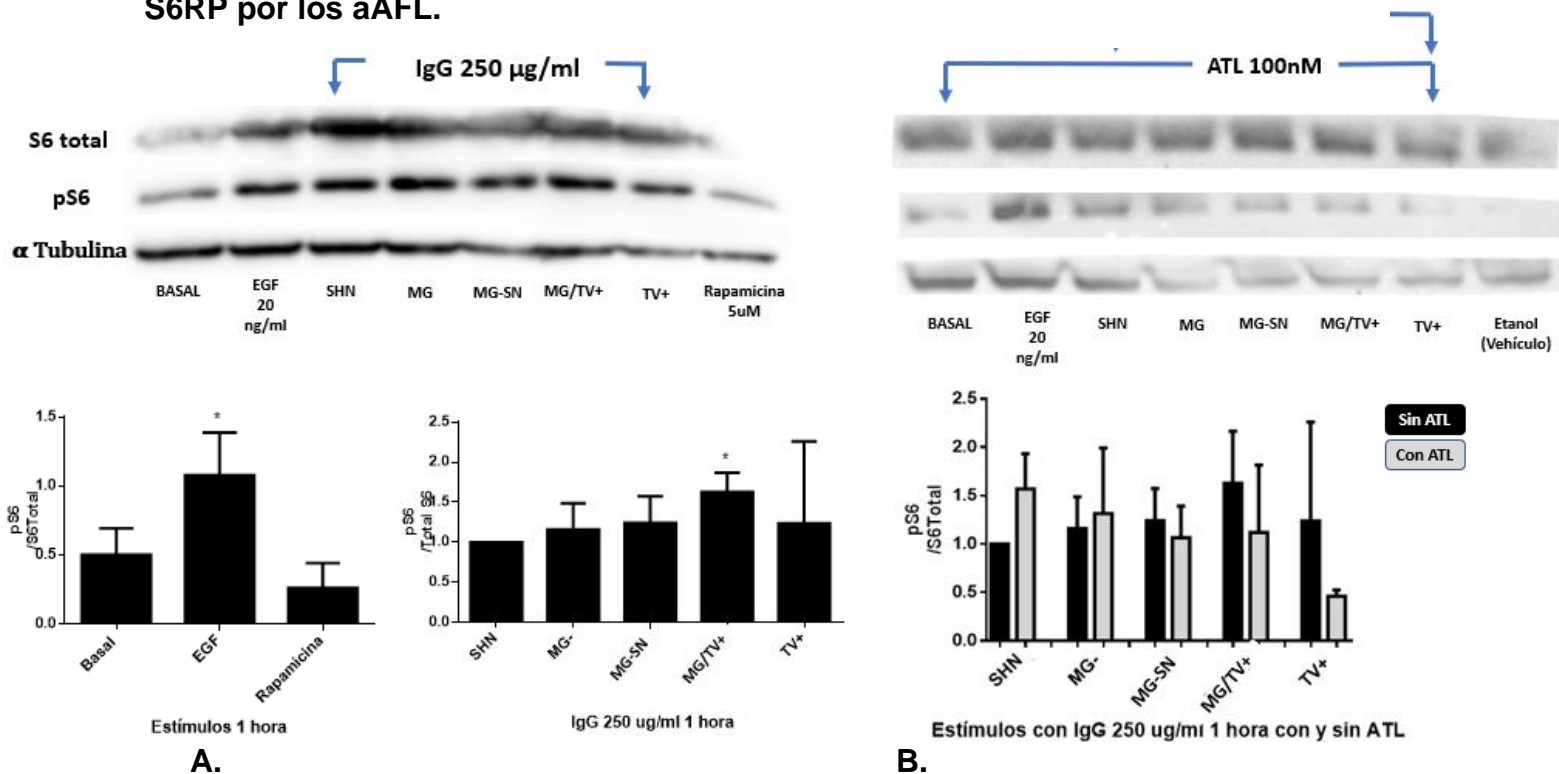
Detección del antígeno nuclear Ki-67. No se observa correlación con la evaluación del ciclo celular, (Kruskal-Wallis n=3). Los datos se presentan como la media más la desviación estándar y fueron normalizados con el grupo SHN.

4.7 Activación de mTOR inducida por los aAFL como un mecanismo inductor de proliferación celular.

Se realizaron ensayos de Western blot para evaluar el efecto de los aAFL sobre la activación de S6RP, como evidencia de la activación del complejo mTORC1 a través de la S6K. Se estimularon las células HUVEC con 20 ng/mL de EGF y 5 μ M de rapamicina como controles positivo y negativo respectivamente, para luego usar 250 μ g/mL de IgG de los grupos, con un tiempo de estímulo de 1 hora (Figura 10A). Se observó un aumento

en la fosforilación de S6 ribosomal inducida por la IgG del grupo MG/TV+ respecto al grupo SHN. Luego se evaluó el efecto de las ATL sobre la activación de S6RP inducida por los aAFL, usando 100 nM de ATL en las mismas condiciones evaluadas inicialmente (Figura 10B). No se observó modulación de la ATL sobre los efectos de los aAFL sobre la activación de S6 ribosomal.

Figura 10. Evaluación de la activación de mTOR, a través de la fosforilación de S6RP por los aAFL.

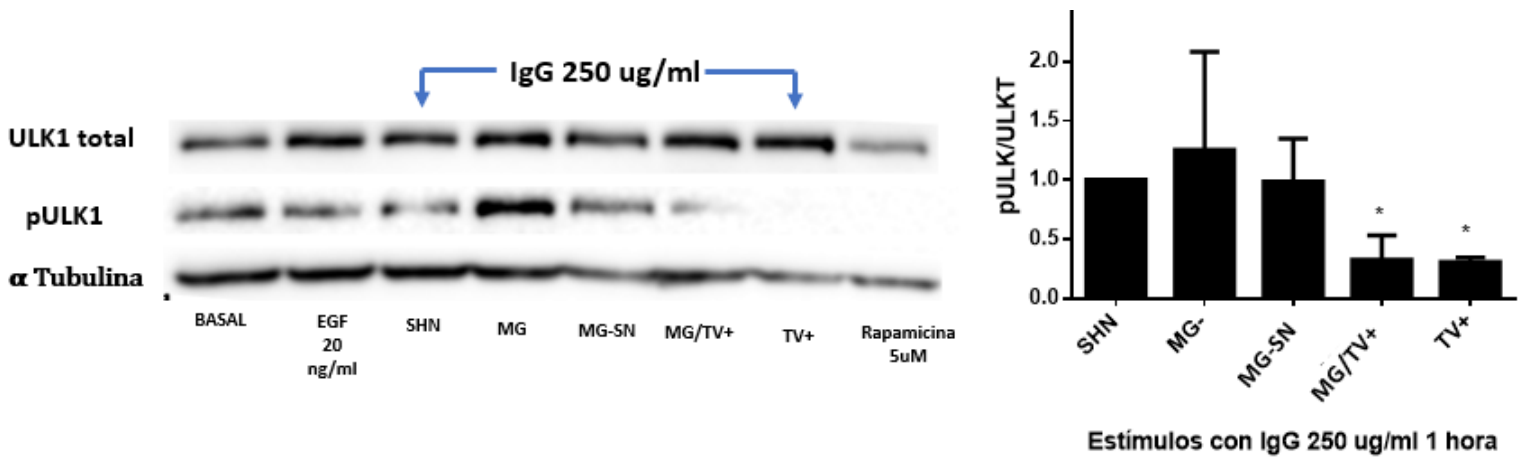


A) Estímulos con 250 µg/mL de la IgG de los grupos de estudio y los controles 20 ng/mL EGF y 5 µM rapamicina durante 1 hora. Se observa un aumento en la activación de S6RP inducida por la IgG del grupo MG/TV+, (*p<0,05; Kruskal Wallis más post-test de Dunns n=5). **B)** En las mismas condiciones anteriores, se adicionó 100 nM de ATL. No se observó un efecto modulador sobre las acciones de la IgG, (t-Student; n=5). Los datos se muestran como la media más la desviación estándar y fueron normalizados con el grupo SHN. En el eje Y relación pS6/ S6 total, eje X estímulos.

4.8 La activación de ULK1 indica una inducción de eventos autofágicos tempranos generados por los aAFL.

Se estimularon células HUVEC con los aAFL con el control positivo EGF 20ng/mL y negativo rapamicina 5uM, observándose una disminución en la fosforilación de ULK1 inducida por la IgG de los grupos MG/TV+ y TV+, respecto al grupo SHN (Figura 11), indicando un aumento en la actividad temprana de autofagia ya que esta fosforilación es inhibitoria de la actividad de ULK1.

Figura 11. Activación de ULK1 por los aAFL.

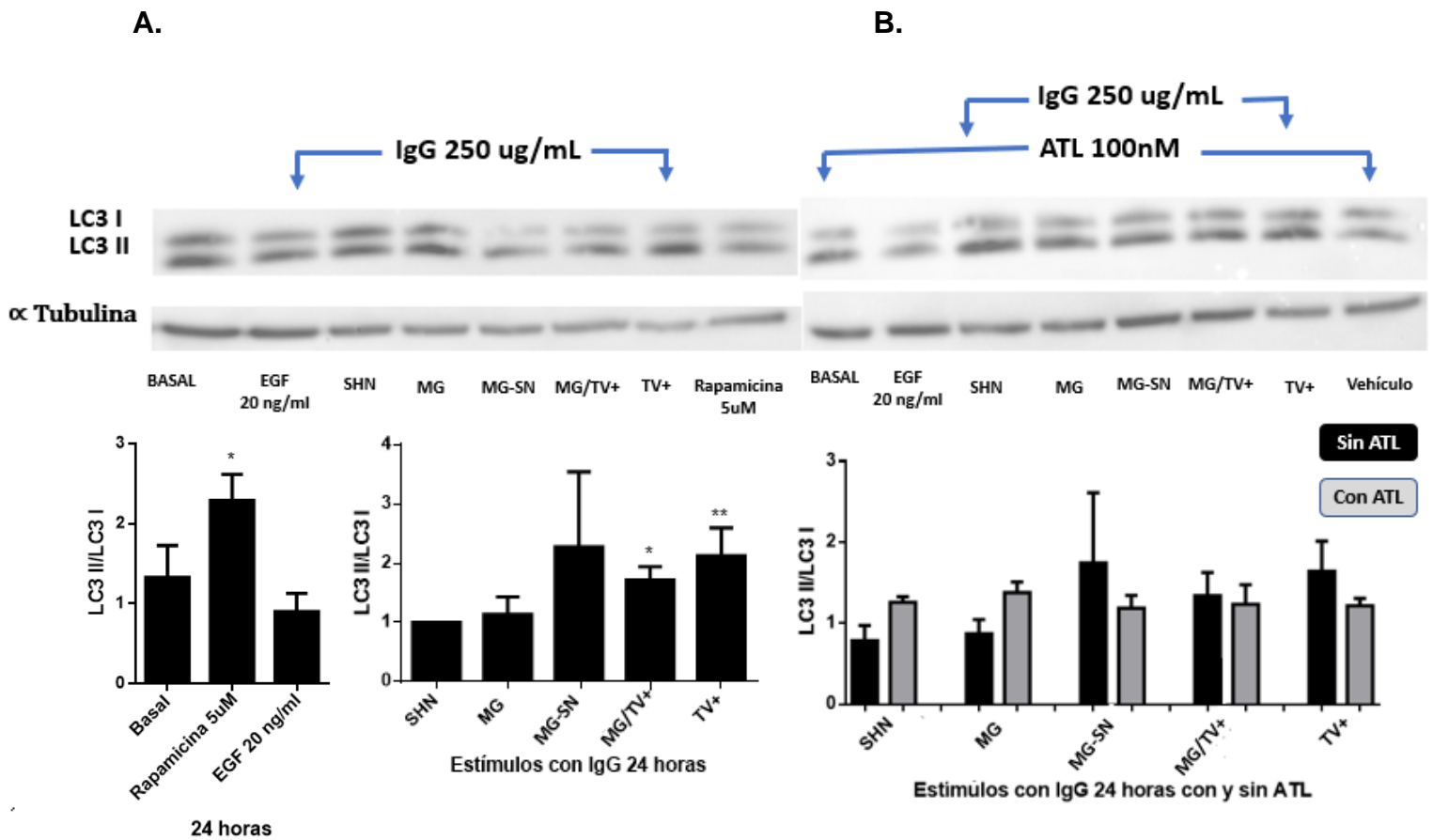


Estímulos con 250 µg/mL de la IgG de los grupos de estudio y los controles 20 ng/mL EGF y 5 µM rapamicina durante 1 hora. Se observó desfosforilación de ULK1 inducida por la IgG de los grupos MG/TV+ y TV+, (* p<0,05; Kruskal Wallis más post-test de Dunns; n=4). Los datos se muestran como la media más la desviación estándar y fueron normalizados con el grupo SHN. En el eje Y relación pULK1/ULK total, eje X estímulos.

4.9 Maduración de LC3 inducida por los aAFL como indicador de eventos autofágicos tardíos.

Se evaluó el efecto de los aAFL sobre los eventos tardíos de autofagia (aumento en la relación LC3 II/I) en las células HUVEC, con 250 µg/mL de IgG de los grupos de estudio y los controles EGF y rapamicina por 24 horas (Figura. 12A), observándose un aumento en la expresión de LC3-II inducido por la IgG de los grupos MG/TV+ y TV+, en forma similar a la rapamicina, por inhibición de mTOR. Posteriormente, se evaluó el efecto de las ATL sobre la maduración de LC3 (Figura. 12B), sin encontrar ningún efecto modulador sobre los efectos de los aAFL.

Figura 12. Inducción de autofagia por los aAFL en células endoteliales.

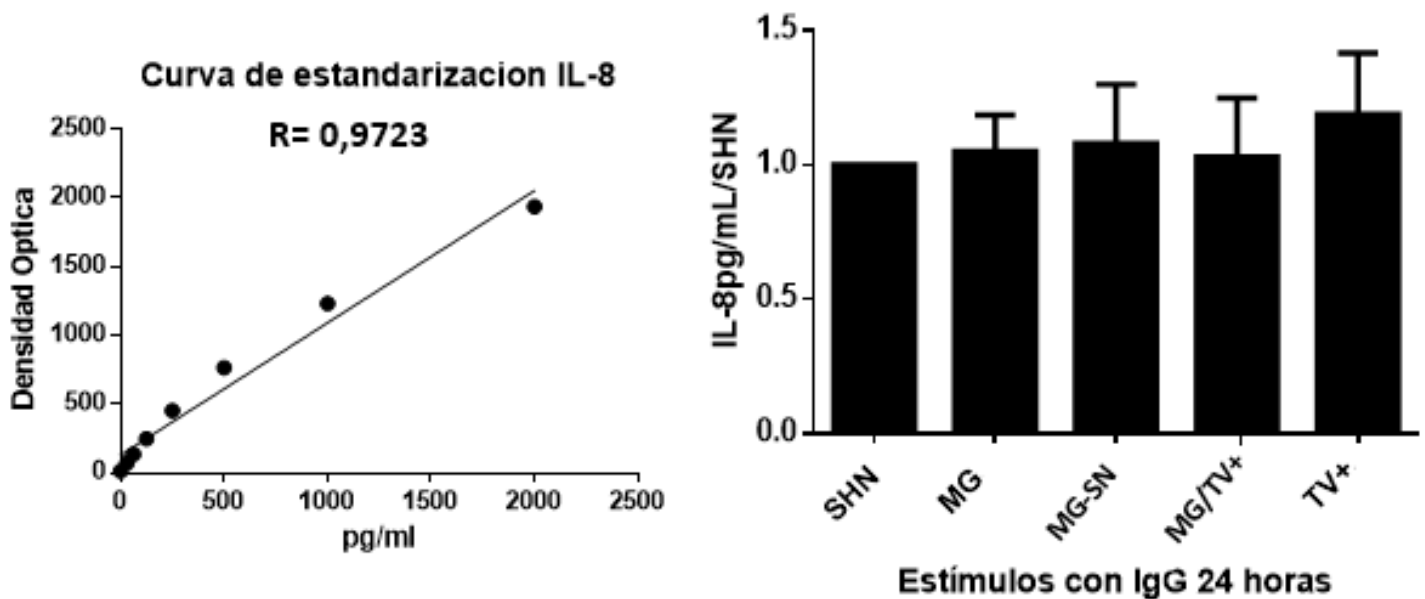


A) Imagen representativa de ensayo de Western blot de células estimuladas con 250 µg/mL de IgG de los grupos de estudio y los controles. Se observó un aumento en la relación LC3II/I inducida por la IgG de los grupos MG/TV+ y TV+, (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; ANOVA 1 vía más Holm-Sidak $n=3$). **B)** Ensayos con ATL para determinar la modulación de los efectos de la IgG sobre células endoteliales. No se observaron efectos significativos, (t-Student $n=3$). Los datos se muestran como la media más la desviación estándar. En el eje Y relación LC3II/I, eje X estímulos.

4.10 Efecto de los aAFL sobre la producción de IL-8 e IL-1β en células endoteliales.

Se evaluó el efecto de la IgG de los grupos de estudio sobre las células HUVEC en la producción de IL-8 e IL-1β, usando 250 µg/mL de IgG por 24 horas y determinando la concentración de estas dos citoquinas en los sobrenadantes mediante un ELISA. No se encontraron diferencias en la producción de IL-8 respecto al grupo SHN (Figura 10), y al evaluar IL-1β no se logró detectar esta citoquina en los sobrenadantes de estas células (datos no mostrados).

Figura 13. Efecto de los aAFL sobre la producción de citoquinas proinflamatorias.



Estímulos con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG de los grupos de estudio durante 24 horas. Se muestran las curvas estándar para el ensayo de ELISA de IL-8 (A). No se observa diferencias en la producción de IL-8 (B). Los datos se muestran como la media más la desviación estándar y fueron normalizados con el grupo SHN (Kruskall Wallis $n=5$).

5. DISCUSIÓN.

Las alteraciones inducidas por los anticuerpos antifosfolípido sobre el metabolismo celular y de cómo repercuten estos eventos en las manifestaciones clínicas de los pacientes con esta enfermedad ha sido poco estudiado. Sin embargo, en el estudio de otras enfermedades autoinmunes como LES y artritis reumatoide, se han abordado este tipo de conceptos y su relación, o sus efectos, en la respuesta inmune. Allí se ha encontrado que los mecanismos por los cuales se regula la homeostasis y el metabolismo celular pueden ser muy variables dependiendo de los modelos utilizados. La mayoría de estos estudios convergen en respuestas que clásicamente han sido relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis y que se activan como mecanismos de rescate y supervivencia (24, 68)

En el presente estudio, se evaluó el efecto de las IgG de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del SAF sobre marcadores de función mitocondrial, lisosomal y de proliferación celular. Asimismo, se evaluaron algunos marcadores moleculares relacionados con la proliferación celular y la autofagia además de la producción de algunas citoquinas proinflamatorias. Se encontraron efectos de las IgG de las mujeres con trombosis aislada y con morbilidad gestacional y trombosis, positivas para los aAFL criterio. En contraste con estudios previos de nuestro grupo (55, 62, 65) (Granada M, manuscrito en preparación), las IgG de las mujeres con SAF obstétrico, que eran positivas solo para los aAFL no-criterio, no tuvieron efecto sobre los parámetros evaluados. De forma general se observó un aumento en la hiperpolarización mitocondrial, acidificación lisosomal y porcentaje de células en fase S del ciclo celular, lo último relacionado con proliferación celular, así mismo se encontraron aumentados algunos marcadores de autofagia y actividad de mTORC1, y no se observó ningún efecto modulador por parte de las ATL en los parámetros evaluados.

5.1 Los aAFL generan disfunción endotelial mediante la disrupción de la homeostasis celular: papel de la mitocondria en la generación de estrés oxidativo y daño endotelial.

Desde los estudios de Graham en 1983, se determinó que el SAF es una condición en la cual se ven alterados mecanismos que regulan la coagulación y cómo estos se relacionan a su vez con eventos inmunológicos. Se ha demostrado que el papel que juegan los aAFL en la generación de trombosis y morbilidad gestacional, se da de forma dependiente de su especificidad y función en cuanto a la interacción con un antígeno fosfolípido o proteico (69).

Teniendo en cuenta que a pesar de que los blancos celulares de los aAFL son muy variados (células trofoblásticas (15), plaquetas (16), monocitos (17)), las células endoteliales son importantes en la regulación de la homeostasis vascular, y por ende, en la generación de trombosis (70). Ha sido demostrado que la actividad metabólica de las células endoteliales puede variar en relación con su localización. Un buen ejemplo de esto se refleja en un estudio, en el cual se comparó el endotelio de capilares cerebrales con el endotelio de otros tejidos no nerviosos. En este se observó que el contenido mitocondrial en los capilares de tejidos nerviosos excedía aproximadamente en 6% a los de otros capilares como los del músculo cardiaco o esquelético. Esto indica una alta actividad metabólica en las primeras, lo cual tiene una gran relevancia en el desarrollo de patologías como la epilepsia (71).

En el presente trabajo se seleccionó un modelo *in vitro* de células obtenidas de vena de cordón umbilical humano, HUVEC, las cuales son de macrovasculatura y a pesar de su origen, son comparables con líneas celulares de microvasculatura en cuanto a su respuesta inmune, puesto que tienen un comportamiento similar y por tanto pueden ser usadas para evaluar eventos de carácter inflamatorio y trombótico (72), como los que se observan en pacientes con SAF.

La evidencia en modelos celulares y animales demuestra que los aAFL, por su heterogeneidad, pueden inducir cambios intracelulares muy variados, como es el caso de la alteración del potencial mitocondrial, el cual ha sido asociado a una respuesta ante

el estrés celular y que puede estar direccionado tanto a la disminución como al aumento de este potencial, dependiendo del tipo celular y el microambiente. Esto a su vez está relacionado con la localización, acceso a nutrientes y actividad metabólica del tipo celular (73). Teniendo en cuenta que la disfunción endotelial es una de las características principales de la preeclampsia (74) -una de las manifestaciones del SAF obstétrico-, es importante analizar esta disfunción desde el punto de vista metabólico, en el cual está implícita la actividad mitocondrial, por su papel en la producción de energía y su asociación con la localización tisular del endotelio (71).

Debido a que las células endoteliales son uno de los blancos de los aAFL y que el daño mitocondrial se ha asociado con pérdida de la función de estas células (75), se postuló que los aAFL inducen cambios en el potencial mitocondrial de las células endoteliales y esto a su vez se ve asociado con excesiva producción de ROS. Esto se ha demostrado en modelos de células HUVEC, como el desarrollado por Dymkowska y cols. Estos autores, indujeron hiperglicemia con altas dosis de glucosa en estas células, lo cual se relacionó directamente con el grado de producción de ROS, dependiente de la enzima NADPH oxidasa (NOX), lo cual está asociado con disfunción endotelial. Sumado a esto, se observó aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial, y a su vez un aumento en la producción de moléculas de adhesión como V-CAM1, lo cual demuestra una conexión entre las alteraciones metabólicas que afectan la mitocondria, la inflamación por reclutamiento de leucocitos y la disfunción endotelial (76).

En el presente trabajo se demostró una alteración del potencial mitocondrial, generando hiperpolarización de la membrana interna mitocondrial detectado con DIOC-6, inducida por los aAFL de pacientes con manifestaciones clínicas de morbilidad gestacional y trombosis vascular (MG/TV+). Estos resultados contrastan con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, en los que se encontró despolarización mitocondrial en células trofoblásticas inducido por los aAFL de este mismo grupo de pacientes y lo cual se relacionó con procesos de apoptosis (65), y demuestran que esta respuesta depende del tipo celular. De otro lado, en concordancia con los resultados del presente trabajo, en un modelo de LES en ratones que generan aAFL de forma espontánea, se observó que en los hepatocitos de estos ratones se inducía un aumento

del potencial mitocondrial y sumado a esto, un aumento de consumo de O₂ en el complejo II de la cadena transportadora de electrones que podría ser indicativo de una respuesta de supervivencia celular ante el estrés inducido por estos anticuerpos (24).

Los anteriores hallazgos corroboran la premisa de que puede existir una respuesta diferencial ante un mismo estímulo, dependiente del contexto, relacionado tanto con aspectos genéticos como ambientales (77). A esto se suma una demostrada relación entre la alteración de la función mitocondrial, la activación de la NOX, que es una de las principales fuentes de ROS, y el aumento en el consumo de oxígeno como marcadores de daño a nivel de estas organelas y de cuáles podrían ser sus repercusiones en células importantes en la regulación de la homeostasis vascular, como las células endoteliales. En estas células, uno de los marcadores de inflamación es la expresión de moléculas de adhesión como V-CAM1 o E-CAM1, que facilitan el reclutamiento de leucocitos, que a su vez inician procesos inflamatorios (78). Por lo tanto, el comportamiento a nivel mitocondrial de las células endoteliales ante los aAFL, podría deberse a una ya demostrada excesiva producción de ROS (79), por sobreactivación de la NOX (32), y a un daño a nivel de la cadena transportadora de electrones, como se ha evidenciado en otros modelos con el aumento del consumo de oxígeno (24), que puede llevar a estas células a aumentar el potencial mitocondrial, como un mecanismo protector para evitar fugas del contenido de la matriz de esta organela.

Esto se relaciona con la inducción de un estado inflamatorio, y que, en términos de la homeostasis celular, se manifiesta como estrés celular, lo cual puede activar diferentes mecanismos de rescate. A pesar de los reportes, en los que se demuestra asociación con el desarrollo del SAF obstétrico en el grupo MG-SN sero negativas para aAFL criterio (observado en los resultados de las pacientes incluidas en el presente estudio) (80), en el cual existe un importante componente inflamatorio (20), no se encontró una alteración en ninguno de los parámetros evaluados en este trabajo, al realizar estímulos con aAFL de este grupo.

5.2 La autofagia como un mecanismo activado por el estrés celular.

Uno de los mecanismos que se activa clásicamente en las células, ante eventos de estrés mitocondrial, es la autofagia, la cual puede ser inducida también en respuesta al aumento del estrés oxidativo y a la ausencia de nutrientes (81). Este estrés oxidativo se encontró aumentado en células endoteliales estimuladas con aAFL, por la detección del anión superóxido de origen en su mayor parte mitocondrial (23), por tanto, también puede estar asociado con la alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial observada en células trofoblásticas estimuladas con aAFL (65).

La autofagia como mecanismo regulador, se ha considerado un punto de convergencia de diferentes estímulos, y como se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los estímulos que podría inducirla. Específicamente el anión superóxido, cuyo origen es mayoritariamente mitocondrial, se considera el principal radical libre inductor de autofagia, como se observó en un estudio en el que células HeLa fueron sometidas a privación de nutrientes, como aminoácidos y glucosa. En dicho estudio se encontró que estos estímulos inducían activación de autofagia, que aumentó cuando se inhibieron enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, lo cual tiene implicaciones importantes a nivel clínico acerca del uso de estas enzimas antioxidantes, como una posible terapia en enfermedades en las que el estrés oxidativo, sumado a una prolongación de la actividad autofágica, sea una de las principales fuentes de daño celular (82).

Además del estrés oxidativo, la inflamación es otro importante estímulo para activar vías de autofagia, y en diferentes modelos se ha visto que los procesos autofágicos pueden ser activados, o inhibidos en condiciones inflamatorias (49). En un estudio, en el cual fueron estimuladas células trofoblásticas con aAFL, se observó que hubo una disminución en la expresión de la proteína LC3 II, la cual es un marcador de autofagia, sumado a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, con sobreactivación de TLR4 e inhibición de receptores como el Tyro3, Axl, y Mer (TAM) (83), que están relacionados con la regulación de la respuesta inflamatoria (84).

Teniendo lo anterior como base, se postuló inicialmente, que los aAFL en células endoteliales, podrían disminuir los procesos autofágicos, lo cual impediría un adecuado control de la respuesta inflamatoria (83). Sin embargo, se ha visto que la respuesta inflamatoria en el contexto de la autofagia puede ser tanto de inhibición como de sobreactivación, como se demostró en otros modelos de inflamación en los que el estímulo con TNF- α aumentó los procesos autofágicos, siendo estos modulados por una molécula conocida como emodin, que tiene propiedades antiinflamatorias, antitumorígenicas y antiescleróticas (50).

Contrario a lo previsto, a nivel funcional en nuestro estudio, la activación de autofagia en las células HUVEC se observó indirectamente, por un aumento en la acidificación lisosomal inducida por la IgG del grupo de trombosis vascular (TV+), ya que este es un mecanismo clásicamente degradativo, que involucra la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, y esta acidificación lisosomal a su vez puede relacionarse con eventos inflamatorios como los que se activan en respuesta a infecciones (85).

El efecto proinflamatorio de los aAFL ha sido estudiado en diferentes modelos celulares (20, 86, 87) y se ha observado que en células trofoblásticas los aAFL inducen aumento de citoquinas como IL-8 (55) e IL-1 β (29). Sin embargo, en nuestros resultados no se observó un aumento significativo de estas dos citoquinas, lo cual sugiere que se requiere la evaluación de otros posibles mecanismos de inflamación en las células endoteliales diferentes a los encontrados en células trofoblásticas. Se ha visto en células HUVEC especialmente, que aumentan la producción de ICAM1, CCL2 e IL-6 ante estímulos con LPS, el cual ha demostrado tener efectos inflamatorios similares a los que causan los aAFL en estas mismas células(88). Debido a esto, podrían postularse estas citoquinas y quimiocinas como mejores marcadores de inflamación en células HUVEC.

5.3 Coexistencia de autofagia y actividad de mTOR como mecanismos de supervivencia celular.

Se ha descrito clásicamente que la autofagia, como mecanismo celular catabólico (45), es un evento contrario a la proliferación, el cual tiene características anabólicas (35). A pesar de esto, ambos son considerados eventos que se activan en las células ante

condiciones como el estrés metabólico o el estrés oxidativo (89) y que, dependiendo del contexto, podrían coexistir.

En la iniciación de los eventos autofágicos juega un papel principal el complejo ULK1, el cual recluta proteínas que se asocian a los fagóforos, que son los vestigios de los autofagosomas. Este complejo es regulado por diferentes vías como la de mTOR y AMPK, donde mTOR ejerce una regulación inhibitoria por una fosforilación directa que lleva a una disminución de la actividad lisosomal y de la autofagia (90). Otro indicio, ya a nivel molecular, de actividad autofágica en las células HUVEC estimuladas con aAFL en nuestro estudio, fue la disminución en la fosforilación inhibitoria de ULK1 y la maduración de LC3 inducida por las IgG de los grupos MG/TV+ y TV+, reafirmando el hecho de que estos anticuerpos generan eventos probablemente inflamatorios y de estrés celular, llevando a las células a activar mecanismos de rescate y supervivencia como la autofagia.

Estos resultados tienen importancia desde el punto de vista clínico, pues actualmente emergen diferentes tipos de tratamiento, encaminados a regular la respuesta inflamatoria, y en el caso de la autofagia degradativa, un compuesto antimalárico, conocido como hidroxicloroquina inhibe estos procesos autofágicos, ya que fue demostrado que en células de glioblastoma, este compuesto indujo una acumulación de autofagosomas, lo cual se relaciona con un bloqueo en estos procesos degradativos (91). Dependiendo del grado de activación y de no-regulación, la autofagia puede llevar a las células a un estado de descontrol metabólico que clínicamente ha sido relacionado con enfermedades como el cáncer, en la que se generan procesos de proliferación de forma patológica y en los que también se ha evidenciado la activación de proteínas de la vía mTOR implicadas en la regulación del ciclo celular, el crecimiento celular y la migración celular (92).

Por sus características degradativas se ha considerado la autofagia como un mecanismo en el que se reciclan productos inviables para la célula, lo cual resulta beneficioso, pues se disminuye la acumulación de sustancias que podrían causar toxicidad celular (93). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la autofagia se ha asociado con la supervivencia celular en el crecimiento de tumores (94). Este último evento está

relacionado con una no-resolución de los eventos que generan estrés con una prolongada actividad autofágica (95). Recientemente ha emergido un concepto conocido como muerte celular por autofagia (Autophagy Cell Death, ACD), el cual ha sido asociado a una actividad autofágica de forma independiente de Atg5, iniciada en condiciones de estrés. En contraste a otros tipos de autofagia prolongada, una de las principales características de la ACD es la resistencia a la apoptosis, en presencia de proteínas inhibitorias de la misma como Bcl-2 (96).

Cada vez surgen más estudios que relacionan la actividad autofágica con la proliferación celular en contextos patológicos, lo cual en la mayoría de los casos se asocia a un descontrol en estos mecanismos, que puede llevar al empeoramiento de situaciones como el crecimiento tumoral (44) (97) (98). En el SAF específicamente, se ha observado en estudios clínicos, que los aAFL pueden inducir hiperplasia endotelial de la túnica íntima de microvasculatura renal y esto se asoció con alteraciones trombóticas no relacionadas con factores de la coagulación; más bien por oclusión de los vasos que evita una adecuada irrigación del tejido renal y por ende, pérdida de la función de este órgano (27). Esto ha sido relacionado con un aumento en la progresión del ciclo celular y proliferación de estas células que puede ser determinado por técnicas de marcaje del ADN y proteínas asociadas a la entrada al ciclo celular (como Ki-67).

En nuestro estudio se evaluó el efecto de los aAFL sobre parámetros funcionales y moleculares de la proliferación en las células HUVEC, y se encontró que los aAFL de todos los grupos de pacientes (MG, MG-SN, MG/TV+ y TV+) indujeron un aumento en la cantidad de células en fase de síntesis de ADN (fase S), lo cual fue detectado con IP e indica una entrada de estas células al ciclo celular y se relaciona con la proliferación celular. En contraste, no se encontró efecto cuando se usó el marcador Ki-67 que es ampliamente utilizado para el diagnóstico de tumores. Estos resultados son similares a los evaluados por Canaud y cols., en pacientes con nefropatía asociada a SAF, donde a nivel histológico se observó trombosis de microvasculatura renal por hiperplasia endotelial de la íntima, debido a una proliferación celular descontrolada, lo cual estuvo relacionado con aumento en la mortalidad, después de realizar trasplante de riñón (27).

En estudios previos se demostró que la activación de mTOR por los aAFL se relaciona con alteraciones vasculares que desencadenan en eventos trombóticos e inflamatorios (21) y también se ha visto relacionada la activación de mTOR, con el aumento en el crecimiento, proliferación y migración celular por activación de efectores como el S6 ribosomal (27). En los estudios de Canaud y cols., se observó, además un incremento en la activación de la proteína S6RP inducido por la IgG de pacientes con SAF que hace parte de la vía de señalización de mTOR, específicamente a través del complejo mTORC1 y que podría desencadenar activación de la proliferación celular (27), en la cual está involucrada la progresión del ciclo celular, a través de la activación de ciclinas (99).

La activación de mTOR puede repercutir en diferentes vías asociadas a diferentes eventos, y no exclusivamente a la proliferación. En el presente trabajo se usó la activación de la proteína S6RP como marcador molecular de la activación de mTOR que puede aumentar proliferación, crecimiento y migración celular, y se observó que los aAFL de pacientes del grupo MG/TV+ indujeron la fosforilación de S6RP en células endoteliales de la misma forma que lo hizo el control positivo de EGF.

Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en el análisis de ciclo celular, sirven como soporte para proponer la activación de mTOR como un posible inductor de proliferación celular endotelial, lo cual genera la activación de un mecanismo protrombótico no asociado con factores de la coagulación, y a su vez como un mecanismo que puede ser activado por las células en condiciones de estrés. Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado la activación de mTOR en monocitos dependiente de β_2 GPI, asociado a un aumento en la producción de factor tisular, del cual se conoce su importancia en la activación de la cascada de la coagulación (21), lo cual sugiere que el desencadenamiento de mecanismos protrombóticos en el SAF podría consistir en dos vías que convergen en este tipo de manifestación clínica.

A pesar de los estudios que demuestran una activación de mTOR inducida por los aAFL, aún se desconoce a través de que receptor podría inducirse la activación de esta proteína en respuesta a los aAFL. Canaud y cols, demuestran que para que se dé la activación de mTOR por los aAFL es necesario un reclutamiento de Akt a la membrana celular, lo cual podría indicar que este tipo de receptor se localiza a este nivel (27). En otras

enfermedades autoinmunes como el LES, en el cual aproximadamente el 25% de los pacientes presentan SAF (100), se ha visto un aumento en la activación de mTOR, por lo que ha sido relacionado con proliferación de linfocitos T efectoros y esto podría explicar la exagerada respuesta inmune ante los diferentes antígenos que desencadenan estas patologías.

Con estos resultados se retoma nuevamente la importancia de la regulación metabólica en la activación de mecanismos activados por estrés celular, ya que se demuestra una alteración del metaboloma de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES, específicamente en la vía de las pentosas fosfato, de la cual se genera un subproducto del metabolismo del triptófano, conocido como quinurenina. Esta fue usada para estimular células Jurkat y linfocitos de sangre periférica y se encontró aumento en la fosforilación de S6RP, del cual se sabe es uno de los efectores principales de mTOR en la inducción de la proliferación celular (42).

5.4 Terapias emergentes en el SAF de acuerdo con los mecanismos activados por los aAFL.

La rapamicina, como inhibidor de mTOR, ha sido usada como terapia en enfermedades en las cuales, se observa una proliferación celular de forma patológica, incluso aumentando la supervivencia de pacientes con trasplante de riñón. Esta actúa como inmunosupresor, pero también posiblemente como un inhibidor del crecimiento endotelial a nivel de microvasculatura (27), que puede inducir trombosis y necrosis tisular por ausencia de nutrientes. La rapamicina también se ha considerado como tratamiento en otro tipo de nefropatías como la asociada a depósitos de IgA específicamente en células mesangiales de los glomérulos renales (101). Se observó que los depósitos de IgA de ratones con esta patología disminuían al ser tratados con rapamicina, y de la misma forma se incrementaban los procesos autofágicos, evidenciado por el aumento en la expresión de LC3II. También se observó que este tratamiento disminuyó la expresión de un marcador de proliferación celular, la ciclina D1 (101), lo cual concuerda con los estudios de Canaud y cols (27).

Teniendo en cuenta la evidencia presentada, es importante considerar el tratamiento con rapamicina, como alternativa para pacientes con las diferentes manifestaciones clínicas

del SAF, sabiendo que puede actuar en diferentes poblaciones celulares, inhibiendo la proliferación tanto de células endoteliales, como de linfocitos y otras involucradas en la respuesta inflamatoria, uno de los mecanismos más importantes en el desarrollo del SAF. También es importante resaltar el aumento de la actividad autofágica en las células endoteliales, como mecanismo de rescate ante el estrés celular inducido por los aAFL. Sin embargo, es de tener en cuenta que la autofagia en otros contextos patológicos como el cáncer, puede terminar en el aumento de la supervivencia de tumores.

Aún se desconoce la naturaleza, las implicaciones y el direccionamiento de tal actividad autofágica en el SAF, ya que como se ha visto, esta puede tener como finalidad aumentar la supervivencia de las células (44), o llevar a las mismas a regular procesos apoptóticos, todo dependiendo tanto del grado de activación como de las vías alternas por las cuales la autofagia es activada (102).

Respecto al efecto modulador de las ATL, como una evidencia indirecta de la acción *in vivo* de la aspirina a bajas dosis en la prevención de las complicaciones gestacionales asociadas al SAF, no se encontró que estas revirtieran el efecto de los aAFL sobre los parámetros evaluados en las células endoteliales.

Este efecto modulador de las ATL sí se observó en otros estudios de nuestro grupo de investigación donde se evidenció que las ATL disminuían la adhesión de leucocitos al endotelio estimulado con plasma de mujeres con preeclampsia y con productos de estrés oxidativo como las (sustancias reactivas del ácido barbitúrico (TBARS) y el 8-isoprostano) (57). En células trofoblásticas se observó que las ATL restauraron la disminución en la migración de estas células y estabilizaron los co-cultivos de células endoteliales y células trofoblásticas, que habían sido alterados por los aAFL de pacientes con MG y aAFL no-criterio (65).

Es de resaltar en el presente estudio, el incremento de la acidificación lisosomal de las células endoteliales inducida por las ATL, de las que se conocen sus efectos antiinflamatorios. Esta acidificación fue aún mayor de la que indujeron los aAFL de pacientes con MG/TV+ en células HUVEC. Un comportamiento similar de incremento de autofagia, se observó en un estudio en el cual macrófagos peritoneales murinos fueron estimulados con la resolvina D1, otro mediador pro-resolución de la inflamación derivado

del DHA (ácido graso poliinsaturado omega-3), que también puede ser inducido por la aspirina y que tiene efectos antiinflamatorios (51). De esta observación puede destacarse la necesidad de evaluar los mecanismos de activación de autofagia y cuáles son sus implicaciones a nivel homeostático, ya que en algunos contextos puede resultar beneficioso y en otros perjudicial.

6. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los aAFL sobre células endoteliales, debido a la relevancia clínica de estas en diferentes manifestaciones del SAF como la preeclampsia, en la cual se observa una disfunción endotelial e inflamación. Como se propuso en los objetivos, se abordó desde un punto de vista homeostático el efecto que tienen los aAFL en la activación de mecanismos de rescate como la autofagia y de la activación de una vía de señalización que converge en la entrada al ciclo celular y consecuentemente con la proliferación de células endoteliales; esta última relacionada con la trombosis vascular observada en pacientes con SAF, causado por una oclusión vascular.

En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos en este estudio, en el que se observa que, en la mayoría de los parámetros evaluados, los aAFL presentes en el grupo de mujeres MG/TV+ indujeron un aumento en autofagia y porcentaje de células en fase S que se relaciona con proliferación celular lo cual indirectamente se asocia con estrés celular. De la misma forma se observó que los aAFL del grupo TV+ aumentaron la acidificación lisosomal, que tiene un componente inflamatorio, además de los otros parámetros de incremento de autofagia como se observó con el grupo MG/TV+. Esto demuestra que, en algunas situaciones en el SAF, podrían compartirse mecanismos en la inducción de la disfunción endotelial por aAFL presentes en grupos de estudio con diferentes manifestaciones clínicas de esta enfermedad. El grupo de MG con aAFL no-criterio, no mostró efectos sobre estos parámetros evaluados, lo cual contrasta con hallazgos previos de nuestro grupo de investigación.

Respecto a la activación de autofagia inducida por los aAFL en las células endoteliales, es importante destacar los mecanismos de inducción, ya que se pudo observar que existe una evidente alteración de la función mitocondrial, asociada con la activación de autofagia y ha sido relacionada con aumento de producción de ROS así como con un aumento del consumo de oxígeno, lo cual podría ser un mecanismo importante para evaluar en futuras investigaciones y de este modo, dilucidar más claramente cómo se generan estas alteraciones. Del mismo modo sería interesante realizar estudios con los cuales se pueda determinar que vías están implicadas en la activación de autofagia observada en estas células endoteliales y así comprender la finalidad de dicha activación.

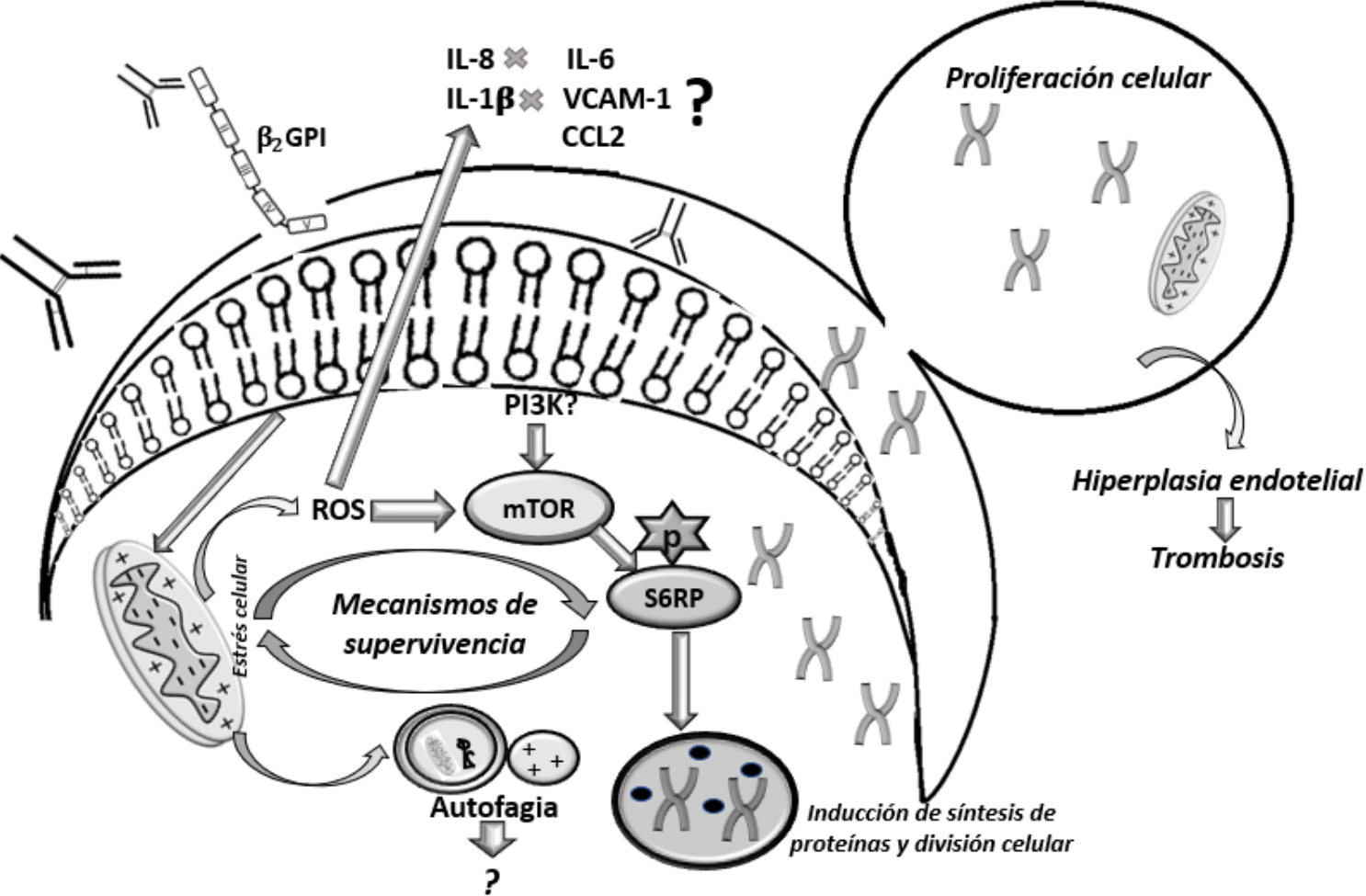
Es importante resaltar las implicaciones a nivel homeostático de estos hallazgos, debido a que los aAFL al inducir una alteración a nivel mitocondrial, pueden activar dos mecanismos que clásicamente se han considerado opuestos (autofagia y activación de mTOR), debido a su naturaleza metabólica, pero de los cuales se tiene suficiente evidencia para demostrar que puede haber una coexistencia entre ambos y que esto tiene implicaciones a nivel de la supervivencia celular, lo cual se propone en la Figura 11. Es de tener en cuenta el impacto que esto puede tener en el SAF, pues demuestra una conexión entre la disrupción homeostática y el descontrol de los mecanismos que regulan la misma, observado en otras patologías como el cáncer, donde se activan estos mismos mecanismos inducidos por los aAFL en el endotelio.

Por último, cabe destacar el papel que podrían jugar fármacos como la rapamicina o la hidroxiclороquina, porque regulan los mecanismos activados por los aAFL y porque podrían ser beneficiosos para el manejo de manifestaciones trombóticas e inflamatorias de los pacientes con SAF.

Tabla 2. Resumen de los efectos de los aAFL sobre células HUVEC.

	MG	MG-SN	MG/TV+	TV+	Interpretación
Acidificación lisosomal	—	—	—	↑	Inflamación y autofagia
Potencial mitocondrial	—	—	↑	—	Estrés celular y aumento de ROS
Ciclo celular (% células en fase S)	↑	↑	↑	↑	Estrés y proliferación celular
Activación de mTOR	—	—	↑	—	Proliferación celular
Activación de ULK1	—	—	↑	↑	Autofagia temprana
Maduración de LC3	—	—	↑	↑	Autofagia tardía

Figura 14. Modelo de la activación de autofagia y mTOR, inducido por estrés celular en células endoteliales por los aAFL.



Los aAFL interactúan con fosfolípidos de membrana en células endoteliales de forma directa o indirecta (β_2 GPI), generando estrés celular que induce hiperpolarización mitocondrial, induciendo la producción de ROS y activando mecanismos proinflamatorios, lo cual activa autofagia y mTOR, que pueden generar sobrevida a las células y proliferación celular de forma patológica, generando hiperplasia vascular y consecuentemente trombosis por oclusión de la luz de los vasos sanguíneos. *Imagen: Carlos Mario Rodríguez C.*

AGRADECIMIENTOS Y FINANCIAMIENTO.

Al amor, la paciencia y al empeño que cada día pusieron mis padres para lograr mis objetivos, no solo académicos sino personales, a las profesoras Ángela Cadavid y Ángela Álvarez, y mi comité tutorial por haberme aceptado en el Grupo Reproducción y permitirme desarrollar este trabajo, a mis compañeros de laboratorio por aportar cada uno desde su experiencia a que este fuera un buen trabajo, a la Universidad de Antioquia por ser un lugar abierto para formar profesionales de diferentes áreas y permitir la integración de estas áreas, como en mi caso: un odontólogo con interés en las ciencias básicas, a la corporación ciencias básicas, a la unidad de citometría y en general a todos los lugares en la universidad donde se me permitió avanzar en la maestría.

Gracias a todos por ayudar y creer en la realización de este trabajo.

Financiamiento.

Convocatoria Programática Ciencias de la Salud 2016

DAÑO ENDOTELIAL INDUCIDO POR LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS:
PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y MTOR EN LA REGULACIÓN DE PROCESOS
AUTOFÁGICOS

CODI 2015-7448

ANEXOS.

Methods: We consented patients with uncomplicated term pregnancy undergoing cesarean section at the University of Washington Medical Center, obtaining antepartum maternal blood, cord blood, and placentas. In order to determine single-cell phenotypes of leukocytes, we implemented multiple 30-parameter flow cytometry panels interrogating adaptive and innate immune cell subsets. In addition to ex vivo phenotyping of bulk leukocytes, we flow-sorted conventional lymphocyte populations for single-cell RNA sequencing.

Results: Major conventional and innate-like lymphocyte populations were similarly detected in circulation and placenta. Despite this, a substantial fraction of placental lymphocytes express biomarkers indicative of altered migration and tissue residence. These signatures are absent from lymphocytes recovered from maternal and fetal blood. Transcriptional analyses confirm that a subset of placental lymphocytes undergo a tissue-resident program.

Conclusion: Simultaneous high-parameter flow cytometry and single-cell RNA sequencing provides less biased analyses of tissue-specific modifications that immune cells undergo. We report a substantial fraction of lymphocytes that enter the placenta undergo a tissue-resident program, which has been largely understood in the context of skin and other barrier tissues. Our data suggest immune cells may fail to exit the placenta and recirculate in the periphery, highlighting the placenta is more than a circulatory interface. Despite observed phenotypic and transcriptomic differences of tissue-resident placental lymphocytes, further analyses will be required to understand their functional differences and role during disorder or disease.

P2.61. TROPHOBLAST CELLS PREVENT NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAP-INDUCED DAMAGE AND PROMOTE VASCULAR TRANSFORMATION SIGNALS IN NEUTROPHILS

Guillermina Calo¹, Florencia Sabbione², Natalia Pascuali³, Irene Keitelman², Daiana Vota¹, Daniel Paparini¹, Rosanna Ramhorst¹, Fernanda Parborelli³, Analia Trevani², Claudia Perez Leiros¹. ¹Laboratorio de Inmunofarmacología, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUBICEN), CONICET-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ²Laboratorio de inmunidad innata, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina; ³Laboratorio de Estudios de la Fisiopatología del Ovario, IBYME-CONICET, Buenos Aires, Argentina

Objectives: Normal placentation entails a highly regulated interaction of maternal leukocytes and invasive trophoblast cells. Circulating neutrophils are activated during pregnancy and even more during pathological pregnancies. Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) has immunomodulatory effects through its action on VPAC1 and VPAC2 receptors, both expressed by neutrophils. Our aim was to explore the effects of neutrophils and neutrophil extracellular traps (NET) on trophoblast cell function and whether trophoblast cell-derived factors and VIP condition neutrophils to favor angiogenesis and promote an anti-inflammatory environment required for normal pregnancy.

Methods: Peripheral blood neutrophils were isolated from healthy volunteers and cultured with human first trimester trophoblast cell line (Swan 71) conditioned media (CM) or with VIP. NET formation was induced with monosodium urate crystals (MSU). Trophoblast cell and neutrophil profiles were assessed by RT-qPCR, flow cytometry and confocal microscopy. Trophoblast migration was evaluated by wound healing assays and angiogenesis with the chorioallantoic membrane of quail embryos model assay.

Results: NETs isolated from MSU-activated neutrophils hindered trophoblast cell migration (%±SE Tb: 92.5±1.4; Tb+NETs: 70.0±3.3; P<0.05). CM and VIP prevented NET formation and thus reversed the effect on migration (%±SE Tb+neu+MSU+CM: 97.5±1.4; Tb+neu+MSU+VIP: 87.1±0.8; P<0.05). NETs increased CXCL8 and decreased TGF-β expression in trophoblast cells. On the other hand, factors released by trophoblast cells and VIP shaped neutrophils (Neu) to a proangiogenic profile with increased VEGF, Arginase-1, TGF-β and CCL2 expression (P<0.05) and

increased vascular transformation as shown by the CAM assay (i.e. N° of segments, X±SE: Neu: 36±4, Neu+CM: 87±22, Neu+VIP: 62±15 P<0.05).

Conclusion: NETs adversely affect trophoblast cell function whereas factors released by trophoblast cells and VIP reverse this effect. Conditioning neutrophils with Tb cells stimulate angiogenic processes and might influence vascular transformation required during placentation.

P2.62. HOMEOSTASIS LOSS IN VIP DEFICIENT MICE IS ASSOCIATED WITH ALTERED REGULATORY T CELLS RECRUITMENT

Lucila Gallino¹, Vanesa Hauk¹, Esteban Grasso¹, Marcos Palligas², Nora Saraco², Esperanza Berensztejn³, Natalia Pascuali⁴, Fernanda Parborelli⁴, James Waschek⁵, Claudia Perez Leiros¹, Rosanna Ramhorst¹. ¹Laboratorio de Inmunofarmacología, CONICET, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUBICEN), CIUDAD DE BUENOS AIRES, Argentina; ²Servicio de Endocrinología, Hospital Garrahan, CONICET, UBA, CIUDAD DE BUENOS AIRES, Argentina; ³Servicio de Endocrinología, Hospital Garrahan, UBA, CIUDAD DE BUENOS AIRES, Argentina; ⁴Estudios de la Fisiopatología del ovario, IBYME, CONICET, CIUDAD DE BUENOS AIRES, Argentina; ⁵The David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, USA

Objectives: In order to have a successful pregnancy, it is required a balance between proinflammatory and tolerogenic mediators. Since VIP (vasoactive intestinal peptide) is a master regulator associated with Tregs induction and recruitment, we aim to understand the relevance of VIP in normal pregnancy with focus on the Tregs.

Methods: We used two mice models: VIP Knockout and Foxp3-IRES-GFP, both in a C57 background. The serum and tissues obtained were analyzed by flow cytometry, RT-PCR and histological staining. We also performed Foxp3-adoptive cell transfer and migration assays.

Results: On the day of estrus we found histological differences between the ovaries and uterus of a WT mice vs VIP knockout mice (-/-). In uterus, these changes were accompanied with undetectable levels of expression Foxp3 in the (-/-) group, higher expression of RORγt and a decrease in IL-10 (p<0.05 Wilcoxon). Therefore, to study Tregs effects and trafficking, we performed adoptive transfer of Treg cells in VIP(+/-), and we found that they were mainly recruited into the uterus in relation to all other tested tissues accompanied with an increase in IL-10 expression. When pregnant mice at d3.5 were injected with VIP antagonist and sacrificed at d5.5, we found a similar profile that (-/-) mice, lower expression of TGFβ, IL-10, VEGF and Foxp3 in comparison with WT mice (p<0.05 Mann Whitney). Finally, we performed ex vivo migration assays using CD4+ sorted cells towards conditioned media from WT-explants at d5.5 cultured in the absence/presence of VIP with or without VIP-antagonist. VIP induced an enrichment of CD4+Foxp3+ cells while restrain total CD4+ recruitment; and VIP-antagonist prevented these effects.

Conclusion: VIP may contribute to an immunetolerant environment associated with normal pregnancy, in particular with the selective recruitment of Tregs to the uterus during the estrous cycle and in early embryo implantation.

P2.63. POSSIBLE ROLE OF POLYCLONAL IMMUNOGLOBULIN G (IGG) OF PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL MANIFESTATIONS OF THE ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME ON ACTIVATION OF INFLAMMATION BIOMARKERS

Carlos Mario Rodríguez Colorado^{1,2}, Manuela Velasquez Berrío^{3,4}, Diana Carolina Rúa Molina^{3,5}, Angela María Álvarez Gomez³, Angela Patricia Cadavid Jaramillo^{6,3,7}. ¹Universidad de Antioquia, Grupo Reproducción, Medellín, Colombia; ²Financial support CODI-Ude A. (2015-7448), Medellín, Colombia; ³Universidad de Antioquia, Facultad de medicina, Grupo Reproducción, Medellín, Colombia; ⁴MV is a recipient of a doctoral scholarship from Colciencias (757-2016), Medellín, Colombia; ⁵Grupo de Investigación en Trombosis, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; ⁶Universidad de Antioquia, Facultad de

medicina Grupo Reproducción, Medellín, Colombia; ⁷RIVATREM- Red Iberoamericana de Alteraciones Vasculares Asociadas a Trastornos del Embarazo, Chillán, Chile

Objectives: This study aimed to evaluate the effect of antiphospholipid antibodies (aPLs) from patients with different clinical manifestations of antiphospholipid syndrome (APS) in an in-vitro model of endothelial cells (ECs) for changes in mitochondrial membrane potential, lysosomal acidification, and nitrosative stress.

Methods: We included 50 women classified in different groups (n= 10, each group), as follows: the presence of aPL and clinical criteria of pregnancy morbidity (PM) alone (PM+); vascular thrombosis (VT) only (VT+); and PM/VT+. As a control groups, women without aPL (PM-) and healthy women with previous normal pregnancies (NHS) were included. Total polyclonal IgG was purified from sera and 250 ug/ml was added to ECs to determine the changes in mitochondrial membrane potential by DiOC-6, and the lysosomal acidification by LysoTracker green. The effect of IgG over the expression of nitrotyrosine in HUVEC cells was also evaluated.

Results: In comparison with the NHS women, the polyclonal IgG of the group of women with PM+, PM/VT+, and VT+ was associated with hyperpolarization of mitochondrial membrane, but the higher lysosomal acidification was observed only with IgG of PM/VT+ and VT+ groups. IgG purified from PM+ and VT+ increased nitration in ECs.

Conclusion: The inflammation mediated for aPL in ECs cause activation of the enzyme iNOS that produce higher quantities of nitric oxide which could be associated with protein nitration. These events are related to mitochondrial alteration in ECs evidenced with hyperpolarization and the release of superoxide anion generating positive feedback in the process of protein nitration. In the thrombotic context, the aPLs could be favoring the endothelial inflammation through the acidification of the lysosomes. These findings indicate that the effects of aPLs can be generated in a manner dependent on the clinical manifestations.

P2.64.

ASPIRIN-TRIGGERED LIPOXINS MODULATE PHOSPHORYLATION OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE AND PROTEIN NITRATION OF ENDOTHELIAL CELLS STIMULATED WITH POLYCLONAL IGG FROM PATIENTS WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

Manuel Granada-Gómez ¹, Manuela Velasquez Berrio ², Diana Carolina Rúa Molina ³, Angela Alvarez ⁴, Angela P. Cadavid J. ^{4,5,3}, ¹Reproduction Group, University of Antioquia, Medellín, Colombia; ²Reproduction Group, University of Antioquia, MV is a recipient of a doctoral scholarship from Colciencias (757-2016), Medellín, Colombia; ³Thrombosis Research Group, University of Antioquia, Medellín, Colombia; ⁴Reproduction Group, grant 111571249846 University of Antioquia, Financial support Colciencias; grant, Medellín, Colombia; ⁵RIVATREM- Red Iberoamericana de Alteraciones Vasculares Asociadas a Trastornos, Chillán, Chile

Objectives: This study aimed to evaluate the participation of nitrosative stress in the pathophysiology of antiphospholipid syndrome (APS) and modulation by aspirin-triggered lipoxins (ATLs).

Methods: We included 60 women classified in different groups (n= 10, each group), as follows: the presence of antiphospholipid antibodies (aPLs) and clinical criteria of PM alone (PM+); VT only (VT+); and PM/VT+. As a control groups, women without aPL: PM -, VT -, and healthy women (NHS) were included. In the sera, nitrites and nitrotyrosine levels were determined and IgG was purified from these sera. In an in vitro model of endothelial cells stimulated with IgG with or without ATL, the expression of nitrotyrosine and the phosphorylation of eNOS at Ser1177 were determined.

Results: In comparison with the NHS women, the sera of the group of women with PM+ and PM/VT+ have higher levels of nitrites and nitrotyrosine and in the TV+ group only nitrites were increased. Likewise, IgG purified from PM+ and PM/VT+ increased nitration in endothelial cells. The phosphorylation of eNOS was decreased by the IgG of PM+ and PM/VT+ women. ATL restored this last effect induced by aPL and only decreased the nitration induced by the PM+ group.

Conclusion: The decreased expression of phosphorylated eNOS in Ser1177 is associated with gestational morbidity alone or when accompanied by thrombosis. However, in gestational morbidity despite this decrease, nitrosative stress is generated in the endothelium, possibly by another source of NO, which is modulated by the ATL.

ATL induced a positive modulation in the phosphorylation of Ser1177 of the enzyme eNOS, which could be an additional mechanism of aspirin in the management of gestational morbidity and thrombosis associated with APS.

P2.65.

PREGESTATIONAL OBESITY ASSOCIATES WITH INCREASED T LYMPHOCYTE SUBTYPES IN THE OFFSPRING

Viviana Arroyo-Jousse ¹, María Rosa Bono ², Paola Casanello ³, ¹PhD Nutrition Program, INTA, University of Chile, Santiago, Chile; ²Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile; ³School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Objectives: Obesity is a risk factor for autoimmune diseases and T regulatory cells (Treg) are directly associated with the prevention of these. There is a lack of information regarding the effects of maternal obesity in newborn immunity. We aimed to evaluate the effects of maternal obesity on CD4+T cell populations and function of Tregs in the offspring at birth.

Methods: Cord blood was obtained at birth from newborns from women with pregestational obesity (BMI ≥ 30 kg/m², PO, n=11) or normal weight (BMI ≥ 18.5 < 25 kg/m², NW, n= 16) and maintained at room temperature until analysis. Ficoll separation method was used to isolate cord blood mononuclear cells and the CD4+T cell populations was characterized by Flow Cytometry. Treg (CD4+CD25+CD127-) and naïve T (CD4+CD25-CD127+) cells were obtained by cell sorting and co-cultured to evaluate the suppression capacity of Tregs. Results are expressed as cells/ml blood (median (interquartile range)).

Results: PO newborns had more lymphocytes ($2,35 \times 10^6$ (0,81 $\times 10^6$ – 5,23 $\times 10^6$) vs $1,04 \times 10^6$ (0,42 $\times 10^6$ – 2,37 $\times 10^6$), $p < 0,05$), CD4+T cells ($1,07 \times 10^6$ (0,48 $\times 10^6$ – 2,77 $\times 10^6$) vs $0,53 \times 10^6$ (0,19 $\times 10^6$ – 1,09 $\times 10^6$), $p < 0,01$), Treg ($0,043 \times 10^6$ (0,005 $\times 10^6$ – 0,152) vs $0,014 \times 10^6$ (0,002 $\times 10^6$ – 0,037), $p < 0,05$) and naïve T cells ($1,00 \times 10^6$ (0,46 $\times 10^6$ – 2,63 $\times 10^6$) vs $0,49 \times 10^6$ (0,18 $\times 10^6$ – 1,03 $\times 10^6$), $p < 0,001$) than control newborns. There is also a positive association between pregestational obesity and the number of T lymphocytes ($r = -0,450$; $p < 0,05$), CD4+ ($r = -0,549$; $p < 0,01$), Treg ($r = -0,431$; $p < 0,05$) and naïve T cells ($r = -0,576$; $p < 0,01$). Suppression assays are being performed.

Conclusion: Newborns from women with pregestational obesity have a higher number of T CD4+ subsets than control newborns. These results demonstrate for the first time that maternal obesity alters the number of immune cells in the newborn who could be predisposed to immune alterations later in life.

P2.66.

IN-DEPTH CHARACTERIZATION OF GESTATIONAL IMMUNE DYNAMICS USING MASS CYTOMETRY

Amber Moore, Nora Vivanco-Gonzalez, Katie Plummer, Olivia Mitchell, Harleen Kaur, Moises Rivera, Sean Bendall, Theo Palmer. Stanford University, Stanford, USA

Objectives: The maternal-fetal interface is critical for the establishment and maintenance of tolerance throughout pregnancy, yet the extent to which the maternal immune system changes to accommodate the semi-allogeneic fetus remains largely unknown. In mice, we have immunoprofiled maternal immune organs and the placenta across gestation using single-cell mass cytometry (CyTOF).

Methods: C57BL/6j CD45.2 females were crossed to C57BL/6j CD45.1 males to differentiate between maternal and fetal immune cells. Prior to dissection, pregnant females were retro-orbitally injected with anti-CD45 antibody to distinguish between endovascular- and tissue-associated immune cells. Peripheral blood, placenta and decidua were collected throughout gestation from embryonic day 10.5 (E10.5) to E18.5. Male and



IFPA 2019 · VIII SLIMP

10 - 13 September
Buenos Aires · Argentina

Certification of attendance

We acknowledge the participation of

Carlos Mario Rodriguez Colorado

IFPA 2019 and VIII SLIMP – 10 – 13 September,
Buenos Aires, Argentina

Alicia Jawerbaum
Chair, IFPA 2019

Estela Bevilacqua
Co-Chair, IFPA 2019

Claire Roberts
President, IFPA



Latin American Society for Maternal Fetal
Interaction and Placenta



IFPA 2019 · VIII SLIMP

10 - 13 September
Buenos Aires · Argentina

This certificate is presented to

Carlos Mario Rodríguez Colorado

for presenting in poster format their work entitled Possible role of polyclonal Immunoglobulin G (IgG) of patients with different clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome on activation of inflammation biomarkers

at IFPA 2019 and VIII SLIMP – 10 – 13 September,
Buenos Aires, Argentina

Alicia Jawerbaum
Chair, IFPA 2019

Estela Bevilacqua
Co-Chair, IFPA 2019

Claire Roberts
President, IFPA



Latin American Society for Maternal Fetal
Interaction and Placenta



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

**CORPORACIÓN ACADÉMICA
CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

En atención a que:

Carlos Mario Rodríguez Colorado

Identificado (a) con cédula de ciudadanía N.1128470270

Participó como asistente y ponente en modalidad poster del
IX Seminario Ciencias Básicas Biomédicas,
con una duración de 16 horas. Realizado en Medellín los días 19 y 20
de noviembre de 2018

Durley Eliana Restrepo Pineda
Directora

BIBLIOGRAFÍA.

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(2):295-306.
2. de Groot PG, Urbanus RT. The significance of autoantibodies against β 2-glycoprotein I. *Blood*. 2012;120(2):266-74.
3. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, Conti F, Alessandri C, Longo A, et al. Vimentin/cardiolipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010;116(16):2960-7.
4. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thrombosis and haemostasis*. 1996;76(05):721-4.
5. Park HS, Gu JY, Jung HS, Kim HK. Thrombotic Risk of Non-Criteria Anti-Phospholipid Antibodies Measured by Line Immunoassay: Superiority of Anti-Phosphatidylserine and Anti-Phosphatidic Acid Antibodies. *Clinical laboratory*. 2019;65(3).
6. Dlott JS, Roubey RA. Drug-induced lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. *Current rheumatology reports*. 2012;14(1):71-8.
7. Cervera R, Espinosa G, Khamashta M. *Antiphospholipid syndrome in systemic autoimmune diseases*: Elsevier; 2016.
8. Mejía-Romero R, García-Carrasco M, Galarza-Maldonado C, Santos P, Mendoza-Pinto C, Escárcega RO, et al. Primary antiphospholipid syndrome in Latin American mestizo patients: clinical and immunologic characteristics and comparison with European patients. *Clinical rheumatology*. 2008;27(7):891-7.
9. Osio LF, Tobón GJ, Posada G, Toro CE, Cañas CA. Síndrome antifosfolípídico: descripción de una cohorte de 32 pacientes del suroccidente colombiano. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2010;17(3):172-7.
10. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel G, Ceberio-Hualde L, Shoenfeld Y, De Ramón E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(6):1011-8.
11. Sugi T, Matsubayashi H, Inomo A, Dan L, Makino T. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2004;30(4):326-32.
12. Bertolaccini M, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, Laat Bd, Forastiero R, et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus*. 2011;20(2):191-205.
13. Sciascia S, Amigo M-C, Roccatello D, Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nature Reviews Rheumatology*. 2017;13(9):548.
14. Sacharidou A, Shaul PW, Mineo C, editors. *New insights in the pathophysiology of antiphospholipid syndrome*. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2018: Thieme Medical Publishers.
15. Bruno V, Nuccetelli M, Ticconi C, Bruno A, Martelli F, Capogna MV, et al. Amniotic fluid antiphospholipid antibodies: potential role in antiphospholipid syndrome-independent aberrant implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019;17:1-8.
16. Mayer-Pickel K. Changes of platelet count throughout pregnancy in women with antiphospholipid syndrome. *Journal of reproductive immunology*. 2019;136:102612-.
17. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Ritter S, Pedrosa DG, Strand D, Graf C, et al. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis. *blood*. 2019;134(14):1119-31.

18. 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. *Molecular medicine reports*. 2019;19(5):4353-63.
19. Lood C, Tydén H, Gullstrand B, Sturfelt G, Jönsen A, Truedsson L, et al. Platelet activation and antiphospholipid antibodies collaborate in the activation of the complement system on platelets in systemic lupus erythematosus. *PloS one*. 2014;9(6):e99386.
20. Mulla MJ, Brosens JJ, Chamley LW, Giles I, Pericleous C, Rahman A, et al. Antiphospholipid antibodies induce a pro-inflammatory response in first trimester trophoblast via the TLR4/MyD88 pathway. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2009;62(2):96-111.
21. Xia L, Zhou H, Wang T, Xie Y, Wang X, Yan J. Activation of mTOR is involved in anti- β 2GPI/ β 2GPI-induced expression of tissue factor and IL-8 in monocytes. *Thrombosis research*. 2017;157:103-10.
22. Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, Salmon JE, Shen Y-M, Herz J, et al. Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood*. 2018:119(11):2468-2476.
23. Velásquez M, Granada MA, Galvis JC, Alvarez AM, Cadavid Á. Estrés oxidativo en células endoteliales inducido por el suero de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido. *Biomédica*. 2019;39(4).
24. Oaks Z, Winans T, Caza T, Fernandez D, Liu Y, Landas SK, et al. Mitochondrial dysfunction in the liver and antiphospholipid antibody production precede disease onset and respond to rapamycin in lupus-prone mice. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(11):2728-39.
25. Lai Z-w, Marchena-Mendez I, Perl A. Oxidative stress and Treg depletion in lupus patients with anti-phospholipid syndrome. *Clinical Immunology*. 2015;158(2):148-52.
26. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, et al. Antiphospholipid antibodies promote the release of neutrophil extracellular traps: a new mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015;67(11):2990.
27. Canaud G, Bienaimé F, Tabarin F, Bataillon G, Seilhean D, Noël L-H, et al. Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(4):303-12.
28. Abrahams V, Chamley L, Salmon J. Antiphospholipid syndrome and pregnancy: pathogenesis to translation [published online ahead of print April 26, 2017]. *Arthritis Rheumatol*.
29. Mulla MJ, Salmon JE, Chamley LW, Brosens JJ, Boeras CM, Kavathas PB, et al. A role for uric acid and the Nalp3 inflammasome in antiphospholipid antibody-induced IL-1 β production by human first trimester trophoblast. *PloS one*. 2013;8(6):e65237.
30. Viall CA, Chamley LW. Histopathology in the placentae of women with antiphospholipid antibodies: a systematic review of the literature. *Autoimmunity reviews*. 2015;14(5):446-71.
31. Sebire N, Backos M, El Gaddal S, Goldin R, Regan L. Placental pathology, antiphospholipid antibodies, and pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients. *Obstetrics & Gynecology*. 2003;101(2):258-63.
32. Müller-Calleja N, Köhler A, Siebald B, Canisius A, Orning C, Radsak M, et al. Cofactor-independent antiphospholipid antibodies activate the NLRP3-inflammasome via endosomal NADPH-oxidase: implications for the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 2015;113(05):1071-83.
33. Darnell JE, Lodish HF, Baltimore D. *Biología celular y molecular: Omega*; 1993.
34. Li H, You L, Xie J, Pan H, Han W. The roles of subcellularly located EGFR in autophagy. *Cellular signalling*. 2017;35:223-30.
35. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(1):21.
36. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(1):31.

37. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochemical Journal*. 2012;441(1):1-21.
38. Gao M-z, Wang H-b, Chen X-l, Cao W-t, Fu L, Li Y, et al. Aberrant modulation of ribosomal protein S6 phosphorylation confers acquired resistance to MAPK pathway inhibitors in BRAF-mutant melanoma. *Acta pharmacologica Sinica*. 2018:1.
39. Liu Y, Zhang D-t, Liu X-g. mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *International reviews of immunology*. 2015;34(1):50-66.
40. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;30(6):832-44.
41. Lui SL, Tsang R, Chan KW, Zhang F, Tam S, Yung S, et al. Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008;23(9):2768-76.
42. Perl A, Hanczko R, Lai Z-W, Oaks Z, Kelly R, Borsuk R, et al. Comprehensive metabolome analyses reveal N-acetylcysteine-responsive accumulation of kynurenine in systemic lupus erythematosus: implications for activation of the mechanistic target of rapamycin. *Metabolomics*. 2015;11(5):1157-74.
43. Guo JY, White E, editors. *Autophagy, metabolism, and cancer*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology; 2016: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & development*. 2011;25(5):460-70.
45. Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation. *Clinical and translational medicine*. 2017;6(1):24.
46. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(12):759.
47. McAlpine F, Williamson LE, Tooze SA, Chan EY. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*. 2013;9(3):361-73.
48. Xu J, Camfield R, Gorski SM. The interplay between exosomes and autophagy—partners in crime. *J Cell Sci*. 2018;131(15):jcs215210.
49. Qi Yy, Zhou Xj, Zhang H. Autophagy and immunological aberrations in systemic lupus erythematosus. *European journal of immunology*. 2019;49(4):523-33.
50. Chen D, Liu J, Lu L, Huang Y, Wang Y, Wang M, et al. Emodin attenuates TNF- α -induced apoptosis and autophagy in mouse C2C12 myoblasts through the phosphorylation of Akt. *International immunopharmacology*. 2016;34:107-13.
51. Prieto P, Rosales-Mendoza CE, Terrón V, Toledano V, Cuadrado A, López-Collazo E, et al. Activation of autophagy in macrophages by pro-resolving lipid mediators. *Autophagy*. 2015;11(10):1729-44.
52. Cadavid A, Sanchez F, Botero J, Peña B, Castañeda A, Ossa J. Coadjuvant effect of aspirin in the treatment of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 1996;35:465.
53. KRAUSE I, BLANK M, GILBRUT B, SHOENFELD Y. The effect of aspirin on recurrent fetal loss in experimental antiphospholipid syndrome. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1993;29(3):155-61.
54. Schror K. *Acetylsalicylic Acid*. Wiley Blackwell. 2009:58-62.
55. Alvarez AM, Mulla MJ, Chamley LW, Cadavid AP, Abrahams VM. Aspirin-triggered lipoxin prevents antiphospholipid antibody effects on human trophoblast migration and endothelial cell interactions. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(2):488-97.
56. Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(1):80-6.

57. Gil-Villa A, Norling L, Serhan C, Cordero D, Rojas M, Cadavid A. Aspirin triggered-lipoxin A4 reduces the adhesion of human polymorphonuclear neutrophils to endothelial cells initiated by preeclamptic plasma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2012;87(4-5):127-34.
58. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology*. 2015;33:643-75.
59. Jara LJ, Medina G, Cruz-Cruz P, Olivares-Rivera J, Duarte-Salazar C, Saavedra MA. Non-criteria or seronegative obstetric antiphospholipid syndrome. *Isr Med Assoc J*. 2017;19(6).
60. Ratzinger F, Panic T, Haslacher H, Perkmann T, Schmetterer KG, Belik S, et al. Testing lupus anticoagulants in a real-life scenario-a retrospective cohort study. *Biochemia medica: Biochemia medica*. 2017;27(3):1-13.
61. Kwak JY, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Beer AE. Autoantibodies in women with primary recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Journal of reproductive immunology*. 1992;22(1):15-31.
62. Velásquez M, Álvarez ÁM, Cadavid ÁP. Cuantificación sistematizada de la remodelación vascular in vitro en la morbilidad gestacional asociada al síndrome antifosfolípido. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 2016;81(6):455-64.
63. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 1970;227(5259):680.
64. Korchak HM, Rich AM, Wilkenfeld C, Rutherford LE, Weissmann G. A carbocyanine dye, DiOC6 (3), acts as a mitochondrial probe in human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications*. 1982;108(4):1495-501.
65. Alvarez AM, Balcázar N, San Martín S, Markert UR, Cadavid AP. Modulation of antiphospholipid antibodies-induced trophoblast damage by different drugs used to prevent pregnancy morbidity associated with antiphospholipid syndrome. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017;77(4):e12634.
66. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127(2):175-86.
67. Rabell Velázquez G, Rodríguez Pérez S, Fernández Duarte J, Rivero Fernández Y, Ramírez Tur K, Cedeño Arias M, et al. Obtención de un marcador leucocitario anti-CD45 para citometría de flujo. *Revista Cubana de Química*. 2017;29(2):284-302.
68. Shim MS, Nettesheim A, Hirt J, Liton PB. The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress. *Autophagy*. 2019(just-accepted).
69. Hughes G. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1983;287(6399):1088.
70. Poredos P, Jezovnik MK. *Endothelial dysfunction and venous thrombosis*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA; 2018.
71. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1977;1(5):409-17.
72. Lidington E, Moyes D, McCormack A, Rose M. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transplant immunology*. 1999;7(4):239-46.
73. Hirata E, Sahai E. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(7):a026781.
74. Rodríguez-Almaraz M, Herraiz I, Gómez-Arriaga P, Vallejo P, Gonzalo-Gil E, Usategui A, et al. The role of angiogenic biomarkers and uterine artery Doppler in pregnant women with systemic lupus erythematosus or antiphospholipid syndrome. *Pregnancy hypertension*. 2018;11:99-104.
75. Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Koziel A, Sobieraj I, Nobik W, Lukasiak A, et al. Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacological reports*. 2015;67(4):704-10.

76. Dymkowska D, Drabarek B, Podszywałow-Bartnicka P, Szczepanowska J, Zabłocki K. Hyperglycaemia modifies energy metabolism and reactive oxygen species formation in endothelial cells in vitro. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;542:7-13.
77. Lisowski P, Kannan P, Mlody B, Prigione A. Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis. *EMBO reports*. 2018;19(5).
78. Lee J, Song KH, Kim T, Doh J. endothelial cell Focal adhesion regulates Transendothelial Migration and subendothelial crawling of T cells. *Frontiers in immunology*. 2018;9:48.
79. Benhamou Y, Miranda S, Armengol G, Harouki N, Drouot L, Zahr N, et al. Infliximab improves endothelial dysfunction in a mouse model of antiphospholipid syndrome: role of reduced oxidative stress. *Vascular pharmacology*. 2015;71:93-101.
80. Ogasawara M, Sasa H, Katano K, Aoyama T, Aoki K, Suzumori K. Recurrent abortion and moderate or strong antiphospholipid antibody production. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 1998;62(2):183-8.
81. Kumar A, Davuluri G, Welch N, Kim A, Gangadhariah M, Allawy A, et al. Oxidative stress mediates ethanol-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction and dysregulated protein synthesis and autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019.
82. Chen Y, Azad M, Gibson S. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell death and differentiation*. 2009;16(7):1040.
83. Mulla MJ, Weel IC, Potter JA, Gysler SM, Salmon JE, Peraçoli MT, et al. Antiphospholipid Antibodies Inhibit Trophoblast Toll-Like Receptor and Inflammasome Negative Regulators. *Arthritis & Rheumatology*. 2018;70(6):891-902.
84. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(11):a009076.
85. Li L-H, Lin J-S, Chiu H-W, Lin W-Y, Ju T-C, Chen F-H, et al. Mechanistic insight into the activation of the NLRP3 inflammasome by *Neisseria gonorrhoeae* in macrophages. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1815.
86. Hurst J, Prinz N, Lorenz M, Bauer S, Chapman J, Lackner KJ, et al. TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1 β and caspase-1 in monocytes and dendritic cells. *Immunobiology*. 2009;214(8):683-91.
87. Tokushige S-i, Matsumoto H, Takemura T, Igeta Y, Hashida H. Secondary hypertrophic pachymeningitis in antiphospholipid syndrome. *Journal of neuroimmunology*. 2012;250(1-2):115-7.
88. Tang N, Sun B, Gupta A, Rempel H, Pulliam L. Monocyte exosomes induce adhesion molecules and cytokines via activation of NF- κ B in endothelial cells. *The FASEB Journal*. 2016;30(9):3097-106.
89. Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Zhou H, Chen W, et al. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(5):624-32.
90. Nwadike C, Williamson LE, Gallagher LE, Guan J-L, Chan EY. AMPK inhibits ULK1-dependent autophagosome formation and lysosomal acidification via distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology*. 2018;38(10):e00023-18.
91. Liu L-q, Wang S-b, Shao Y-f, Shi J-n, Wang W, Chen W-y, et al. Hydroxychloroquine potentiates the anti-cancer effect of bevacizumab on glioblastoma via the inhibition of autophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;118:109339.
92. Wang Z, Valera JC, Zhao X, Chen Q, Gutkind JS. mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2017;36(3):491-502.
93. Soria LR, Allegri G, Melck D, Pastore N, Annunziata P, Paris D, et al. Enhancement of hepatic autophagy increases ureagenesis and protects against hyperammonemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(2):391-6.

94. Liu K, Ren T, Huang Y, Sun K, Bao X, Wang S, et al. Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma. *Cell death & disease*. 2017;8(8):e3015.
95. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015;348(6230):56-61.
96. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology*. 2004;6(12):1221.
97. Wu M, Zhang P. EGFR-mediated Autophagy in Tumourigenesis and Therapeutic Resistance. *Cancer letters*. 2019.
98. Booth LA, Roberts JL, Dent P, editors. The role of cell signaling in the crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of tumor cell survival in response to sorafenib and neratinib. *Seminars in cancer biology*; 2019: Elsevier.
99. Luan H, Yao J, Chen Z, Duan D. The 40S Ribosomal Protein S6 Response to Blue Light by Interaction with SJAUREO in *Saccharina japonica*. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(10):2414.
100. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(11):1033-44.
101. Liu D, Liu Y, Chen G, He L, Tang C, Wang C, et al. Rapamycin enhances repressed autophagy and attenuates aggressive progression in a rat model of IgA nephropathy. *American journal of nephrology*. 2017;45(4):293-300.
102. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*. 2014;19(4):555-66.