

***EFFECTO DE LAS INMUNOGLOBULINAS G POLICLONALES DE PACIENTES
CON DIFERENTES MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL SÍNDROME
ANTIFOSFOLÍPIDO SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES Y MONOCITOS:
POSIBLE MECANISMO PROTROMBÓTICO.***

Luisa Fernanda Peláez Tabares

Trabajo de investigación para optar al título de Bióloga

Asesora

Manuela Velásquez Berrío

Biol. MSc. PhD (c)

Co-asesora

Ángela Patricia Cadavid Jaramillo. MD. MSc. DSc

Docente y coordinadora Grupo Reproducción

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y naturales

Instituto de Biología

El Carmen de Viboral

2020

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Anticuerpos antifosfolípido (aAFL)	7
1.2 Efecto de los aAFL sobre el endotelio.....	8
1.3 Efecto de los aAFL sobre monocitos	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 Descripción del estudio.....	13
2.2 Criterios clínicos y de laboratorio de síndrome antifosfolípido:.....	13
2.3 Población de estudio.....	14
2.4 Obtención de muestras.....	15
2.5 Cultivos celulares	16
2.6 Estandarización del control positivo.....	17
2.7 Ensayos con las IgG de las pacientes	18
2.8 Análisis en Flowjo.....	19
2.9 Análisis estadístico	20
3. RESULTADOS	21
3.1 Expresión de la ICAM-I.....	21
3.2 Expresión de la VCAM-I.....	21
3.3 Expresión de CX3CL1.....	22
3.4 Expresión de E selectina.....	22
4. DISCUSIÓN	23
5. CONCLUSIÓN.....	29
6. FIGURAS	30
AGRADECIMIENTOS	45
REFERENCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de datos en el programa Flowjo®.....	30
Figura 2. Expresión de ICAM-I en células HUVEC estimulados con LPS y TNF- α	31
Figura 3. Expresión de ICAM-I en células THP-1 estimuladas con LPS y TNF- α ..	32
Figura 4. Expresión de ICAM-I en células HUVEC estimuladas con IgG.....	33
Figura 5. Expresión de ICAM-I en monocitos THP-1 estimulados con IgG.....	34
Figura 6. Expresión de VCAM-I en células HUVEC y monocitos THP-1 estimulados con LPS.	35
Figura 7. Expresión de VCAM-I en células HUVEC estimuladas con IgG de las pacientes del estudio.	36
Figura 8. Expresión de VCAM-I en monocitos THP-1 estimulados con IgG.	37
Figura 9. Expresión de CX3CL1 en células HUVEC y monocitos THP-1 estimulados con LPS.	38
Figura 10. Expresión de CX3CL1 en células HUVEC estimuladas con IgG.	39
Figura 11. Expresión de CX3CL1 en células monocitos THP-1 estimulados con IgG.	40
Figura 12. Expresión de E selectina en células HUVEC estimuladas con LPS.	41
Figura 13. Expresión de E selectina en células THP-1 estimuladas con LPS.	42
Figura 14. Expresión de E selectina en células HUVEC estimuladas con IgG.	43
Figura 15. Expresión de E selectina en monocitos THP-1 estimulados con IgG. ...	44

RESUMEN

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de anticuerpos antifosfolípido (aAFL) y manifestaciones clínicas de trombosis y morbilidad gestacional. Los eventos tromboticos se asocian con la activación de las células endoteliales y los monocitos. En este trabajo, se evaluó el efecto de las inmunoglobulinas G (IgG) de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas del SAF sobre la activación de células endoteliales y monocitos. Las pacientes incluidas en el estudio se dividieron en diferentes grupos de acuerdo con las características clínicas y la positividad para los aAFL: mujeres con morbilidad gestacional positivas para aAFL no criterio (MG+); mujeres positivas para aAFL criterio con morbilidad gestacional y trombosis, clasificadas en refractarias primarias o sin otras enfermedades autoinmunes (MG/TV/RI+), refractarias secundarias (MG/TV/RII+) y no refractarias (MG/TV/NR), mujeres con trombosis únicamente clasificadas en primarias (TV/I+) y secundarias (TV/II+). Como grupos control se incluyeron pacientes con morbilidad gestacional (MG-); mujeres con trombosis únicamente, primarias (TV/I-) o secundarias (TV/II-) y mujeres con embarazos previos sin complicaciones (SHN), todas negativas para aAFL. Los estímulos se realizaron por 24 horas en ausencia/presencia de la beta 2 glicoproteína I (β_2 GPI) principal antígeno y cofactor de los aAFL. El efecto de las IgG sobre la activación de las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y los monocitos (THP-1) se evaluó por citometría de flujo mediante detección de la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), la E selectina y la fractalquina.

El efecto de las IgG de grupos de mujeres con SAF primario refractario MG/TV+/RI+ fue dependiente de la β_2 GPI en todos los casos, lo que sugiere que los aAFL anti- β_2 GPI podrían ser más patogénicos que los no dependientes considerando que estas pacientes presentan ambas manifestaciones clínicas del SAF además de la refractariedad y las IgG del grupo con TV/I+ aumentaron la expresión de VCAM-1 y

E selectina en células HUVEC y en monocitos estas mismas IgG indujeron incremento de VCAM-I y fractalquina de manera dependiente e independiente de la β_2 GPI. Los resultados anteriormente descritos indican que los anticuerpos de pacientes con SAF primario inducen la expresión de moléculas de adhesión en endotelio y monocitos.

Palabras clave: Síndrome antifosfolípido, anticuerpos antifosfolípido, mecanismos protrombóticos, SAF primario, adhesión, células endoteliales, monocitos.

1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome Antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por manifestaciones clínicas de trombosis o morbilidad gestacional y la presencia persistente de pruebas de laboratorio positivas para anticuerpos antifosfolípidos (aAFL)(1). El SAF puede definirse como primario cuando no existen otras enfermedades de base asociadas, y se clasifica como secundario cuando existen patologías autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) o la artritis reumatoide (2). Se ha reportado que la incidencia del SAF es de 5 casos nuevos por 100.000 personas cada año y la prevalencia es alrededor de 40 a 50 casos por cada 100.000 personas (3). Los aAFL pueden presentarse en 1 al 7% de los embarazos y en más del 20% de pacientes con historias de aborto recurrente (4-7). Algunos de los aAFL requieren de la proteína β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) como cofactor para unirse a las membranas de las células endoteliales y a los monocitos (8). Esta unión activa el endotelio e induce la producción de moléculas pro-inflamatorias que promueven la adhesión de monocitos (9). Los aAFL al unirse directamente a los monocitos incrementan la expresión del factor tisular (FT) implicado en la vía de coagulación extrínseca favoreciendo los fenómenos trombóticos (10). La interacción de los monocitos y el endotelio se requiere para mantener la homeóstasis vascular, ya que son los monocitos, específicamente los no clásicos ($CD14^{++}CD16^{+}$) con una alta expresión del receptor CX3CR1 (para fractalquina CX3CL1) que les permite la adhesión y la migración rápida a los sitios de inflamación; estos tienen una función de patrullaje en el lumen de diferentes territorios vasculares como venas y arterias de la dermis, mesenterio, pulmón y cerebro; lo anterior con el fin de remover células dañadas y detritos tanto en estado basal como en eventos inflamatorios (11-14). En el SAF hay una sobre-expresión del FT , uno de los iniciadores más potentes de la coagulación, producido principalmente por los monocitos y el endotelio (15). Se ha evidenciado que en el suero de pacientes con SAF hay un incremento de FT soluble en concomitancia con un aumento en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (16). En

monocitos de pacientes con SAF se han observado altos niveles del VEGF asociado con la producción del FT (10, 17). En comparación con otras células del sistema inmune como los neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, los monocitos son la principal fuente de FT, además existe evidencia directa de que este factor puede ser transferido a los granulocitos (18). La producción del FT estaría favoreciendo los eventos trombóticos característicos del SAF que podrían estar siendo potenciados en la interacción monocito-endotelio. En eventos iniciales de esta interacción, las células endoteliales estimuladas con aAFL producen la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) que favorece la adhesión de los monocitos (19). La sobreexpresión de MCP-1 por las células endoteliales en presencia de aAFL se ha asociado con la adhesión celular, la formación de placas ateroscleróticas y el desarrollo de fenómenos trombóticos, eventos característicos en los pacientes con SAF (19-21).

1.1 *Anticuerpos antifosfolípido (aAFL)*

Los aAFL son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos contra una variedad de fosfolípidos y proteínas transportadoras de fosfolípidos (1). Pueden ser IgG o IgM, que se unen al complejo formado por fosfolípidos aniónicos, principalmente cardiolipina, y proteínas plasmáticas que se unen a estos fosfolípidos, como la β_2 GPI (22). Estos anticuerpos pueden activar al endotelio y a otras células del sistema inmune como los monocitos (9). La β_2 GPI es una proteína plasmática soluble de forma circular de 48 kDa, conformada por cinco dominios, el V conformado por un bloque de lisina que permite la unión de esta proteína a la membrana de las células endoteliales y monocitos; se ha propuesto que en condiciones fisiológicas normales su función es la regulación del complemento y la hemostasia, y en el SAF se ha establecido como uno de los principales antígenos

de los aAFL, esta adquiere una conformación lineal que media las uniones con los aAFL y las membranas celulares (22, 23).

1.2 Efecto de los aAFL sobre el endotelio

El endotelio es una monocapa de células que recubre la parte interna de los vasos sanguíneos, su principal función es la formación de una barrera semipermeable entre la sangre y los tejidos (24). En condiciones fisiológicas las células endoteliales regulan la homeostasis vascular, la cual implica mantener un balance entre un estado vasodilatador y uno vasoconstrictor (25). La vasodilatación se caracteriza por producción de óxido nítrico (NO) y prostaciclina; en la vasoconstricción se genera endotelina-1, angiotensina I, especies reactivas del oxígeno y tromboxano A₂ (25). Además, las células endoteliales expresan algunos factores antiplaquetarios y anticoagulantes como trombomodulina, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), y heparán sulfato, los cuales inhiben la agregación plaquetaria y la coagulación (24, 25). Cuando se presentan cambios o alteraciones en esta regulación ya sea por la presencia de patógenos o aAFL, disminuye el estado vasodilatador, con lo cual se producen citoquinas proinflamatorias, se expresan factores implicados en la coagulación y se generan nuevas interacciones celulares, no solo entre células endoteliales sino con plaquetas y células del sistema inmune como los monocitos, favoreciendo la inflamación y la coagulación (24).

En la patología del SAF, los aAFL se unen a las membranas de las células endoteliales utilizando como cofactor la proteína plasmática β_2 GPI, la cual una vez unida al endotelio cambia su conformación exponiendo sus dominios favoreciendo la unión de los aAFL (26). El complejo β_2 GPI-aAFL se une a diferentes moléculas de la membrana celular como:

- a) Receptores TLR o receptores tipo Toll (Toll like receptors) 2 y 4: ambos son receptores expresados en las células endoteliales con un dominio intracelular y otro extracelular al cual se une el complejo β_2 GPI-aAFL (27). La activación

de las células endoteliales posterior a la unión del complejo (β_2 GPI-aAFL) al TLR2 se demostró experimentalmente por el aumento en la expresión del factor de transcripción NF-kappa B (NF- κ B) lo que conduce a un estado proinflamatorio con la producción de citoquinas como la interleucina 1 (IL-1 β) (27). Por la unión de β_2 GPI-aAFL al TLR4 se activa la cascada de señalización que incluye a la proteína adaptadora MyD88, la fosforilación de proteína quinasa activada por mitógeno (p38MAPK) que activa el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TRAF2) que favorece la translocación del NF- κ B al núcleo, induciendo la transcripción de diversos genes para la producción de citoquinas pro inflamatorias como IL-6 e IL-8, la expresión de la molécula de adhesión celular E selectina y la molécula de adhesión vascular I (VCAM-I) (28). Además, la unión de los aAFL por esta vía también estimula la producción de FT (28, 29).

- b) ApoER2: la unión del complejo al receptor 2 de apolipoproteína E, causa una disminución en la producción de NO necesario para el tono vascular, la comunicación celular y la adhesión de leucocitos (30). Esta disminución es causada porque la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), una isoforma de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que produce NO en las células endoteliales no es activada. La activación de esta enzima es inhibida a través de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) encargada de su desfosforilación; se ha observado que PP2A se activa en presencia del complejo β_2 GPI-aAFL y por ende hay una disminución en la producción de NO (30, 31).
- c) Heparán sulfato: polisacárido presente en la membrana de las células endoteliales, que es requerido para la correcta actividad anticoagulante de la anti-trombina; la alteración de esta vía desencadena la activación de la cascada de coagulación (31, 32).

Los aAFL inducen la expresión endotelial de la molécula de adhesión VCAM-I, la molécula de adhesión intercelular I (ICAM-I) y la selectina-E, receptores involucrados directamente en la unión con los monocitos mediando eventos

inflamatorios (9, 10, 33). El aumento en la expresión de las moléculas de adhesión induce la unión de estos monocitos al endotelio y en consecuencia este pierde algunas de sus funciones reguladoras (34). En los estudios previamente revisados y mencionados, los ensayos fueron realizados con células endoteliales de macro vasculatura como las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC).

Se ha evidenciado que los aAFL específicamente los anti- β_2 GPI a través de los diferentes mecanismos mencionados anteriormente desencadenan la activación endotelial, la expresión de moléculas de adhesión que median las interacciones celulares, la liberación de citoquinas y quimiocinas inflamatorias implicadas en la fisiopatología del SAF. Sin embargo, estos mecanismos no se han descrito en presencia de aAFL de pacientes con cada una de las manifestaciones clínicas, aún no se han caracterizado los receptores, las vías intracelulares y el resultado de la activación celular mediada por estos anticuerpos; el estudio de los procesos celulares inducidos por los aAFL de las pacientes clasificadas de acuerdo a sus manifestaciones clínicas permitiría evidenciar si hay efectos diferenciales en la fisiopatología de los eventos trombóticos o de morbilidad gestacional entre las pacientes (31). Los hallazgos de este estudio contribuirán al entendimiento de uno de los mecanismos de acción de los diferentes aAFL en un modelo de adhesión celular, sobre el cual se pueden evaluar tratamientos dirigidos o específicos para las pacientes con SAF obstétrico refractario o los casos más severos.

1.3 Efecto de los aAFL sobre monocitos

Los monocitos son células del sistema inmune que están presentes en circulación y expresan en su superficie diferentes moléculas de adhesión que median las interacciones célula-célula (endotelio-monocitos)(24). Los monocitos también poseen receptores como el TLR4 al que se une la β_2 GPI y posteriormente los aAFL, activando la vía de NF- κ B que participa en la transcripción y la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la IL-1 β y el FT, siendo este último el mediador para iniciar la cascada de coagulación y los fenómenos trombóticos (8, 10, 24, 35-38). También se ha evidenciado un incremento de FT en monocitos estimulados con MCP-1 (37). En otros estudios, las células endoteliales estimuladas con aAFL producen quimiocinas como fractalquina (CX3CL1) y MCP-1 que median y facilitan la adhesión de los monocitos al endotelio (19, 39). Se ha evidenciado que los anti- β_2 GPI inducen la actividad pro-coagulante de monocitos al aumentar la expresión y liberación de FT que al unirse con el factor VIIa inicia la coagulación por la vía extrínseca (40, 41).

Otra de las vías que puede activarse en presencia de los aAFL es la vía del blanco de la rapamicina en células de mamíferos (mTOR) que aumenta la expresión de FT e IL-8 en la línea celular monocítica THP-1 y en monocitos primarios (42). Se ha demostrado que la rapamicina mediante la inhibición de esta vía, podría prevenir los eventos trombóticos y la inflamación en pacientes con SAF (42). En adición a lo anterior, la adhesión de los monocitos al endotelio en presencia de aAFL induce estrés oxidativo y la activación de p38 MAPK y el NF- κ B que en consecuencia provocan la producción de citoquinas inflamatorias e inducen la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-I y E selectina para la interacción endotelio-monocitos y la expresión del FT para la coagulación (33, 34, 43).

Aún no son claros los efectos de los aAFL en asociación con las manifestaciones clínicas de las pacientes, el esclarecimiento de estos efectos permitiría el desarrollo de nuevas terapias específicamente en los casos más severos o refractarios del SAF, por lo cual el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de los aAFL de

pacientes con diferentes manifestaciones clínicas del SAF sobre la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-I, VCAM-I, E selectina y CX3CL1, en la línea celular monocítica THP-1 y en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano HUVEC.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción del estudio

Se realizó un estudio de corte transversal con un componente experimental *in vitro*, en el que se determinó el efecto de las IgG purificadas de los sueros de las pacientes, sobre la expresión de moléculas de adhesión en monocitos y células endoteliales.

2.2 Criterios clínicos y de laboratorio de síndrome antifosfolípido:

Para la selección de los pacientes se tuvieron en cuenta los criterios clínicos revisados de Sapporo que incluyen: trombosis arterial o venosa en cualquier territorio vascular y/o morbilidad gestacional. Esta última definida como una o más muertes fetales por encima de la semana 10 de gestación con morfología normal, detectada por ultrasonografía o examen directo; uno o más partos prematuros hasta la semana 34 de gestación como consecuencia de eclampsia, preeclampsia grave o insuficiencia placentaria; tres o más abortos espontáneos consecutivos antes de la semana 10 de gestación después de descartar otras causas conocidas de pérdida gestacional (1). En los criterios de laboratorio se consideraron la presencia de títulos moderados o altos de anticuerpos IgG o IgM, anti-cardiolipina (aCL) o anti- β_2 GPI o pruebas positivas para el anticoagulante lúpico (AL), persistentes en un intervalo de 12 semanas. Adicionalmente se determinó la presencia de anticuerpos contra otros fosfolípidos clasificados como "no-criterio" pero que varios estudios han demostrado su importancia en morbilidad gestacional (anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidilinositol, anti-fosfatidiletanolamina, anti-fosfatidilglicerol, anti-ácido fosfatídico). Para esta detección se usó un ELISA casero estandarizado en el Programa de Aborto Habitual del Grupo Reproducción de la Universidad de Antioquia y se consideró el mismo criterio de positividad al menos en dos ocasiones con intervalo de 12 semanas (44).

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) (45). 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).

2.3 Población de estudio

Las pacientes incluidas en el estudio se dividieron en diferentes grupos de acuerdo con las características clínicas y la positividad para los aAFL, así:

- Mujeres positivas para aAFL criterio con morbilidad gestacional y trombosis (n=11), clasificadas en: refractarias primarias o sin otras enfermedades autoinmunes (**MG/TV/RI+, n=3**); refractarias secundarias (**MG/TV/RII+, n=2**), y no refractarias (**MG/TV/NR, n=6**). Estas pacientes presentaron doble positividad (anticuerpos anti-cardiolipina y anti- β_2 GPI) y en algunos casos triple positividad para los aAFL criterio, además presentaron títulos más altos de los anticuerpos, comparados con los demás grupos.
- Mujeres positivas para aAFL criterio con trombosis únicamente clasificadas en primarias (**TV/I+, n=6**) y secundarias (**TV/II+, n=4**).
- Mujeres con morbilidad gestacional, positivas para aAFL no criterio o seronegativas para aAFL criterio (**MG+, n=10**).

Como grupos control se incluyeron:

- Mujeres con morbilidad gestacional (**MG -, n=10**)

- Mujeres con trombosis únicamente que se clasificaron como primarias (**TV/I-**, **n=5**) o secundarias (**TV/II-**, **n=5**)
- Mujeres con embarazos previos sin complicaciones (**SHN**, **n=10**), todas negativas para aAFL.

Como criterios de exclusión del estudio se tuvieron las siguientes consideraciones: 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 como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide, debido a la inclusión de pacientes con SAF secundario.

2.4 Obtención de muestras

Todas las pacientes del estudio fueron atendidas pre-concepcionalmente en el Programa de Pérdida Gestacional Recurrente del Grupo de Reproducción y en la Clínica de Anticoagulación del Hospital San Vicente Fundación. La recolección de las muestras de suero fue aprobada por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y del Hospital San Vicente Fundación.

Se ha reportado que los efectos más patológicos de los aAFL son inmunoglobulinas del isotipo IgG, por lo tanto se aislaron IgG y no IgM para los ensayos.

Luego de obtener el suero de las pacientes, se realizó el aislamiento de la IgG del suero por cromatografía de afinidad de la proteína G-sefarosa (MAbtrap® Kit, GE17-1128-01, GE Healthcare). Este kit contiene una columna de proteína G sefarosa High, a la cual se le adicionó el suero de cada grupo de pacientes y por medio de intercambio iónico, las IgG quedaron retenidas en la columna unidas a la proteína G-sefarosa; se lavaron las uniones inespecíficas y con un buffer de elución se recuperaron de la columna las IgG totales. Para asegurar que las IgG aisladas no

poseían endotoxinas se realizó la prueba de Limulus Amoebocyte Lysate assay (Sigma®, USA) y en el caso de presentar endotoxinas positivas, las muestras se pasaron por una columna de remoción de endotoxinas (Detoxi-Gel endotoxin removing columns, Fisher Scientific, USA). Posteriormente, se realizó la diálisis de las IgG recuperadas, se fraccionaron y luego, estas fracciones se corrieron en un gel de electroforesis para verificar su pureza y su integridad.

Al finalizar este proceso de aislamiento y purificación, las IgG fueron recuperadas y almacenadas como un pool de IgG de cada uno de los grupos de las pacientes.

La concentración de IgG de cada uno de los grupos utilizada para los estímulos celulares (250 µl/ml) se definió por trabajos previos del grupo Reproducción.

2.5 Cultivos celulares

Las células HUVEC fueron aisladas por digestión enzimática y mecánica de cordones umbilicales provenientes del parto de mujeres con un embarazo normal según protocolo estandarizado en el Grupo Reproducción (46). Se perfundió la vena umbilical con una aguja pericraneal #21, se adicionó 5 ml de colagenasa tipo I (Invitrogen, USA) ocluyendo los extremos con pinzas Kelly curvas y se incubaron a 37°C/20 min. Se extrajo el contenido de la vena umbilical aplicando una fricción moderada y se centrifugó a 300xg/5min/22°C. El botón de células resultante se cultivó en frascos con filtro de 175 cm² Nunc™ (Thermo Scientific, USA) con 10 ml de medio de cultivo basal de células endoteliales (PromoCell) suplementado con factores de crecimiento como suero bovino fetal, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de células endoteliales (extracto hipotalámico bovino) heparina e hidrocortisona. Después de 4 horas de cultivo se realizaron lavados con PBS y antibióticos para remover detritos y células no adherentes (46).

Las células HUVEC fueron usadas hasta dos pases, ya que en trabajos previos del Grupo Reproducción se ha observado que en los pases iniciales se conserva la

morfología y la expresión de la moléculas de adhesión, específicamente CD31 (PECAM), la cual participa en las uniones intercelulares de las células endoteliales y además es usada para detectar la pureza del endotelio aislado de los cordones umbilicales (44). Para cada ensayo se utilizó una clona de células endoteliales diferente.

Los monocitos THP-1 provienen de una leucemia monocítica aguda de un infante de un año; estas células se obtuvieron de la ATCC (CRL-1593, USA) y posteriormente se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%.

2.6 Estandarización del control positivo

En platos de 24 pozos se sembraron 1×10^5 monocitos o células endoteliales por pozo y se realizaron estímulos con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma, Alemania), a concentraciones de 0.1, 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ y TNF- α a 1, 10, 100 y 250 ng/ml . En platos Falcon TM (Thermo Fisher Scientific, USA) de 24 pozos se cultivaron 3×10^5 células HUVEC (las células se desprendieron de su cultivo inicial con 3 ml de tripsina x 2 min) y THP-1 por pozo. El cultivo se llevó a cabo por 24 horas en 250 μl de Opti-MEM (Gibco, USA). Pasado este tiempo, el contenido de cada pozo con las células THP-1 y HUVEC (se desprendieron del pozo utilizando 50 μl de tripsina) se adicionó a los tubos de citometría correspondientes, se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm, luego al botón se le añadió 3 μl de los respectivos anticuerpos como se muestra en la **tabla 1**. Posteriormente, se adicionó 300 μl de PBS y se adquirieron 10000 eventos por tubo mediante la lectura en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson, USA). Los datos fueron analizados en el programa de análisis de datos de citometría *FlowJo*®.

2.7 Ensayos con las IgG de las pacientes

Las células HUVEC y THP-1 se estimularon por 24 horas con 250 µg/ml de los pools de IgG de los grupos de las mujeres del estudio. Previo al tratamiento con las IgG, las células fueron incubadas con β₂GPI a 5 µg/ml para detectar el efecto de las IgG anti- β₂GPI presentes. Como control positivo en la inducción de moléculas de adhesión se utilizó LPS a 0.1, 1, 2 o 4 µg/ml. Posterior al estímulo, se adicionaron los anticuerpos presentados en la tabla 1 (3 µl de cada uno, en 300 µl de PBS) y para bloquear las uniones inespecíficas de estos anticuerpos se adicionó 30 µl de solución de bloqueo (SBF al 0,5%) e inmediatamente se realizó la lectura en el citómetro de flujo.

Los valores se indican como el porcentaje de células positivas e intensidad mediana de fluorescencia (IMF). Los datos de los controles se normalizaron con respecto a las células sin estímulo o basal.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para el marcaje y la detección de las moléculas de adhesión, con su respectivo fluorocromo.

Molécula de adhesión	Anticuerpo-fluorocromo	Marca	Isotipo
ICAM-I	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Biolegend	Mouse IgG1, κ Anti-human
VCAM-I	Ficoeritrina (PE) y FITC	R&D SYSTEMS, Biolegend	Rat IgG2a, κ Anti-mouse
CX3CL1	Alofocianina (APC)	R&D SYSTEMS	Mouse IgG1 Anti-human

E selectina	Alexa Fluor 700 y la proteína clorofila peridina (PerCP)	Southern Biotech, R&D SYSTEMS	Mouse(BALB/c) IgG1κ Anti-human y Mouse IgG1 Anti-human
-------------	--	-------------------------------	--

Los anticuerpos fueron evaluados con perlas de poliestireno o compBeads (Becton Dickinson), las cuales cuando se mezclan permiten detectar la fluorescencia de fondo y establecer los niveles de compensación (47).

2.8 Análisis en Flowjo

Se realizó la exclusión de agregados, utilizando las células solas con los parámetros de tamaño: altura, *forward scatter heigth* (FSC-H) versus área, *forward scatter area* (FSC-A) (Figura 1, A). Sobre las células no agregadas se definió la región de células viables o negativas para yoduro de propidio (PI) (Figura 1, B). Dentro de la región anterior, se estableció una nueva para células viables por su tamaño y granularidad: (FSC-A) vs *side scatter area* (SSC-A) (Figura 1, C). Sobre las células viables, la región positiva para cada una de las moléculas de adhesión se determinó con el control de fluorescencia menos uno (Fluorescence minus one, FMO) (Figura 1, D). En los análisis de citometría de flujo hay tres categorías de controles: 1) configuración y validación del instrumento, 2) de activación y 3) biológicos (47). Los primeros hacen referencia al funcionamiento y mantenimiento del equipo, consiste en ajustar los parámetros como voltajes y filtros ópticos, para garantizar una estabilidad y un buen rendimiento en cada uno de los análisis; los controles biológicos son aquellos que implican la lectura de estímulos celulares, por ende se deben tener células con y sin el estímulo; los controles de activación y de entrada se conocen como controles de FMO, con los cuales se logra determinar la especificidad de un anticuerpo por su antígeno, se basa en la tinción o no de la molécula en cuestión y la comparación de las dos señales (47).

2.9 *Análisis estadístico*

Los ensayos se realizaron por triplicado. La distribución de los datos se evaluó en con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Se realizó un ANOVA de una vía y la comparación entre medias se determinó con un post-test de Tukey. Los gráficos y los análisis se realizaron en el programa Prism7.

3 RESULTADOS

3.1 *Expresión de la ICAM-I*

Tanto el LPS a concentraciones de 0.1, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ como el TNF- α a 1, 10, 100 y 250 ng/ml, incrementaron el porcentaje de positividad y la IMF de ICAM-I en células HUVEC y monocitos THP-1 respecto a la expresión basal de esta molécula de adhesión (Figuras 2 y 3). La $\beta_2\text{GPI}$ incrementó la expresión de ICAM-I en ambos tipos de células (Figuras 4 y 5). Las IgG de los diferentes grupos de estudio no presentaron un efecto significativo en la expresión de ICAM-I ni en células endoteliales ni en monocitos (Figura 4 y 5).

3.2 *Expresión de la VCAM-I*

El LPS a concentraciones de 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ incrementó el IMF de VCAM-I en células HUVEC y monocitos respecto a la expresión basal (Figura 6). En todos los ensayos con endotelio y monocitos tratados con las IgG se incluyó el LPS como control positivo en una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, el cual aumentó la IMF de VCAM-I en ambos tipos celulares (Figuras 7 A-D y 8 A-D). En ausencia de la $\beta_2\text{GPI}$, el porcentaje de positividad de VCAM-I endotelial fue mayor en endotelio estimulado con las IgG de pacientes con TV/I+ comparado con el control de TV/I- (Figura 7 E y F). Sin embargo, de manera dependiente a la $\beta_2\text{GPI}$ las IgG de pacientes con MG/TV/RI+ aumentaron la IMF de VCAM-I en contraste con el SHN (Figura 7 G y H). Así mismo, en monocitos incubados únicamente con la IgG de pacientes con TV/I+ se observó un incremento en la IMF de VCAM-I contrastado con los grupos control con TV/I- y TV/II- (Figura 8 F-I).

3.3 Expresión de CX3CL1

El LPS a concentraciones de 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ incrementó el porcentaje de células positivas y la IMF de CX3CL1 en células HUVEC y monocitos THP-1 (Figuras 9 A-F). De manera dependiente de la $\beta_2\text{GPI}$, las IgG de TV/II- aumentaron la IMF de CX3CL1 endotelial en comparación con el control de SHN (Figura 10 E y F). En monocitos con $\beta_2\text{GPI}$, las IgG de MG/TV/RI+ incrementaron el porcentaje y la IMF de CX3CL1 comparado con SHN, de la misma manera los anticuerpos del grupo con TV/I+ indujeron el mismo efecto sobre la IMF de la molécula (Figura 11 F-H). Por su parte, las IgG de TV/I+ sin $\beta_2\text{GPI}$ acrecentaron el porcentaje de CX3CL1 monocítica comparado con el control de TV/II- (Figura 11 E).

3.4 Expresión de E selectina

Tanto el LPS a concentraciones de 0.1, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ como el TNF- α a 1, 10, 100 y 250 ng/ml, El LPS a concentraciones de 0.1, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ incrementaron el porcentaje y la IMF de células positivas para E selectina en células HUVEC y monocitos THP-1 y respecto a la expresión basal de esta molécula de adhesión (Figuras 12 y 13). La $\beta_2\text{GPI}$ fue requerida para que los anticuerpos de pacientes con MG/TV/RI+ y TV/I+ aumentaran la IMF de E selectina endotelial comparada con el efecto del SHN (Figura 14 F-H). Las IgG no tuvieron efecto significativo sobre la expresión de E selectina en presencia o ausencia de $\beta_2\text{GPI}$ en monocitos (Figura15).

4 DISCUSIÓN

En la literatura se ha reportado que los aAFL inducen la expresión de moléculas de adhesión que favorecen la interacción entre células endoteliales y monocitos, los cuales potencian la inflamación y la producción de moléculas procoagulantes, sin embargo, no se ha establecido como la activación de estas células se asocia con las condiciones clínicas de las pacientes (30, 34, 48). En los diferentes estudios mencionados previamente, las IgG aisladas de los individuos con SAF incluidos no se clasifican por manifestación clínica de trombosis, morbilidad gestacional o ambas, por lo cual no queda claro de que factor depende el efecto observado. El SAF puede presentarse como primario o secundario y en los dos casos se puede dar, trombosis, morbilidad gestacional o ambas (49, 50). Algunos pacientes no responden a la terapia convencional determinada por las condiciones clínicas y desarrollan SAF refractario (51). En nuestro estudio clasificamos a las pacientes con SAF en cinco grupos de acuerdo a la presentación clínica de la enfermedad, entre los cuales se incluyen dos grupos con SAF refractario tanto primario (MG/TV/RI+), como secundario (MG/TV/RII+) con todas las manifestaciones clínicas de la enfermedad y pacientes con SAF trombótico o vascular primario (TV/I+) y secundario (TV/II+), además se incluyó un grupo de mujeres con SAF no refractario con ambas manifestaciones clínicas de la enfermedad (MG/TV/NR+). De estos grupos, las mujeres con SAF primario con TV/I+ y MG/TV/RI+, presentaron un mayor efecto en la inducción de moléculas de adhesión en endotelio y monocitos, comparado con los demás grupos, lo que sugiere que sí existe una relación entre los efectos de los aAFL y las condiciones clínicas de este síndrome. En todos los experimentos se incluyó a la β_2 GPI, la cual en algunos resultados fue requerida para observar un efecto significativo de las IgG sobre la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-I, CX3CL1 y E selectina. Las IgG no mostraron diferencias entre los grupos sobre la expresión de ICAM endotelial o monocítica, pero se demostró que en la metodología implementada, el LPS y el TNF- α incrementaban su expresión en ambas células (Figura 2-5). La β_2 GPI puede unirse directamente al

receptor TLR4 y se transforma en correceptor de los aAFL para inducir activación endotelial; en monocitos se ha evidenciado que forma complejos con el LPS y activa la señalización de este mismo receptor (52). El LPS se comporta como un inductor de la expresión de β_2 GPI en tejidos vasculares, lo que favorece la unión de los aAFL y en consecuencia de eventos trombóticos (52).

Por su parte, en este estudio también se evaluó la molécula de adhesión VCAM-I o CD106, que al igual que ICAM-I es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y en condiciones de homeostasis vascular su expresión es reducida en la superficie de las células endoteliales, pero es rápidamente inducida por mediadores inflamatorios. VCAM-I interactúa con el antígeno leucocitario 4 muy tardío (VLA-4) lo cual permite las interacciones célula-célula y la adhesión celular (24). El LPS y el TNF- α se han utilizado como inductores de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y como potenciadores de la adhesión de monocitos al endotelio. En un estudio realizado en células HUVEC y en HUAEC cultivadas en presencia de LPS (1 μ g/ml) y TNF- α (1 ng/ml) se demostró que estos incrementaban la expresión de VCAM-I en la superficie de células HUVEC en comparación con las células no tratadas y con el efecto sobre células HUAEC, en donde la expresión de VCAM-I no fue significativa (53). El suero de pacientes con SAF presenta un incremento de sVCAM-I en su forma soluble y aumenta la expresión de RNAm y la cantidad de proteína de VCAM-I respecto al efecto del SHN como control en células HUVEC (54). En modelos *In vitro* con células HUVEC, se evidenció que el tratamiento con IgG de pacientes con SAF (≥ 100 μ g/ml) incrementaba la expresión de VCAM-I casi 4 veces más respecto a la expresión basal de esta molécula y a la inducida por IgG de SHN. En este mismo estudio se usó como control positivo 3 μ g/ml de LPS y se evidenció un aumento de hasta 3.6 veces más de VCAM-I respecto a su expresión basal en células endoteliales (9). En ratones BALB/c estimulados *in vivo* con IgG de pacientes con SAF, se demostró en células endoteliales de aorta, un incremento de

la expresión de VCAM-I en comparación con las IgG de SHN. Estos mismos autores encontraron que al añadir un inhibidor del NF- κ B, no se observaba la expresión de VCAM-I endotelial (48). En un modelo murino de SAF se encontró formación de trombina, sVCAM-I y otras moléculas de adhesión solubles inducidas por los aAFL en comparación con el plasma de ratones sin aAFL (55). Otra de las vías de señalización implicadas en la activación celular y el desarrollo de eventos trombóticos e inflamatorios por inducir la expresión de VCAM-I es la que involucra a la p38MAPK. Lo anterior, se evidenció en ratones tratados con IgG de pacientes con SAF primario y el inhibidor de la p38MAPK, con LPS como control. De estos ratones se aisló la aorta y se determinó que en presencia de IgG de pacientes con SAF aumentó la expresión de VCAM-I en comparación con las células provenientes de ratones no tratados y disminuyó en las células tratadas con el inhibidor (9, 24, 48, 53-56). La expresión de la VCAM-I se ha estudiado ampliamente y se conoce su participación en la adhesión celular y en la progresión de los procesos inflamatorios como el SAF (56). Sin embargo, en estos estudios no es clara la importancia de la expresión de VCAM-I en las presentaciones clínicas del SAF ni su contundencia en la severidad o refractariedad de los pacientes. Si bien existen estudios en los cuales se han incluido a las IgG de pacientes con SAF primario, no se ha tenido en cuenta la asociación con otras enfermedades autoinmunes ni la presencia de trombosis, morbilidad gestacional o ambas. En nuestro estudio se encontró que las IgG del grupo de pacientes con SAF primario específicamente con trombosis (TV/I+) aumentó el porcentaje de positividad de VCAM-I endotelial contrastado con el grupo control de mujeres con TV/I- y en monocitos las IgG de estas mismas pacientes incrementó el IMF de VCAM-I comparado con los controles de TV/I- y TV/II-. El efecto del grupo con TV/I+ fue independiente de la β_2 GPI, lo que sugiere que podrían ser los demás aAFL como los aCL que estarían activando al endotelio y a los monocitos mediante la expresión de VCAM-I. Sin embargo, los aAFL de mujeres con morbilidad gestacional, trombosis y refractariedad (MG/TV/RI+) requieren a la β_2 GPI para potenciar la expresión de VCAM-I endotelial,

lo que indica que este efecto estaría siendo inducido por los aAFL anti- β_2 GPI presentes.

Existen otras moléculas que pueden favorecer la activación endotelial e interacción con monocitos como la fractalquina o CX3CL1, conocida también como neurotactina, una proteína que pertenece a la subfamilia de quimiocinas con motivos de cisteína CX3C; esta puede estar presente en dos formas: una anclada a las membranas celulares que permite la interacción y la adhesión celular y otra soluble que funciona como quimio atrayente celular (57-59). La CX3CL1 se expresa principalmente en células endoteliales y en neuronas, su respectivo receptor CX3CR1 se expresa en leucocitos y en células gliales, lo cual permite las interacciones endotelio-monocitos y la quimiotaxis de otras células presentes en circulación en procesos inflamatorios (57-59). En el SAF, los aAFL específicamente los anti- β_2 GPI inducen en monocitos la expresión y liberación de citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β y el FT que activan las células endoteliales e inducen a su vez la expresión de las quimiocinas CX3CL1 y CCL5, que median la interacción con otras células presentes en circulación como las plaquetas promoviendo su agregación en los episodios trombóticos (60). En un análisis genético realizado en células HUVEC estimuladas con IgG anti- β_2 GPI purificadas del suero de pacientes con SAF, se encontró mediante micro arreglos y RT-PCR, a la CX3CL1 entre los genes inducidos por los aAFL (39). La expresión de la quimiocina CX3CL1 se ha estudiado en neuronas y en territorios cerebrales y aunque se ha evaluado su función en algunas células del sistema inmune, aún no es claro su participación en la activación de células endoteliales y monocitos en presencia de aAFL (57-59). En nuestros resultados se evidenció que el grupo con MG/TV/RI+ aumentó el porcentaje de células positivas para CX3CL1 y la IMF en monocitos en comparación con el control de SHN, todo esto de manera dependiente a la β_2 GPI. El efecto de las IgG del grupo con TV/I+ fue independiente de la β_2 GPI para incrementar el porcentaje de monocitos positivos para CX3CL1 en

comparación con el control de TV/II-, pero sí se requirió para aumentar la IMF de esta molécula respecto al SHN, lo que indica que estas IgG contienen aAFL dependientes e independientes de β_2 GPI que causan la activación de los monocitos. Los dos grupos con SAF primario, TV/II+ y MG/TV/RI+ presentaron efecto sobre la expresión de esta molécula.

Como perspectivas para futuros estudios se evaluará la expresión del receptor para fractalquina (CX3CR1) tanto en monocitos como en células endoteliales, ambas células estimulados con las IgG de los diferentes grupos de pacientes.

Finalmente se evaluó el efecto de las IgG en la expresión de la E selectina o CD62E, una glicoproteína de 115kDa. Esta molécula no tiene una expresión constitutiva en la membrana celular pero aumenta en presencia de citoquinas inflamatorias como la CCL2, la IL-1 β y al entrar en contacto con derivados bacterianos como el LPS. Su principal función es la de adhesión a leucocitos en los procesos inflamatorios (24, 61, 62). En un estudio realizado con células HUVEC estimuladas con el suero de pacientes con SAF, se encontró un aumento en la expresión de RNAm y la cantidad de proteína de E selectina respecto al efecto del SHN como control (54). En un experimento realizado *in vitro* en células HUVEC, se evidenció que al estimular estas células con IgG de pacientes con SAF (≥ 100 $\mu\text{g/ml}$) se incrementó la expresión de E selectina 3 veces más respecto a la expresión basal de esta molécula y a la inducida por IgG de SHN (9). En otro trabajo realizado *in vitro* en células HUVEC estimuladas con anticuerpos monoclonales anti- β_2 GPI derivados de pacientes con SAF (100 $\mu\text{g/ml}$), LPS (20 ng/ml), TNF- α y varias concentraciones de estatinas como fluvastatina y simvastatina se evidenció que los anticuerpos monoclonales, el LPS y el TNF- α aumentaban la expresión de E selectina respecto al efecto observado con IgG de SHN, además se observó una reducción de la expresión de esta molécula en presencia de las estatinas, lo que sugiere que estas podrían considerarse en el tratamiento del SAF como adición a las terapias ya existentes en los casos específicos donde se incrementa la expresión de moléculas de adhesión (63). En células HUVEC se realizó un estudio *in vitro* para evaluar la

expresión de E selectina e *in vivo* (ratones C57BL / 6), la adhesión de leucocitos y la formación de trombos en presencia de IgG de pacientes con SAF. Se determinó que la expresión de E selectina incrementó en presencia de IgG de pacientes con SAF respecto a su expresión basal y a la inducida por IgG de SHN. Así mismo, se evidenció que en presencia de aAFL aumentó la cantidad de leucocitos unidos al endotelio y la formación del trombo en comparación con el efecto en ratones tratados con IgG de SHN y los que carecían de E selectina (33). En este trabajo se encontró que los dos grupos con SAF primario TV/I+ y MG/TV+/RI+ aumentaron la expresión de E selectina de manera dependiente a la β_2 GPI en contraste con el control de SHN.

5 CONCLUSIÓN

Los resultados anteriormente descritos indican que los anticuerpos de pacientes con SAF primario inducen la expresión de moléculas de adhesión en endotelio y monocitos. El efecto de las IgG de grupos de mujeres con SAF primario refractario MG/TV+/RI+ fue dependiente de la β_2 GPI en todos los casos, lo que sugiere que los aAFL anti- β_2 GPI podrían ser más patogénicos que los no dependientes considerando que estas pacientes presentan ambas manifestaciones clínicas del SAF además de la refractariedad. La expresión de VCAM-I y E selectina en el endotelio podría estar asociada con el desarrollo de los eventos trombóticos y la morbilidad gestacional por activación y disfunción endotelial en estas pacientes. La expresión de CX3CL1 en monocitos también favorece la interacción con el endotelio potenciando la inflamación y producción de moléculas procoagulantes. Para este tipo de pacientes específicamente, las terapias dirigidas a bloquear la unión de la β_2 GPI como cofactor para los aAFL podría prevenir el efecto patogénico de estos auto-anticuerpos. En contraste, el grupo con TV/I+ indujo la expresión de moléculas de adhesión con o sin la β_2 GPI, en monocitos aumenta la expresión de VCAM-I y la de CX3CL1 en monocitos con o sin la β_2 GPI, pero la requiere para aumentar la IMF de CX3CL1 en monocitos y la E selectina endotelial. Lo anterior sugiere que estas pacientes tienen aAFL dependientes e independientes de β_2 GPI que pueden causar activación celular asociada con la expresión de moléculas de adhesión que en consecuencia favorecen los eventos trombóticos.

6 FIGURAS

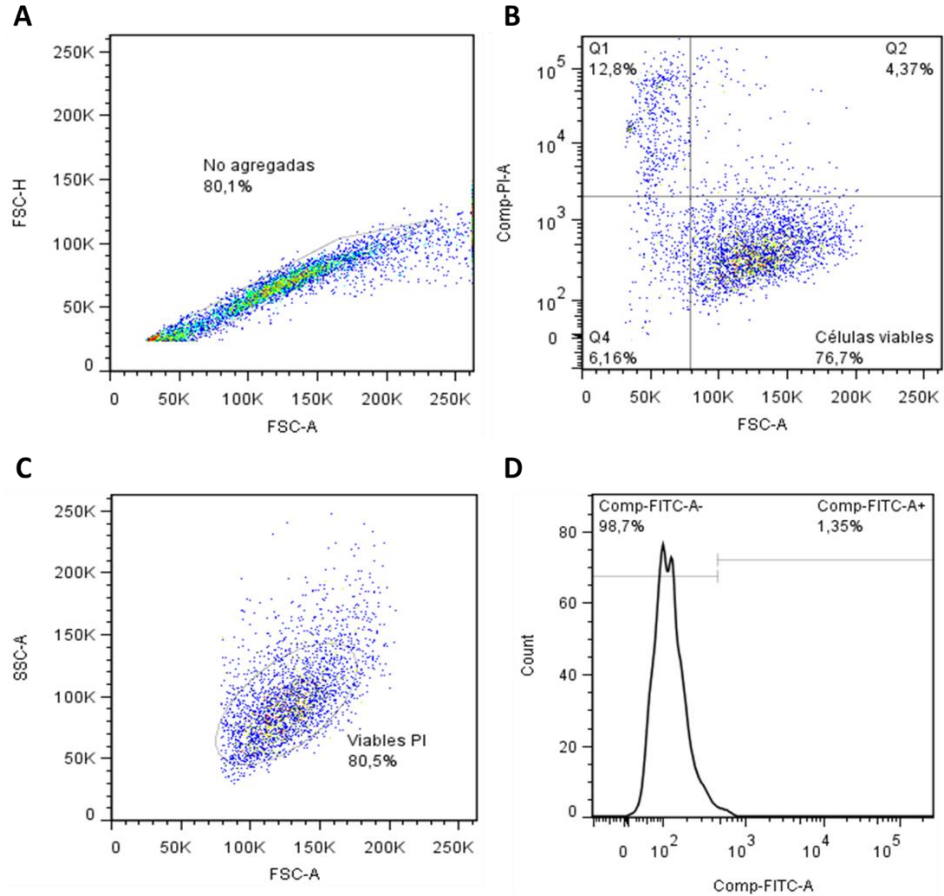


Figura 1. Análisis de datos en el programa Flowjo®.

(A) Exclusión de agregados en células HUVEC, parámetros FSC-A vs FCS-H. (B) Región de células HUVEC viables, parámetros PI vs FSC-A. (C) Células viables obtenidas de la región previamente establecida, parámetros SSC-A vs FSC-A. (D) Porcentaje de células positivas y negativas para ICAM-I.

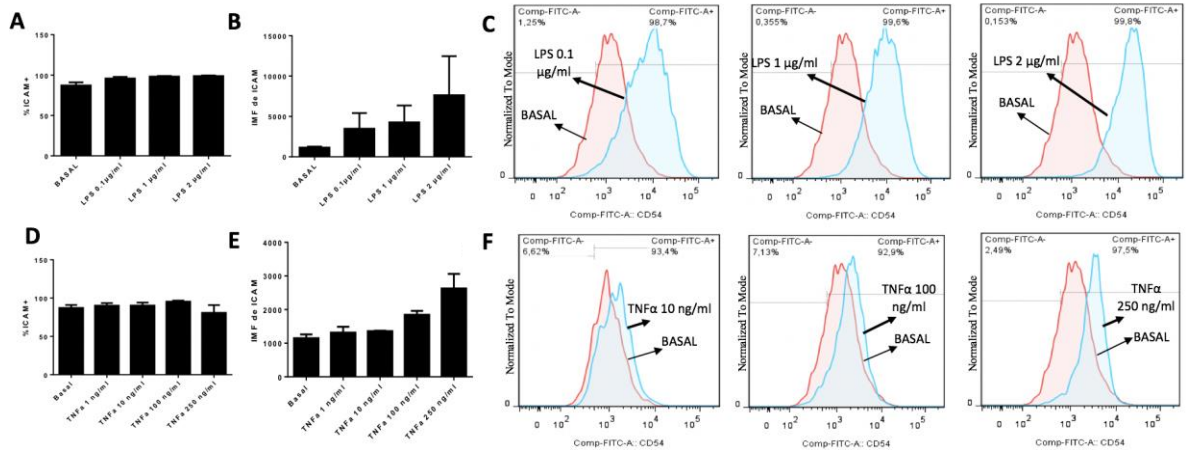


Figura 2. Expresión de ICAM-I en células HUVEC estimulados con LPS y TNF- α .

(A) Las concentraciones de 0.1, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de LPS incrementan el porcentaje de células positivas para ICAM. (B) Se observó un incremento en la IMF de ICAM-I en las células tratadas con las mayores concentraciones de LPS. (C) Aumento en la expresión de ICAM-I con todas las concentraciones de LPS respecto a la expresión basal de esta molécula (rojo). (D) Las concentraciones de 1, 10, 100 y 250 ng/ml de TNF- α incrementan el porcentaje de células positivas para ICAM-I. (E) Se observó un incremento en la IMF de ICAM-I en las células tratadas con mayores concentraciones de TNF- α . (F) Aumento en la expresión de ICAM-I con todas las concentraciones de TNF- α respecto a la expresión basal de esta molécula (rojo).

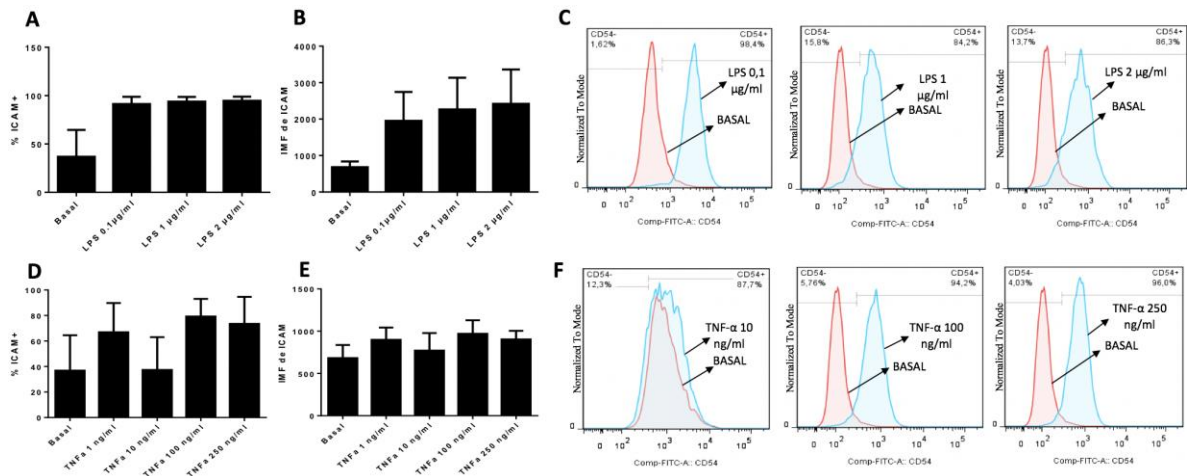


Figura 3. Expresión de ICAM-I en células THP-1 estimuladas con LPS y TNF-α.

(A) Las concentraciones de 0.1, 1 y 2 μg/ml de LPS incrementaron el porcentaje de células positivas para ICAM-I. (B) Se observó un incremento en la IMF de ICAM-I en las células tratadas con mayores concentraciones de LPS. (C) Aumento en la expresión de ICAM-I con una concentración de 0.1, 1 y 2 μg/ml de LPS respecto a la expresión basal de esta molécula (rojo). (D) Las concentraciones de 1, 100 y 250 ng/ml de TNF-α incrementan el porcentaje de células positivas para ICAM-I, mientras que con una concentración de 10 ng/ml permaneció constante. (E) Se observó un incremento en la IMF de ICAM-I en las células tratadas con mayores concentraciones de TNF-α. (F) Aumento en la expresión de ICAM-I con una concentración de 1, 100 y 250 ng/ml de TNF-α respecto a la expresión basal de esta molécula (rojo).

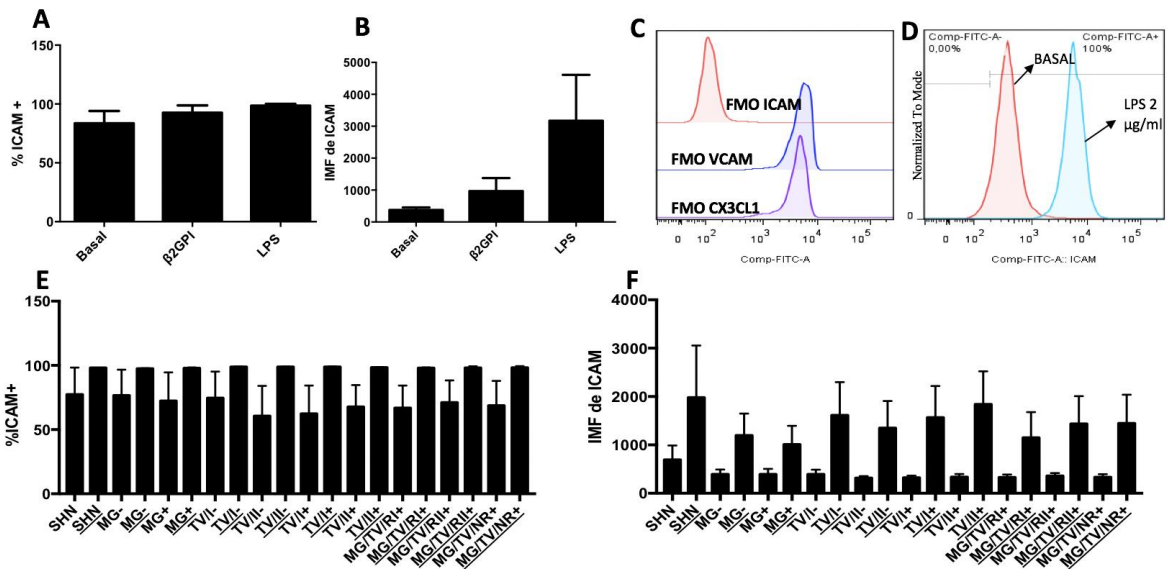


Figura 5. Expresión de ICAM-I en monocitos THP-1 estimulados con IgG.

(A, B y D). El LPS en una concentración de 2 μ g/ml se incluyó como control positivo en todos los ensayos e incrementó la expresión de ICAM-I en contraste con las células sin estímulo. (C) Histogramas representativos de la expresión de ICAM-I respecto a su FMO. (E y F) Las IgG de las mujeres del estudio no presentaron un efecto significativo en la expresión de ICAM-I sobre los monocitos THP-1. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes. (E y F) Los datos obtenidos de las células endoteliales tratadas previamente con la β 2GPI y las IgG de las mujeres del estudio se indican en subrayado.

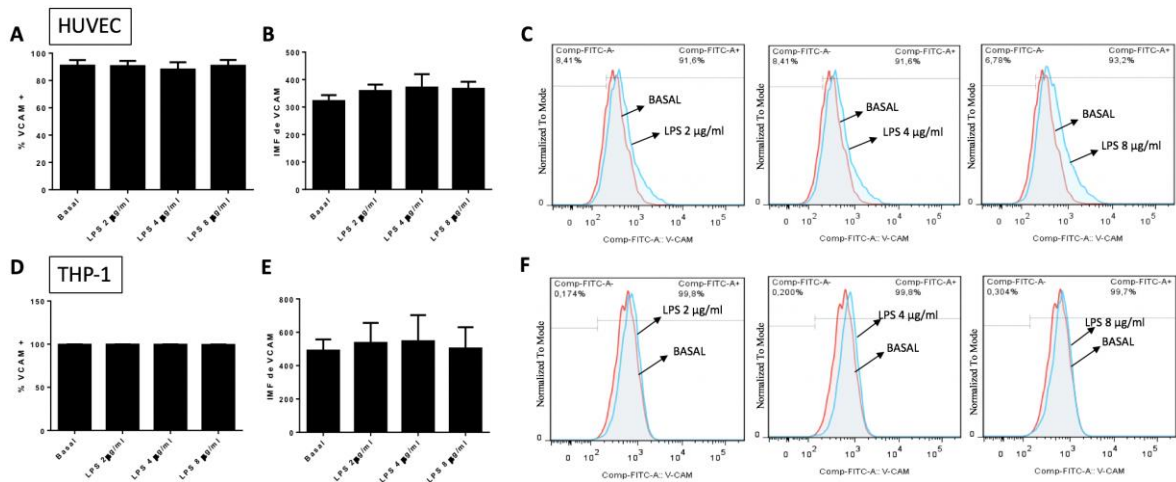


Figura 6. Expresión de VCAM-I en células HUVEC y monocitos THP-1 estimulados con LPS.

(A) Porcentaje de positividad de ICAM-I en células HUVEC. (D) Porcentaje de positividad de ICAM-I en monocitos THP-1. Las concentraciones de 2, 4 y 8 µg/ml incrementaron el IMF de VCAM-I en células endoteliales (B y C) y monocitos (E y F) en contraste a la expresión basal de esta molécula (rojo).

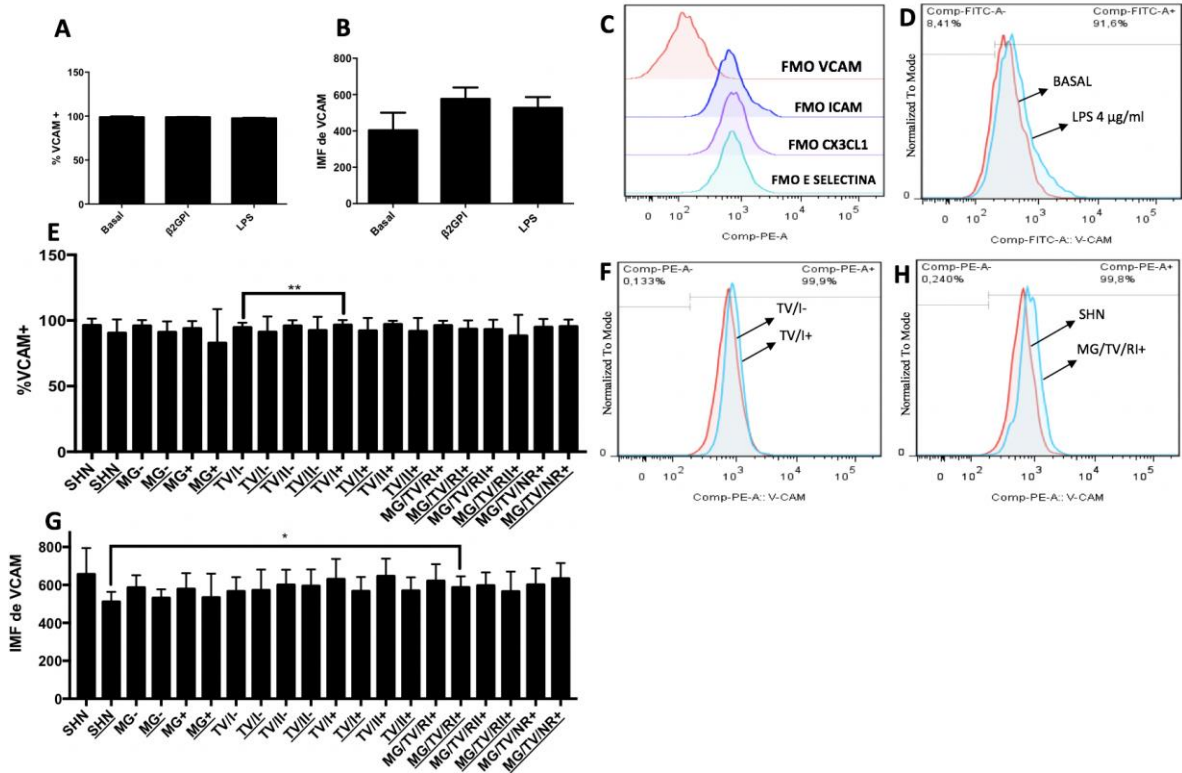


Figura 7. Expresión de VCAM-I en células HUVEC estimuladas con IgG de las pacientes del estudio.

(A, B y D) El LPS en una concentración de 4 μ g/ml se incluyó como control positivo en todos los ensayos e incrementó la expresión de VCAM-I en contraste con las células sin estímulo. (C) Histogramas representativos de la expresión de VCAM-I respecto a su FMO. (E y F) El porcentaje de positividad para VCAM-I aumentó en células estimuladas con las IgG de mujeres con TV/I+ en comparación con las TV/I- y la IMF de esta molécula incrementó después del cultivo con β 2GPI y las IgG de mujeres con MG/TV/NR+ en contraste con el control de SHN (G y H). Se realizó una ANOVA de una vía y un post-test de Tukey ($p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$). Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes. (E y G) Los datos obtenidos de las células endoteliales tratadas previamente con la β 2GPI y las IgG de las mujeres del estudio se indican en subrayado.

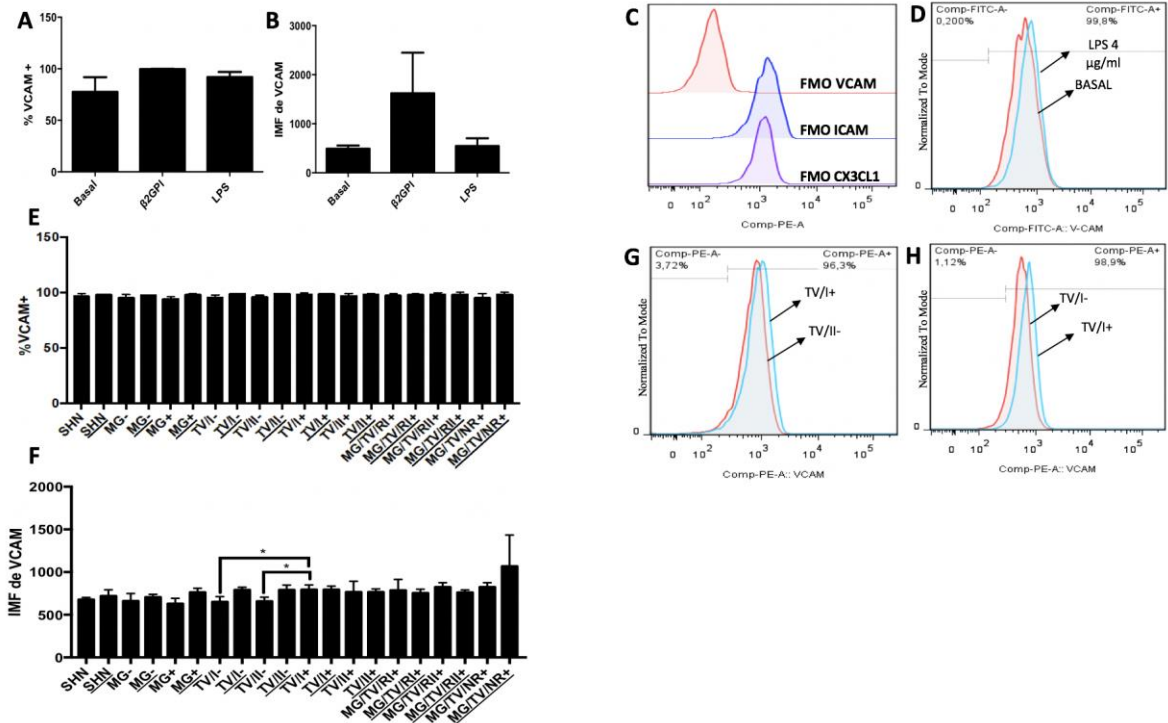


Figura 8. Expresión de VCAM-I en monocitos THP-1 estimulados con IgG.

(A, B y D) El LPS en una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ se incluyó como control positivo en todos los ensayos e incrementó la expresión de VCAM-I en contraste con las células sin estímulo. (C) Histogramas representativos de la expresión de VCAM-I respecto a su FMO. (E) El porcentaje de positividad para VCAM-I no mostró cambio posterior al tratamiento con las IgG de las mujeres del estudio. (F-H) La IMF de ICAM-I aumentó en células estimuladas con IgG de mujeres con TV/I+ en contraste con las IgG negativas para aAFL de mujeres con TV/I-, TV/II-. Se realizó una ANOVA de una vía y un post-test de Tukey ($p < 0.05^*$). Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes. (E y F) Los datos obtenidos de las células endoteliales tratadas previamente con la $\beta 2\text{GPI}$ y las IgG de las mujeres del estudio se indican en subrayado.

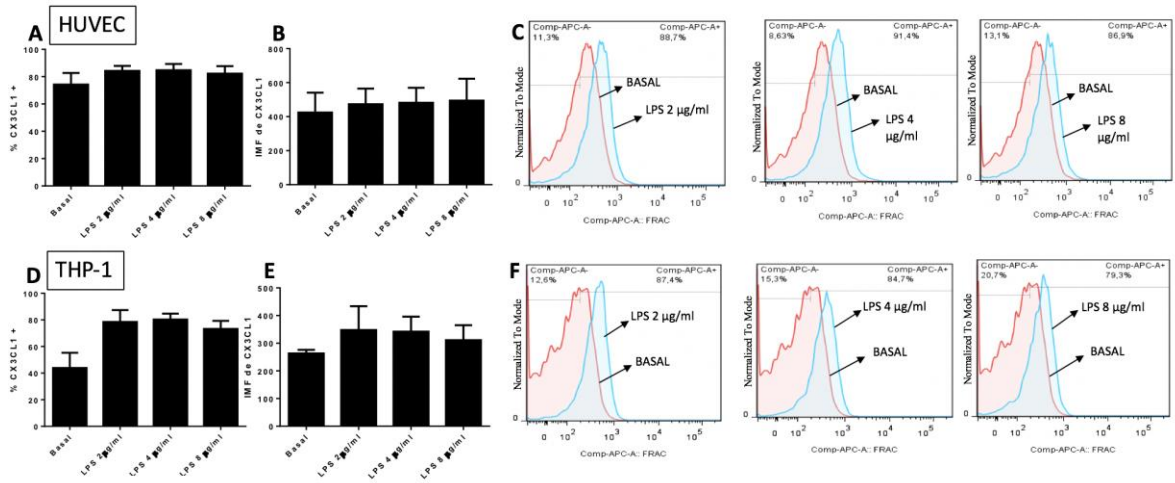


Figura 9. Expresión de CX3CL1 en células HUVEC y monocitos THP-1 estimulados con LPS.

(A-C) Las concentraciones de 2, 4 y 8 µg/ml aumentaron el porcentaje de positividad e IMF de CX3CL1 en células endoteliales. (D-F) En monocitos THP-1 la expresión de CX3CL1 incrementó con una concentración de 2, 4 y 8 µg/ml de LPS respecto a la expresión basal de esta molécula (rojo).

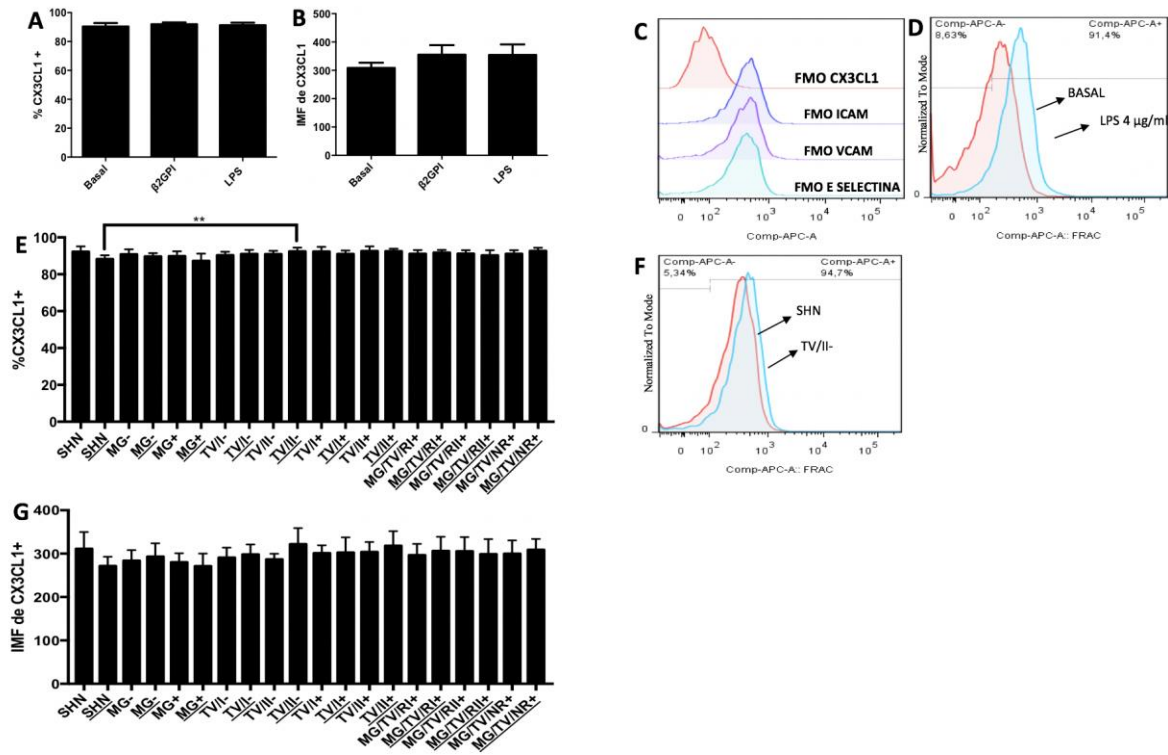


Figura 10. Expresión de CX3CL1 en células HUVEC estimuladas con IgG.

(A, B y D) El LPS en una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ se incluyó como control positivo en todos los ensayos e incrementó la expresión de CX3CL1 en contraste con las células sin estímulo. (C) Histogramas representativos de la expresión de CX3CL1 respecto a su FMO. (E y F) El porcentaje de positividad para CX3CL1 aumentó en células estimuladas con $\beta_2\text{GPI}$ e IgG de mujeres con TV/II- en contraste con el control de SHN. (G) Las IgG no presentaron efecto significativo. Se realizó una ANOVA de una vía y un post-test de Tukey ($p < 0.01^{**}$). Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes. (E y G) Los datos obtenidos de las células endoteliales tratadas previamente con la $\beta_2\text{GPI}$ y las IgG de las mujeres del estudio se indican en subrayado.

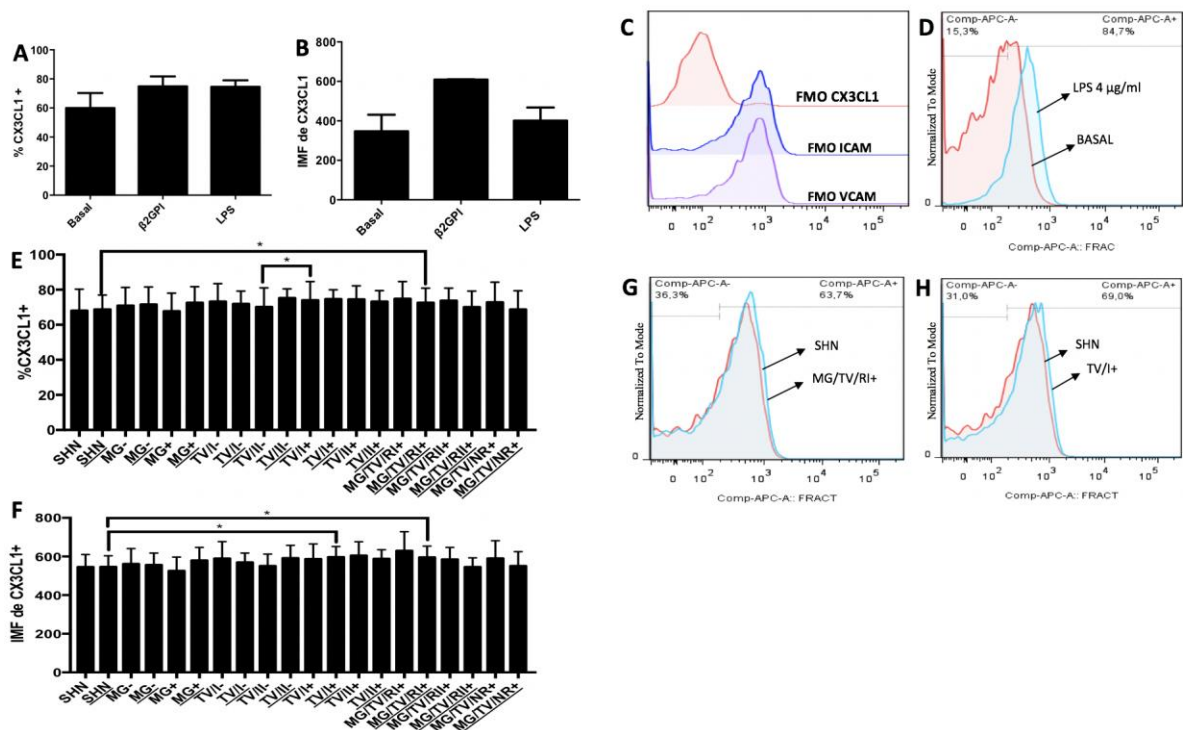


Figura 11. Expresión de CX3CL1 en células monocitos THP-1 estimulados con IgG.

(A, B y D) El LPS en una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ se incluyó como control positivo en todos los ensayos e incrementó la expresión de CX3CL1 en contraste con las células sin estímulo. (C) Histogramas representativos de la expresión de CX3CL1 respecto a su FMO. (E-H) El porcentaje de CX3CL1 fue potenciado por los anticuerpos de pacientes con MG/TV/RI+ más $\beta 2\text{GPI}$ y TV/I+ sin $\beta 2\text{GPI}$ comparado con SHN y TV/II- respectivamente. (F) En presencia de la $\beta 2\text{GPI}$ las IgG de mujeres con TV/I+ y MG/TV/RI+ incrementaron la IMF de la CX3CL1 en contraste con el control de SHN. Se realizó una ANOVA de una vía y un post-test de Tukey ($p < 0.05^*$). Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes. (E y F) Los datos obtenidos de las células endoteliales tratadas previamente con la $\beta 2\text{GPI}$ y las IgG de las mujeres del estudio se indican en subrayado.

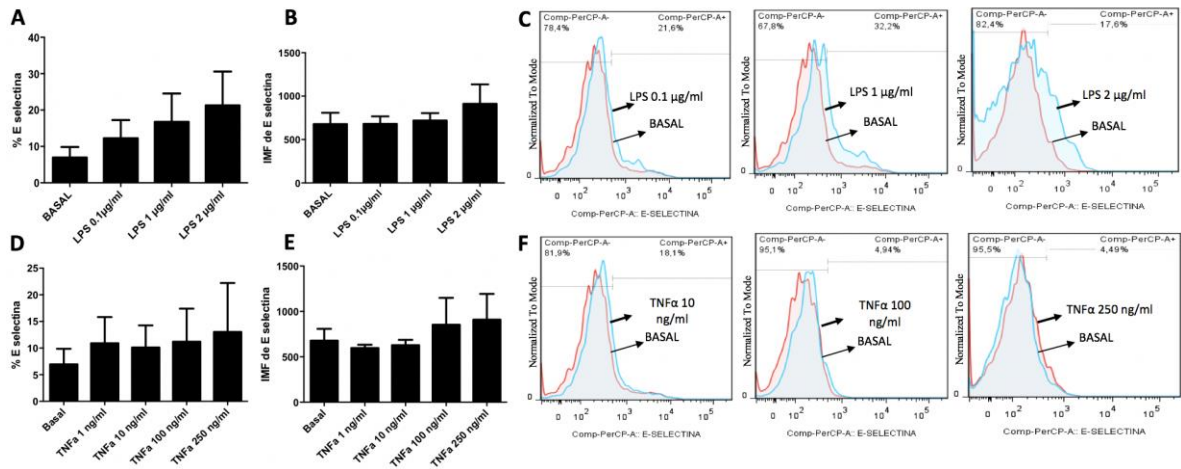


Figura 12. Expresión de E selectina en células HUVEC estimuladas con LPS.

(A-C) Las concentraciones de 0.1, 1 y 2 µg/ml de LPS incrementan el porcentaje e IMF de células positivas para E selectina. (D-F) Las concentraciones de 1, 10, 100 y 250 ng/ml de TNF-α incrementan el porcentaje y la IMF de E selectina con respecto a la expresión basal de esta molécula (rojo).

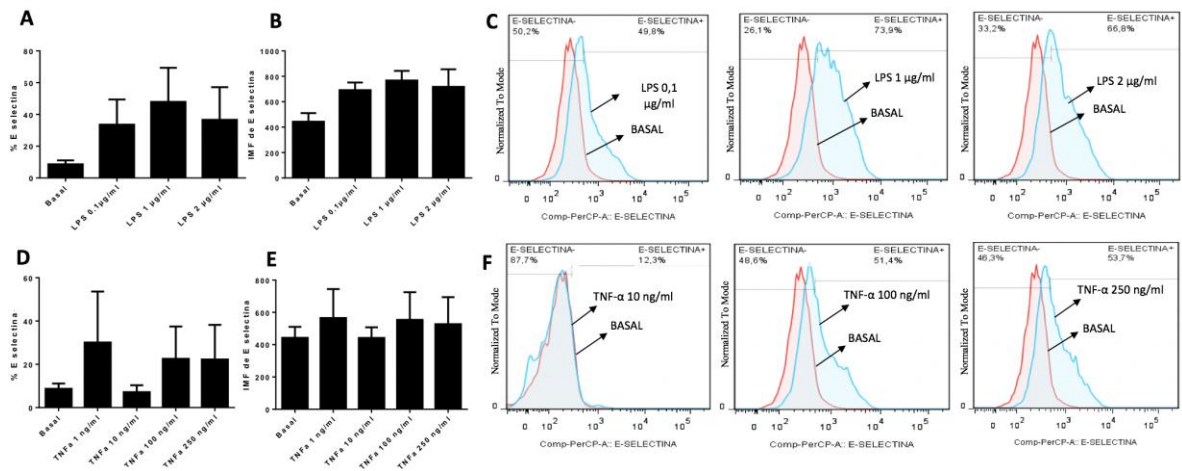


Figura 13. Expresión de E selectina en células THP-1 estimuladas con LPS.

(A-C) Las concentraciones de 0,1, 1 y 2 µg/ml de LPS incrementan el porcentaje e IMF de células positivas para E selectina. (D-F) Las concentraciones de 1, 10, 100 y 250 ng/ml de TNF-α incrementan el porcentaje y la IMF de E selectina con respecto a la expresión basal de esta molécula (rojo).

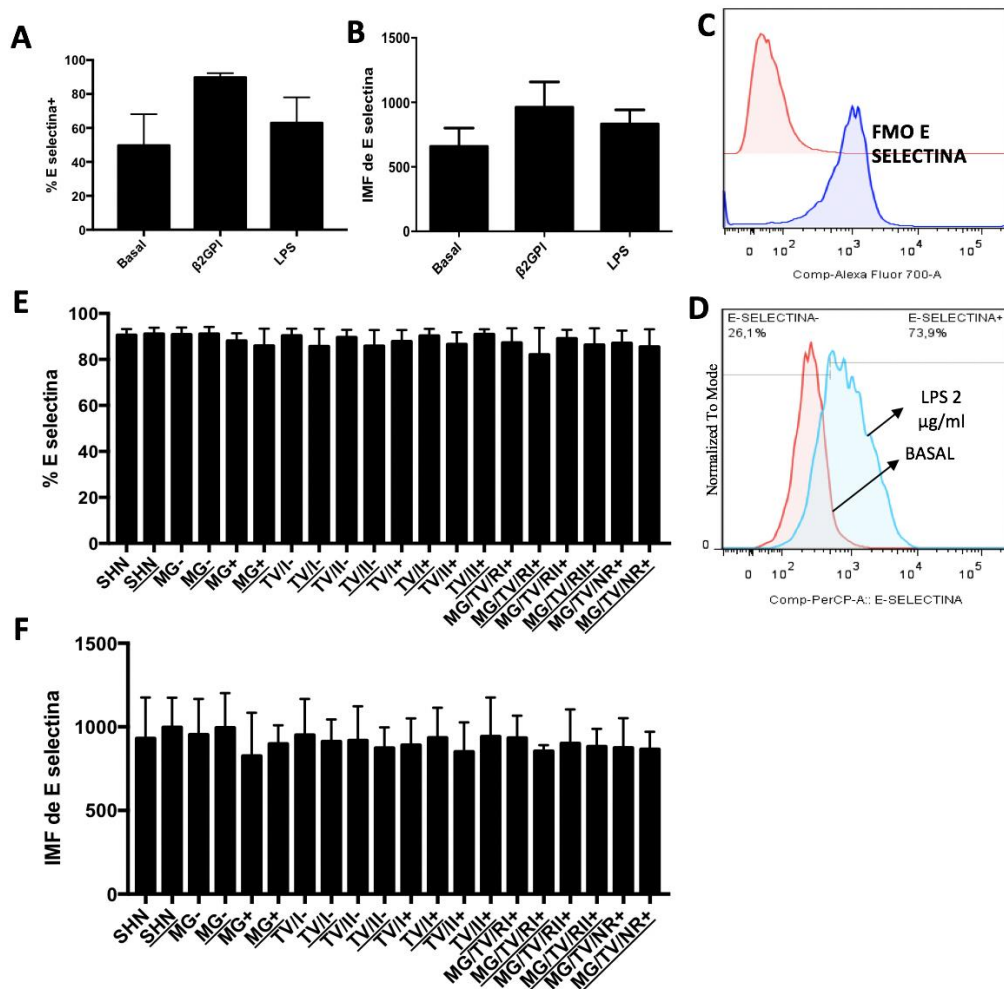


Figura 15. Expresión de E selectina en monocitos THP-1 estimulados con IgG.

(A, B y D) El LPS en una concentración de 2 µg/ml se incluyó como control positivo en todos los ensayos e incrementó la expresión de E selectina en contraste con las células sin estímulo. (C) Histogramas representativos de la expresión de E selectina respecto a su FMO. (E y F) Las IgG no presentaron efecto sobre la expresión de E selectina en monocitos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antioquia, por la formación académica durante toda la carrera, a mis profesores por brindarme un acompañamiento y una formación integral. A mis compañeros, amigos y familiares por todo el apoyo incondicional en estos casi 7 años de carrera. Al profesor Mauricio Rojas López por el acompañamiento y la formación en el área de inmunología básica afín con el tema de este proyecto.

Al grupo Reproducción por el apoyo económico y de infraestructura para la realización de mi trabajo de grado. Por último y más importante a la profesora Ángela Cadavid coordinadora del grupo Reproducción y quien a su vez fue mi co-asesora, por brindarme la oportunidad de desarrollar allí mi trabajo y el acompañamiento durante estos 2 años en los cuáles ejecuté este proyecto y a Manuela Velásquez Berrío amiga, profesora y asesora principal de este trabajo, por la confianza, el apoyo, asesoramiento desde el planteamiento y ejecución del proyecto, al análisis de los resultados y la revisión del manuscrito final.

REFERENCIAS

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). *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295-306.
2. Mackworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorder. *Annals of the rheumatic diseases.* 1989;48(5):362-7.
3. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2017;151 Suppl 1:S43-S7.
4. Lockshin MD. Antiphospholipid antibody syndrome. *Rheumatic diseases clinics of North America.* 1994;20(1):45-59.
5. Faden D, Tincani A, Tanzi P, Spatola L, Lojcono A, Tarantini M, et al. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in a general obstetric population: preliminary results on the prevalence and correlation with pregnancy outcome. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies are associated with some obstetrical complications, mainly preeclampsia-eclampsia. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology.* 1997;73(1):37-42.
6. Jaslow CR, Carney JL, Kutteh WH. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertility and sterility.* 2010;93(4):1234-43.
7. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *Bmj.* 2005;330(7491):565.
8. Xie H, Zhou H, Wang H, Chen D, Xia L, Wang T, et al. Anti-beta(2)GPI/beta(2)GPI induced TF and TNF-alpha expression in monocytes involving both TLR4/MyD88 and TLR4/TRIF signaling pathways. *Mol Immunol.* 2013;53(3):246-54.
9. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation.* 1999;99(15):1997-2002.
10. Cuadrado MJ, Lopez-Pedreira C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum.* 1997;40(5):834-41.
11. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(6):1306-16.

12. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
13. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70.
14. Audoy-Remus J, Richard JF, Soulet D, Zhou H, Kubes P, Vallieres L. Rod-Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2. *J Neurosci*. 2008;28(41):10187-99.
15. Dobado-Berrios PM, Lopez-Pedreira C, Velasco F, Cuadrado MJ. The role of tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 2001;44(11):2467-76.
16. Williams FM, Parmar K, Hughes GR, Hunt BJ. Systemic endothelial cell markers in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2000;84(5):742-6.
17. Cuadrado MJ, Buendia P, Velasco F, Aguirre MA, Barbarroja N, Torres LA, et al. Vascular endothelial growth factor expression in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2006;4(11):2461-9.
18. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Osterud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood*. 2008;111(3):1208-16.
19. Cho CS, Cho ML, Chen PP, Min SY, Hwang SY, Park KS, et al. Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J Immunol*. 2002;168(8):4209-15.
20. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5252-6.
21. Lopez-Pedreira C, Aguirre-Zamorano MA, Perez-Sanchez C. Mechanisms of atherosclerosis and cardiovascular disease in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *New therapeutic approaches*. *Med Clin (Barc)*. 2017;149(4):160-9.
22. Ioannou Y, Zhang JY, Qi M, Gao L, Qi JC, Yu DM, et al. Novel assays of thrombogenic pathogenicity in the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum*. 2011;63(9):2774-82.

23. McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, Pericleous C, Giles I, Ripoll V, et al. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: more than just APS. *Blood reviews*. 2019;100610.
24. Feletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells- Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*. San Rafael (CA)2011.
25. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol*. 2015;7(11):719-41.
26. Agar C, van Os GM, Morgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010;116(8):1336-43.
27. Alard JE, Gaillard F, Daridon C, Shoenfeld Y, Jamin C, Youinou P. TLR2 is one of the endothelial receptors for beta 2-glycoprotein I. *J Immunol*. 2010;185(3):1550-7.
28. Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, et al. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood*. 2003;101(9):3495-500.
29. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*. 2005;52(5):1545-54.
30. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2. *J Clin Invest*. 2011;121(1):120-31.
31. Velásquez M, Rojas M, Abrahams VM, Escudero C, Cadavid AP. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association With Clinical Manifestations. *Frontiers in physiology*. 2018;9.
32. Fillit H, Shibata S, Sasaki T, Spiera H, Kerr LD, Blake M. Autoantibodies to the protein core of vascular basement membrane heparan sulfate proteoglycan in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 1993;14(3):243-9.
33. Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Hall J, Harris EN, Pierangeli SS. E-Selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost*. 2003;1(4):843-8.
34. Simoncini S, Sapet C, Camoin-Jau L, Bardin N, Harle JR, Sampol J, et al. Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial

state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome. *Int Immunol.* 2005;17(4):489-500.

35. Zhou H, Sheng L, Wang H, Xie H, Mu Y, Wang T, et al. Anti-beta2GPI/beta2GPI stimulates activation of THP-1 cells through TLR4/MD-2/MyD88 and NF-kappaB signaling pathways. *Thromb Res.* 2013;132(6):742-9.

36. Sorice M, Longo A, Capozzi A, Garofalo T, Misasi R, Alessandri C, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum.* 2007;56(8):2687-97.

37. Clemens N, Frauenknecht K, Katzav A, Sommer C, von Landenberg P. In vitro effects of antiphospholipid syndrome-IgG fractions and human monoclonal antiphospholipid IgG antibody on human umbilical vein endothelial cells and monocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:805-13.

38. Zhou H, Wolberg AS, Roubey RA. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilazep. *Blood.* 2004;104(8):2353-8.

39. Hamid C, Norgate K, D'Cruz DP, Khamashta MA, Arno M, Pearson JD, et al. Anti-beta2GPI-antibody-induced endothelial cell gene expression profiling reveals induction of novel pro-inflammatory genes potentially involved in primary antiphospholipid syndrome. *Annals of the rheumatic diseases.* 2007;66(8):1000-7.

40. Kolyada A, Barrios DA, Beglova N. Dimerized Domain V of Beta2-Glycoprotein I Is Sufficient to Upregulate Procoagulant Activity in PMA-Treated U937 Monocytes and Require Intact Residues in Two Phospholipid-Binding Loops. *Antibodies (Basel).* 2017;6(2).

41. Virachith S, Saito M, Watanabe Y, Inoue K, Hoshi O, Kubota T. Anti-beta2 - glycoprotein I antibody with DNA binding activity enters living monocytes via cell surface DNA and induces tissue factor expression. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(2):167-78.

42. Xia L, Zhou H, Wang T, Xie Y, Wang T, Wang X, et al. Activation of mTOR is involved in anti-beta2GPI/beta2GPI-induced expression of tissue factor and IL-8 in monocytes. *Thromb Res.* 2017;157:103-10.

43. Lopez-Pedraza C, Buendia P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-

kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):301-11.

44. 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).

45. 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.

46. 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.

47. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med.* 2007;27(3):469-85, v.

48. Xia L, Xie H, Yu Y, Zhou H, Wang T, Yan J. The Effects of NF-kappaB and c-Jun/AP-1 on the Expression of Prothrombotic and Proinflammatory Molecules Induced by Anti-beta2GPI in Mouse. *PLoS One.* 2016;11(2):e0147958.

49. Meroni PL, Borghi MO, Grossi C, Chighizola CB, Durigutto P, Tedesco F. Obstetric and vascular antiphospholipid syndrome: same antibodies but different diseases? *Nature reviews Rheumatology.* 2018;14(7):433-40.

50. Bouvier S, Cochery-Nouvellon E, Lavigne-Lissalde G, Mercier E, Marchetti T, Balducchi JP, et al. Comparative incidence of pregnancy outcomes in treated obstetric antiphospholipid syndrome: the NOH-APS observational study. *Blood.* 2014;123(3):404-13.

51. Scoble T, Wijetilleka S, Khamashta MA. Management of refractory anti-phospholipid syndrome. *Autoimmunity reviews.* 2011;10(11):669-73.

52. Borghi MO, Raschi E, Grossi C, Chighizola CB, Meroni PL. Toll-like receptor 4 and beta2 glycoprotein I interaction on endothelial cells. *Lupus.* 2014;23(12):1302-4.

53. Kalogeris TJ, Kevil CG, Laroux FS, Coe LL, Phifer TJ, Alexander JS. Differential monocyte adhesion and adhesion molecule expression in venous and arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1999;276(1):L9-L19.

54. Engel B, Muller G, Roch B, Schroder HE, Aringer M, Bornstein SR, et al. Serum of patients with antiphospholipid syndrome induces adhesion molecules in endothelial cells. *Atheroscler Suppl.* 2017;30:141-8.

55. Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2019;14(3):e0212614.
56. Vega-Ostertag ME, Ferrara DE, Romay-Penabad Z, Liu X, Taylor WR, Colden-Stanfield M, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost*. 2007;5(9):1828-34.
57. Cook DN, Chen SC, Sullivan LM, Manfra DJ, Wiekowski MT, Prosser DM, et al. Generation and analysis of mice lacking the chemokine fractalkine. *Mol Cell Biol*. 2001;21(9):3159-65.
58. Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Krawczyk M, Szukiewicz D, Gasik R, Kubaszewski L, et al. Analysis of the Role of CX3CL1 (Fractalkine) and Its Receptor CX3CR1 in Traumatic Brain and Spinal Cord Injury: Insight into Recent Advances in Actions of Neurochemokine Agents. *Mol Neurobiol*. 2017;54(3):2167-88.
59. Paolicelli RC, Bisht K, Tremblay ME. Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:129.
60. Kubota T, Fukuya Y, Hashimoto R, Kanda T, Suzuki H, Okamura Y, et al. Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173:137-45.
61. Noble KE, Panayiotidis P, Collins PW, Hoffbrand AV, Yong KL. Monocytes induce E-selectin gene expression in endothelial cells: role of CD11/CD18 and extracellular matrix proteins. *Eur J Immunol*. 1996;26(12):2944-51.
62. Hauselmann I, Roblek M, Protsyuk D, Huck V, Knopfova L, Grassle S, et al. Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade. *Cancer Res*. 2016;76(18):5302-12.
63. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani A, Balestrieri G, Molteni R, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2870-8.