

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Velásquez M, Granada MA, Galvis JC, Álvarez AM, Cadavid AP. Estrés oxidativo en células endoteliales inducido por el suero de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido. *Biomédica*. 2019;39(4).

Recibido: 03-09-18

Aceptado: 29-03-19

Publicación en línea: 04-04-19

Estrés oxidativo en células endoteliales inducido por el suero de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido

Oxidative stress in endothelial cells induced by the serum of women with different clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome

Síndrome antifosfolípido y estrés oxidativo en células endoteliales

Manuela Velásquez ¹, Manuel Alejandro Granada ¹, Julián Camilo Galvis ¹, Ángela María Álvarez ¹, Ángela P. Cadavid ^{1,2}

¹ Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Estudio Trombosis, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Correspondencia:

Ángela P. Cadavid, Grupo Reproducción, Universidad de Antioquia, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, carrera 53 # 61-30, Medellín, Colombia.

Teléfono: (574) 2196476

angela.cadavid@udea.edu.co

Contribución de los autores:

Manuela Velásquez: desarrollo y revisión de ensayos de laboratorio; búsqueda, clasificación y revisión de información; procesamiento y análisis de datos; y evaluación de la calidad metodológica.

Manuel Alejandro Granada: toma de muestras, desarrollo de ensayos de laboratorio; búsqueda, clasificación y revisión de información; y procesamiento, análisis de datos.

Julián Camilo Galvis: estandarización de ensayos de laboratorio.

Ángela María Álvarez: análisis de información.

Ángela P. Cadavid: consecución de cordones umbilicales, captación de pacientes, revisión de los ensayos de laboratorio, revisión de información y evaluación de la calidad metodológica.

Todos los autores participaron en la escritura del artículo.

Introducción. El síndrome antifosfolípido se caracteriza por la presencia persistente de anticuerpos antifosfolípidos y manifestaciones clínicas de trombosis o morbilidad gestacional las cuales se asocian con estrés oxidativo y disfunción endotelial.

Objetivo. Evaluar marcadores de estrés oxidativo en células endoteliales inducidos por el suero de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido y analizar la capacidad antioxidante de los sueros.

Materiales y métodos. Se incluyeron 48 mujeres que fueron clasificadas así: presencia de anticuerpos antifosfolípidos y criterios clínicos de morbilidad gestacional sola, trombosis vascular únicamente, y morbilidad gestacional/trombosis vascular. Como grupos control se incluyeron mujeres negativas para anticuerpos antifosfolípidos. En un modelo *in vitro* de células endoteliales estimuladas con los sueros de las mujeres del estudio, se determinaron algunos marcadores de estrés oxidativo por citometría de flujo. También se analizó la capacidad antioxidante de los sueros incluidos.

Resultados. Los sueros de los grupos de mujeres con síndrome antifosfolípido que presentaban trombosis, con o sin morbilidad gestacional, generaron un incremento significativo ($p < 0.05$ * y $p < 0.001$ ***) en los marcadores de estrés oxidativo endotelial en contraste con el control de suero humano normal. No se observaron diferencias en el efecto de los sueros de los diferentes grupos de estudio sobre la lipoperoxidación endotelial. Tampoco se encontró diferencia en la actividad antioxidante de los sueros.

Conclusión. El estrés oxidativo mitocondrial en el endotelio se asocia con la presencia de trombosis. Sin embargo, cuando ésta se asocia con morbilidad gestacional, también se genera estrés oxidativo intracelular.

Palabras clave: síndrome antifosfolípido; estrés oxidativo; morbilidad; embarazo; trombosis; antioxidantes.

Introduction: The antiphospholipid syndrome is characterized by the persistent presence of antiphospholipid antibodies and clinical manifestations of thrombosis or gestational morbidity that are associated with oxidative stress and endothelial dysfunction.

Objective: To evaluate markers of oxidative stress in endothelial cells induced by the serum from women with different clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome, and to analyze the antioxidant capacity of the sera.

Materials and methods: We included 48 women who were classified as follows: presence of antiphospholipid antibodies and clinical criteria of gestational morbidity alone, vascular thrombosis only, and gestational morbidity / vascular thrombosis. Control groups included antiphospholipid antibodies negative women. In an *in vitro* model of endothelial cells stimulated with sera from women included in the groups, some markers of oxidative stress were determined by flow cytometry. The antioxidant capacity in the sera of these women was analyzed.

Results: The sera from the groups of women with antiphospholipid syndrome that presented thrombosis, with or without gestational morbidity, generated a significant increase ($p < 0.05$ * and $p < 0.001$ ***) in endothelial oxidative stress markers in contrast to the control of normal human serum. There were no differences in the effect of the sera from the different study groups on endothelial lipid peroxidation. Also, there was also no difference in the antioxidant activity of the sera.

Conclusion: Mitochondrial oxidative stress in the endothelium is associated with the presence of thrombosis; instead, its association with gestational morbidity generates intracellular oxidative stress.

Keywords: Antiphospholipid syndrome; oxidative stress; morbidity; pregnancy; thrombosis; antioxidants.

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por manifestaciones clínicas de trombosis o morbilidad gestacional y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aAFL) (1). Los aAFL se consideran como los responsables de entre el 10 y el 25 % de los casos de aborto recurrente y a su vez, la prevalencia de éstos en mujeres con diagnóstico de morbilidad gestacional es del 5 al 50% (2). Según un estudio reciente en el cual se hizo un seguimiento a 1000 pacientes con SAF en un periodo de 10 años, las complicaciones obstétricas más frecuentes en mujeres con SAF son las pérdidas gestacionales tempranas, la restricción del crecimiento intrauterino y los partos prematuros (3).

Actualmente, se conoce que los aAFL actúan a través de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie de diferentes células, el cual podría inducir la activación de diferentes vías de señalización, factores de transcripción, expresión de moléculas de adhesión y expresión de proteínas pro-coagulantes. Estos eventos en conjunto llevan a un estado trombogénico y proinflamatorio, como se ha demostrado en ensayos *in vitro* utilizando células endoteliales, monocitos y plaquetas (4-6). También se ha demostrado que los aAFL inducen efectos en las células trofoblásticas, alterando en consecuencia el desarrollo placentario. En nuestro grupo se ha estudiado el efecto directo que tienen los aAFL de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del SAF sobre las células trofoblásticas, las células endoteliales y la interacción trofoblasto-endotelio (7,8).

El óxido nítrico (ON) es una molécula conocida por su potente actividad anti-trombótica y anti-aterogénica; su disminución, y el estrés oxidativo están relacionados con la patogénesis del SAF (9). Se conoce que los aAFL promueven una perturbación oxidativa y una disfunción mitocondrial, las cuales induce la activación de una cascada de señalización inflamatoria (10). Lo anterior se debe a la capacidad que tienen los aAFL de mediar la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), lo cual podría explicar estos mecanismos patológicos involucrados en el desarrollo del síndrome. Estas moléculas actúan como potentes activadores de vías de señalización incluidas en los eventos proinflamatorios que inducen la expresión de la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), y la producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina (IL) 6 y la IL-1 β (11-13). Estos eventos sumados a la producción de quimiocinas y de mediadores de disfunción endotelial que inducen los aAFL, dan cuenta de la disfunción endotelial observada en estos pacientes (10). Las ERO incluyen formas parcialmente reducidas de oxígeno molecular tales como el radical hidroxilo (OH), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los peróxidos lipídicos y el ácido hipocloroso (HClO). En condiciones fisiológicas, las células se protegen del daño producido por las ERO a través de mecanismos antioxidantes. El desbalance entre los oxidantes y los antioxidantes, lleva al estrés oxidativo que contribuye a la disfunción endotelial (14,15). Adicionalmente, el estrés oxidativo ha sido asociado con la inducción de inmunogenicidad en los antígenos fosfolipídicos característicos del SAF (16-18).

La importancia de entender los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo del síndrome, radica en que su comprensión permitirá optimizar el abordaje terapéutico que debe ser implementado en este tipo de pacientes. Por lo tanto, estudiar el rol del estrés oxidativo como uno de los mecanismos de daño en las células endoteliales, permite aportar al conocimiento actual de la patogénesis del SAF.

En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar marcadores de estrés oxidativo en células endoteliales inducidos por el suero de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del SAF y analizar la capacidad antioxidante en los sueros de estas mujeres.

Materiales y métodos

Población de estudio

Para incluir a las pacientes con SAF en este estudio se tuvieron en cuenta los criterios internacionales de clasificación revisados de Sapporo que requieren: la presencia de títulos moderados o altos de anticuerpos IgG o IgM anti- cardiolipina (aCL) o anti-beta 2 glicoproteína I (β_2 GPI) o pruebas positivas para el anticoagulante lúpico (AL), persistentes en un intervalo de 12 semanas (1). Como criterios clínicos se incluye trombosis en cualquier territorio vascular y/o morbilidad gestacional, 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). Las

pacientes con SAF y otras enfermedades crónicas diferentes a la autoinmunidad fueron excluidas del estudio. Se incluyeron 48 mujeres que fueron clasificadas en los siguientes grupos así: presencia de aAFL y criterios clínicos de morbilidad gestacional sola (MG/aAFL+, n=10), trombosis vascular únicamente (TV/ aAFL+, n=4), y morbilidad gestacional/trombosis vascular (MG/TV/aAFL+, n=10). Como grupos control se incluyeron mujeres sanas, negativas para aAFL, y que tuvieran embarazos previos sin complicaciones (SHN, n=10); morbilidad gestacional (MG/aAFL-, n=10) y trombosis vascular (TV/ aAFL-, n=4). Las pacientes fueron captadas en la consulta médica del programa “Aborto Recurrente” del Grupo Reproducción Facultad de Medicina, de la Universidad de Antioquia y en la Clínica de Anticoagulación del Hospital San Vicente Fundación. Las mujeres sanas se contactaron entre el personal cercano al grupo de investigación.

Consideraciones éticas

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 Universidad de Antioquia, siguiendo las normas establecidas en la declaración de Helsinki, octubre 3 de 2000 y las normas del Ministerio de la Protección Social de Colombia, resolución 8430 de 1993 en la cual 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.

Obtención de muestras

Mediante venopunción en el antebrazo se recolectó sangre periférica en tubos secos libres de anticoagulante (Fenwal, USA) de cada una de las mujeres. La muestra se centrifugó a 460 g por 15 minutos para separar el suero y se almacenó

a -80°C, hasta su uso. Debido a la heterogeneidad de los aAFL, se elaboró un "pool" con los sueros de cada grupo de estudio.

En los sueros de los grupos de estudio se evaluó la presencia de anticuerpos IgG aCL por el estuche comercial Aeskulisa Cardiolipin-GM (Aesku Diagnostics, Germany), y de anticuerpos IgG anti- β_2 glicoproteína I por el estuche Aeskulisa β_2 -Glyco-GM (Aesku Diagnostics). En el plasma de las mismas mujeres se determinó la positividad del anticoagulante lúpico por el tiempo parcial de tromboplastina activado usando el estuche comercial APTT-SP (Instrumentation Laboratory Bedford, USA), y la determinación del tiempo de víbora de Russell con el estuche comercial LAC SCREEN para el tamizaje y el LAC CONFIRM para el confirmatorio (Rochem Biocare, Colombia).

También se evaluó la positividad de los anticuerpos IgG aCL y de otros aAFL "no-criterio" utilizando un ELISA estandarizado en el laboratorio a partir de la técnica publicada por Kwak y col (19). En microplatos de poliestireno de 96 pozos fondo en U Maxisorp Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, USA) fueron cubiertos con 30 μ l de una suspensión de 50 μ g/ml en etanol de cardiolipina (Sigma-Aldrich, USA) o 50 μ g/ml en metanol de los otros cinco fosfolípidos: fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, anti-fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (Sigma-Aldrich). Los platos se dejaron secar a 4°C durante 18 horas, luego se lavaron con PBS 1X y se bloquearon con una solución de PBS y suero bovino adulto (SBA) al 20% (Gibco, USA) 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 de 1:50 en SBA-20%, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y después se

lavaron tres veces con PBS. Se agregaron 50 ul del segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen, USA) a una dilución 1:1000 en SBA-20%, se incubaron por 90 minutos y se lavaron como se indicó anteriormente. Se agregaron 50 ul de la solución reveladora de paranitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich) a 1mg/ml en solución sustrato (dietanolamina 10%, MgCl₂ 0,005% y azida de sodio 0,02%, pH 9,8). La reacción se paró con 50 ul de una solución 3M de NaOH. La densidad óptica (DO) de cada pozo fue determinada usando un lector de microplatos de Elisa (Multiskan FC Thermo Scientific, USA) 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, colocando cada uno de los sueros en un pozo sin antígeno cuyo valor se resta del promedio de las DO de las muestras. Se consideraron positivos los valores de DO igual o mayor al 25% de la DO del control positivo.

Para clasificar a las mujeres como positivas para cualquiera de los anticuerpos antifosfolípidos, éstas debían ser positivas en dos ocasiones, con un intervalo mínimo de 12 semanas.

Cultivo de células endoteliales

Las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron aisladas a partir de cordones umbilicales de mujeres con un embarazo normal como se describió previamente (8). Brevemente, se perfundió la vena umbilical con una aguja pericraneal para adicionar colagenasa tipo I (Invitrogen) y se incubó a 37°C por 20 minutos. El contenido de la vena umbilical se centrifugó a 300g por

5 minutos a 22°C. El botón de células se cultivó en frascos de 75 cm² con filtro marca Nunc™ (Thermo Fisher Scientific) con medio de cultivo basal de células endoteliales suplementado (Promocell, Germany) con 2% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco). Finalmente se realizó una remoción de detritos para optimizar el cultivo. Las células endoteliales se utilizaron en los pases 1 y 2. En platos de 24 pozos, se adicionaron 5 x10⁵ células HUVEC por pozo y se estimularon por 24 horas con 10% de suero de los grupos de mujeres del estudio para determinar su efecto sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) intracelulares, anión superóxido mitocondrial y lipoperoxidación de membrana por citometría de flujo. Las células se desprendieron con 0,025% de tripsina (Sigma-Aldrich) la cual fue inactivada con Opti-MEM (Gibco) al 10% SBF. Todas las lecturas se realizaron en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson, USA). Se adquirieron diez mil eventos en cada una de las lecturas realizadas.

Determinación de la pureza de las células endoteliales

A los 4 días de cultivo se evaluó la pureza de las células endoteliales mediante la detección de la expresión de la molécula de adhesión CD31 o PECAM-1 (molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1). La molécula CD31 es útil para evaluar la pureza de las células endoteliales debido a que es una glicoproteína característica de estas células, que proporciona estabilidad a la monocapa y adhesión intercelular, por lo cual ha sido empleada como herramienta para detectar o aislar células endoteliales (12,13). La expresión de la molécula CD31 se evaluó por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia. Para ambas técnicas las células se marcaron con CD31 conjugado con FITC (Thermo Fisher Scientific), adicionado a las células en una dilución de 1:100 de PBS, incubado por

40 minutos y los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (IP) (Thermo Fisher Scientific). La citometría se realizó como se describió anteriormente en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton Dickinson), y para la microscopía de fluorescencia las células fueron permeabilizadas utilizando Cytotfix™ y el buffer Perm/Wash™ (Biosciences BD, USA) y la auto fluorescencia fue bloqueada utilizando 50 mM de cloruro de amonio. Finalmente la monocapa de células fue visualizada en un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss Microscopy, Germany) con el filtro GFP con una excitación BP 475/40 y una emisión BP 530/50 y el filtro RFP con una excitación BP de 572/25 y una emisión BP 629/62. El microscopio estaba adaptado con una cámara DS-fi1 (Nikon Corporation, Japón) utilizando el aumento de 20X.

Detección de especies reactivas del oxígeno

La detección de ERO intracelulares como el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno se realizó con el compuesto diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich). El DCFH-DA es desacetilado por las esterasas celulares a DCFH que no es fluorescente, pero cuando interactúa con las ERO, se transforma en el compuesto fluorescente DCF. Las células se lavaron por centrifugación a 580g por 5 minutos con 600 µl de PBS (Amresco, USA) y se les adicionó 0,05 µM DCFH-DA y 0.5 µM yoduro de propidio (IP), (Thermo Fisher Scientific). Como control positivo para detectar la presencia de las ERO intracelulares las HUVEC fueron estimuladas con peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0,5 y 1 mM. Se realizó la lectura en el citómetro como se indicó anteriormente.

Producción de anión superóxido

El anión superóxido se acumula en el interior de la mitocondria como resultado del metabolismo celular de la cadena transportadora de electrones y presenta un fuerte potencial negativo que permite su interacción con el compuesto lipofílico de carga positiva trifenilfosfonio, disponible de manera comercial como MitoSOX (Invitrogen) (20). La sonda MitoSOX se adicionó a las células endoteliales en una concentración de 0,02 μM . Para evaluar la viabilidad de las células productoras de anión superóxido se usó la sonda eFluor (Thermo Fisher Scientific) en una concentración de 0,1 μM . Se realizó la lectura en el citómetro.

Evaluación de lipoperoxidación

El BODIPY C11 (Life Technology, USA) es una molécula lipofílica que posee un grupo 4-fenil-1,3-butadienilo unido a un pirrol, el butadienilo es susceptible a oxidación por lípidos oxidados dando como resultado un desplazamiento del pico de emisión de fluorescencia de ~ 590 nm a ~ 510 nm (21,22). El BODIPY C11 se adicionó a las células en una concentración de 0,825 μM en 1200 μl de PBS (Amresco). Se realizó la lectura en el citómetro.

Cuantificación de actividad antioxidante en los sueros de las pacientes

La enzima paraoxonasa-1 (PON1) es una arilesterasa, organofosfatasa, que se encuentra localizada en la superficie de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y tiene la capacidad de disminuir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), además participa en la prevención y balance del estrés oxidativo (23).

La actividad de la PON-1 se evaluó usando el estuche comercial EnzCheck de ensayo fluorométrico de paraoxonasa (Invitrogen). El ensayo presenta un límite de detección de aproximadamente 50 mU/ml y es 10 veces más sensible que los

métodos clásicos colorimétricos (24). La intensidad de la luz emitida se determinó usando el Varioskan Flash multimode reader (Thermo Fisher Scientific) en los filtros de 360 y 450 nm para la excitación y emisión respectivamente, cada 15 minutos por 1 hora a 37°C. La actividad enzimática se calculó restando la fluorescencia de los controles negativos a las muestras y se utilizó la ecuación de la curva estándar para determinar la cantidad de producto fluorescente de cada muestra. Finalmente la cantidad del producto fluorescente formado se transformó en unidades de paraoxonasa, donde cada 1 unidad (U) de paraoxonasa genera 1 nmol de producto fluorescente por minuto a 37 °C.

La capacidad antioxidante total también se evaluó con el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich) que dona un hidrógeno a los antioxidantes presentes (25). El DPPH se mezcló con metanol obteniendo una solución 0,1 mM y se almacenó en la oscuridad a –80°C. A los suero se les eliminó las proteínas como se ha descrito previamente (26) y se almacenaron a – 80°C, hasta su uso. A las muestras se les adicionó el DPPH y se agitaron en un vórtex, posteriormente se incubaron en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. La absorbancia se detectó a 515 nm por espectrofotometría en el lector de barrido espectral Varioskan Flash. El porcentaje de capacidad antioxidante total (% CAT) fue proporcional a la disminución de la absorbancia del DPPH por las muestras.

Análisis estadístico

Los resultados de citometría fueron analizados en el programa FlowJo® (TreeStar, Inc. USA); los valores se indican como intensidad mediana de fluorescencia (IMF) y fueron normalizados con respecto al control de SHN. Sobre los datos obtenidos se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y según su distribución se

determinó la significancia estadística ($p < 0,05$) con una ANOVA de una vía y un post-test de Holm-Sidak o una prueba de Kruskal- Wallis y un post-test de Dunns. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa *GrandPad Prism 6® Graph Pad Prism 6®* (Graph Pad Software, Inc. USA).

Resultados

El grupo de mujeres con MG/TV/aAFL+ presentó positividad para todas las pruebas de laboratorio incluidas en los criterios de Sapporo (1). En el grupo de mujeres con MG/aAFL+ se detectaron anticuerpos aCL persistentes por el ELISA estandarizado en el laboratorio, pero no por los estuches comerciales. A pesar de esto, se decidió incluir a estas pacientes en el estudio ya que también presentaban positividad para otros anticuerpos no-criterio dirigidos a fosfolípidos cargados negativamente evaluados también por un ELISA estandarizado en el laboratorio. La inclusión de estos anticuerpos como criterios de clasificación, aún se encuentra en discusión (27). En trabajos previos de nuestro grupo de investigación hemos encontrado efecto de los sueros de este grupo de pacientes sobre diferentes funciones de las células trofoblásticas (7,8,28). El grupo de mujeres con MG/aAFL- y el grupo control de mujeres sanas SHN, fueron negativas para todas las pruebas de laboratorio de aAFL (cuadro 1).

Cultivo de células HUVEC

En este estudio, las células HUVEC fueron obtenidas a partir de cordones umbilicales provenientes del parto de mujeres con un embarazo normal como se describió previamente. Posterior al aislamiento, después de 4 días de cultivo aproximadamente, se evaluó la pureza de las células endoteliales mediante la

detección de la expresión de CD31. En imágenes representativas de tres cordones umbilicales se puede observar que la expresión de CD31 en las células provenientes de diferentes mujeres se mantuvo estable en más del 99% de las células (figura 1A). Por microscopía de fluorescencia también se encontró positividad de CD31 en los cultivos de células HUVEC purificados para los ensayos posteriores (figura 1B).

Efecto de los sueros de los grupos de estudio sobre la viabilidad celular

En todos los ensayos de estrés oxidativo se incluyó IP o e-Fluor para excluir las células muertas de los análisis de detección de producción de ERO intracelular, anión superóxido y peroxidación lipídica. Se observó que los sueros de los grupos de mujeres del estudio no afectaron la viabilidad celular (figura 2).

Producción de ERO intracelular

En las células estimuladas con el suero de los diferentes grupos de pacientes se encontró que específicamente el suero del grupo de mujeres con MG/TV/aAFL+ provoca un aumento significativo ($p=0.044$) en la concentración de ERO intracelular en comparación con el suero del grupo control (Figura 3A y B). El control implementado de peróxido de hidrógeno incrementó la intensidad mediana de fluorescencia (IMF) del DCFH-DA en las células endoteliales en contraste con las células cultivadas con Opti-MEM (Gibco), lo que indica que este sistema logra detectar el aumento de ERO intracelular en contraste con la producción basal (figura 3B y C).

Detección de anión superóxido y peroxidación lipídica

El suero de mujeres con MG/TV/aAFL y + TV/aAFL+ indujo un incremento significativo en la IMF del MitoSOX en comparación con el control de SHN

($p=0,011$ y $p=0,0007$ respectivamente) (figura 4 B-D). El control positivo de peróxido de hidrógeno provocó un aumento en la IMF del MitoSOX en contraste con la producción basal de anión superóxido (figura 4A). No se observó diferencia en la inducción de lipoperoxidación de las membranas de las células endoteliales entre los diferentes grupos de estudio (figura 5 A y B).

Capacidad antioxidante en los sueros de los pacientes

No se encontró diferencia en la actividad basal de la enzima PON-1 y en el % de CAT de los sueros de los diferentes grupos de estudio comparados con el grupo SHN (figura 6 y 7).

Discusión

Se ha descrito que en la inmunopatogénesis del SAF obstétrico, el daño placentario puede darse a través de la activación del sistema de complemento inducida por los aAFL en neutrófilos, los cuales en consecuencia producen ERO, que actúan sobre células endoteliales causando daño y activación lo que favorece la pérdida fetal (29,30). En el SAF la producción de ERO también provoca disfunción endotelial que es determinante para desencadenar los eventos trombóticos, provocando un estado pro-adhesivo y la activación de vías de señalización que involucran a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAKP) p38, que a su vez controla la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, favoreciendo el estado inflamatorio por la adhesión de monocitos al endotelio (12). En este trabajo se evaluó el efecto directo del suero de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas del SAF sobre células endoteliales, que contribuye al entendimiento del mecanismo patológico de los aAFL asociado a las características de las pacientes. En contraste, trabajos reportados previamente por

otros autores han evidenciado un incremento de ERO inducida por los aAFL, pero no es clara su asociación con las manifestaciones clínicas del SAF (12). En el presente trabajo se encontró que el suero de ambos grupos de pacientes con trombosis, con o sin morbilidad gestacional (TV/aAFL+ y MG/TV/aAFL+), induce un incremento del anión superóxido mitocondrial; sin embargo el suero del grupo de mujeres con MG/TV/aAFL+ también provoca la producción de ERO intracelular. En la gestación la producción de ERO es requerida para el desarrollo placentario porque puede regular la activación de factores de transcripción involucrados en la proliferación, invasión trofoblástica y angiogénesis (31). Las ERO también regulan la autofagia y la apoptosis, necesarias para la homeóstasis placentaria (31), sin embargo en contextos patológicos un desbalance en la producción de ERO puede ser la causa de una placentación defectuosa que en consecuencia genera morbilidad gestacional. En reportes recientes se ha planteado que en los diferentes grupos de pacientes con SAF, positivas para los mismos aAFL, generan la manifestación clínica de trombosis y/o morbilidad gestacional, de manera dependiente a los niveles de los aAFL (32). En nuestro trabajo específicamente el grupo de mujeres con MG/TV/aAFL+ presentó mayores niveles de anti- β_2 GPI, aCL (cuadro 1) y más inducción de estrés oxidativo, lo que indica que altos títulos de aAFL y la presencia de ambas manifestaciones clínicas desencadenan efectos deletéreos superiores sobre el endotelio.

Ha sido demostrado que la generación de anión superóxido incrementa la activación de los receptores tipo Toll 7 y 8 (TLR-7 y 8) que a su vez provocan un aumento en la producción de citocinas inflamatorias (33). En adición a lo anterior, estos mismos autores evidenciaron en monocitos deficientes para NADPH oxidasa

2, una enzima que produce superóxido, que no se incrementaba la producción del factor tisular (FT) en respuesta a los aAFL (33,34). La producción del FT se incrementa en pacientes con SAF en un estado de hipercoagulabilidad (35). Sin embargo, no es claro si estas vías intracelulares varían con las presentaciones clínicas del SAF, que se cómo observó en este trabajo, pueden provocar estrés oxidativo por diferentes mecanismos.

En modelos murinos se encontró que la inyección de aAFL anti- β_2 GPI induce estrés oxidativo detectado en el ventrículo izquierdo por la relación glutatión reducido/oxidado disminuida, asociado con un incremento en VCAM, selectina E soluble o CD62E y una disminución en la relajación dependiente del endotelio y la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en arterias mesentéricas (36). Lo anterior sugiere que el incremento en el estrés oxidativo inducido por los aAFL de pacientes con SAF altera la funcionalidad de la eNOS, sin embargo no es claro si estos eventos se asocian con trombosis (36). No obstante, se conoce que en el endotelio tratado con los aAFL de pacientes con trombosis, se reduce la fosforilación de la eNOS de manera dependiente al receptor 2 de apolipoproteína E (37). En estudios posteriores podría considerarse la evaluación de una posible relación del estrés oxidativo y la disminución de la activación en la eNOS ya que ambos eventos son inducidos por aAFL de pacientes con SAF que tienen trombosis como se encontró en este trabajo y en otros reportes (37).

Por otra parte, no se evidenciaron diferencias en la actividad de la enzima PON en los sueros de los grupos de mujeres incluidas, que según otros reportes se disminuye en pacientes con SAF primario y en modelos murinos inyectados con

aAFL (38,39). En la capacidad antioxidante total, tampoco se observaron alteraciones, lo que indica que el estrés oxidativo endotelial en el SAF no estaría asociado con un desequilibrio entre oxidantes y los mecanismos antioxidantes evaluados en este trabajo como se ha planteado en otros contextos (40).

Los resultados encontrados permiten concluir que el estrés oxidativo mitocondrial en el endotelio se asocia con la presencia de trombosis; sin embargo cuando ésta se presenta con morbilidad gestacional, también se genera estrés oxidativo intracelular, lo que sugiere que en las pacientes con SAF que presentan trombosis y morbilidad gestacional, los aAFL podrían tener efectos más patológicos. Aún no se ha esclarecido el efecto que puedan tener las ERO inducidas por los aAFL de pacientes con SAF que presentan trombosis en la activación de vías intracelulares en el endotelio.

Agradecimientos

A la Clínica Universitaria Bolivariana, al Hospital San Vicente de Paúl y a las mujeres que colaboraron en el estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que esta investigación se realizó en ausencia de cualquier relación financiera o comercial que se pueda constituir como potencial conflicto de interés.

Financiación

Este proyecto fue financiado por Colciencias (Código # 111571249846) y CODI-UdeA (Código 2015-7495, 2015-7448). Manuela Velásquez es becaria de Doctorado de Colciencias (757-2016); Manuel Alejandro Granada fue joven

investigador de Colciencias (737-2015); Ángela María Álvarez fue becaria de Doctorado Colciencias (2010).

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;4:295-306. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>
2. **Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Alijotas-Reig J.** Obstetric antiphospholipid syndrome. *Rev Clin Esp.* 2016;216:135-45. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2015.09.003>
3. **Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Cervera R, Shoenfeld Y, de Ramon E, et al.** Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:1011-8. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204838>
4. **Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F.** Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7:330-9. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.52>
5. **Chighizola CB, Raschi E, Borghi MO, Meroni PL.** Update on the pathogenesis and treatment of the antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;27:476-82. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000200>
6. **Ripoll VM, Pregnolato F, Mazza S, Bodio C, Grossi C, McDonnell T, et al.** Gene expression profiling identifies distinct molecular signatures in thrombotic and obstetric antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2018;93:114-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.07.002>

7. **Alvarez AM, Balcazar N, San Martin S, Markert UR, Cadavid AP.** Modulation of antiphospholipid antibodies-induced trophoblast damage by different drugs used to prevent pregnancy morbidity associated with antiphospholipid syndrome. *Am J Reprod Immunol.* 2017;77. <https://doi.org/10.1111/aji.12634>
8. **Velásquez M, Álvarez AM, Cadavid AP.** Cuantificación sistematizada de la remodelación vascular *in vitro* en la morbilidad gestacional asociada al síndrome antifosfolípido. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2016;81:455-64
<https://doi.org/10.4067/S0717-75262016000600002>
9. **Sacharidou A, Shaul PW, Mineo C.** New insights in the pathophysiology of antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44:475-82.
<https://doi.org/10.1055/s-0036-1597286>
10. **Lopez-Pedrerera C, Barbarroja N, Jimenez-Gomez Y, Collantes-Estevez E, Aguirre MA, Cuadrado MJ.** Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with anti-phospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55:2096-108. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew054>
11. **Lum H, Roebuck KA.** Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C719-41.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C719>
12. **Simoncini S, Sapet C, Camoin-Jau L, Bardin N, Harle JR, Sampol J, et al.** Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome. *Int Immunol.* 2005;17:489-500. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh229>

13. **Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN.** Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *Circ Res.* 2001;88:245-50
14. **Kojda G, Harrison D.** Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999;43:562-71.
15. **Lubos E, Handy DE, Loscalzo J.** Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci.* 2008;13:5323-44.
16. **Giannakopoulos B, Krilis SA.** The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2013;368:1033-44.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1112830>
17. **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;63:2774-82. <https://doi.org/10.1002/art.30383>
18. **Perez-Sanchez C, Barbarroja N, Messineo S, Ruiz-Limon P, Rodriguez-Ariza A, Jimenez-Gomez Y, et al.** Gene profiling reveals specific molecular pathways in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular disease in antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome with lupus. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:1441-9.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204600>
19. **Kwak JY, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Beer AE.** Autoantibodies in women with primary recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *J Reprod Immunol.* 1992;22:15-31. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(92\)90003-M](https://doi.org/10.1016/0165-0378(92)90003-M)

20. **Robinson KM, Janes MS, Beckman JS.** The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc.* 2008;3:941.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.56>
21. **Drummen GP, Makkinje M, Verkleij AJ, den Kamp JAO, Post JA.** Attenuation of lipid peroxidation by antioxidants in rat-1 fibroblasts: comparison of the lipid peroxidation reporter molecules cis-parinaric acid and C11-BODIPY 581/591 in a biological setting. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1636:136-50.
<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2003.10.013>
22. **Nicolescu AC, Li Q, Brown L, Thatcher GR.** Nitroxidation, nitration, and oxidation of a BODIPY fluorophore by RNOS and ROS. *Nitric Oxide.* 2006;15:163-76. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.01.010>
23. **Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA.** Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:69-76.
24. **Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG.** Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem.* 1989;180:242-7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90424-7)
25. **MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML.** Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *J Sci Food Agric.* 2006;86:2046-56. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2603>
26. **Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A.** Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr.* 1998;128:1003-7.
<https://doi.org/10.1093/jn/128.6.1003>

27. **Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de Laat B, 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;20:191-205. <https://doi.org/10.1177/0961203310397082>
28. **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 Rheumatol*. 2015;67:488-97. <https://doi.org/10.1002/art.38934>
29. **Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G.** Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest*. 2008;118:3453-61. <https://doi.org/10.1172/JCI36089>
30. **Weiler H.** Tracing the molecular pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest*. 2008;118:3276-8. <https://doi.org/10.1172/JCI37243>
31. **Wu F, Tian FJ, Lin Y.** Oxidative stress in placenta: Health and diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:293271. <https://doi.org/10.1155/2015/293271>
32. **Meroni PL, Borghi MO, Grossi C, Chighizola CB, Durigutto P, Tedesco F.** Obstetric and vascular antiphospholipid syndrome: same antibodies but different diseases? *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14:433-40. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0032-6>
33. **Prinz N, Clemens N, Canisius A, Lackner KJ.** Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and

endothelial cells. Lessons from the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2013;109:525-31. <https://doi.org/10.1160/TH12-06-0421>

34. **Dikalov SI, Nazarewicz RR, Bikineyeva A, Hilenski L, Lassegue B, Griending KK, et al.** Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20:281-94. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4918>

35. **Roubey RA.** Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2000;15:217-20. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0397>

36. **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. *Vascul Pharmacol.* 2015;71:93-101. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.014>

37. **Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, Salmon JE, Shen YM, Herz J, et al.** Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood.* 2018;131:2097-110. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-814681>

38. **Delgado Alves J, Ames P, Donohue S, Stanyer L, Noorouz-Zadeh J, Ravirajan C, et al.** Antibodies to high-density lipoprotein and β 2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2686-94. <https://doi.org/10.1002/art.10542>

39. **Delgado Alves J, Mason L, Ames P, Chen P, Rauch J, Levine J, et al.** Antiphospholipid antibodies are associated with enhanced oxidative stress, decreased plasma nitric oxide and paraoxonase activity in an experimental mouse

model. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:1238-44.

<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh722>

40. **Fenzi V, Flegar-Mestric Z, Perkov S, Andrisic L, Tatzber F, Zarkovic N, *et al.*** Trace elements and oxidative stress in hypertensive disorders of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287:19-24. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2502-4>

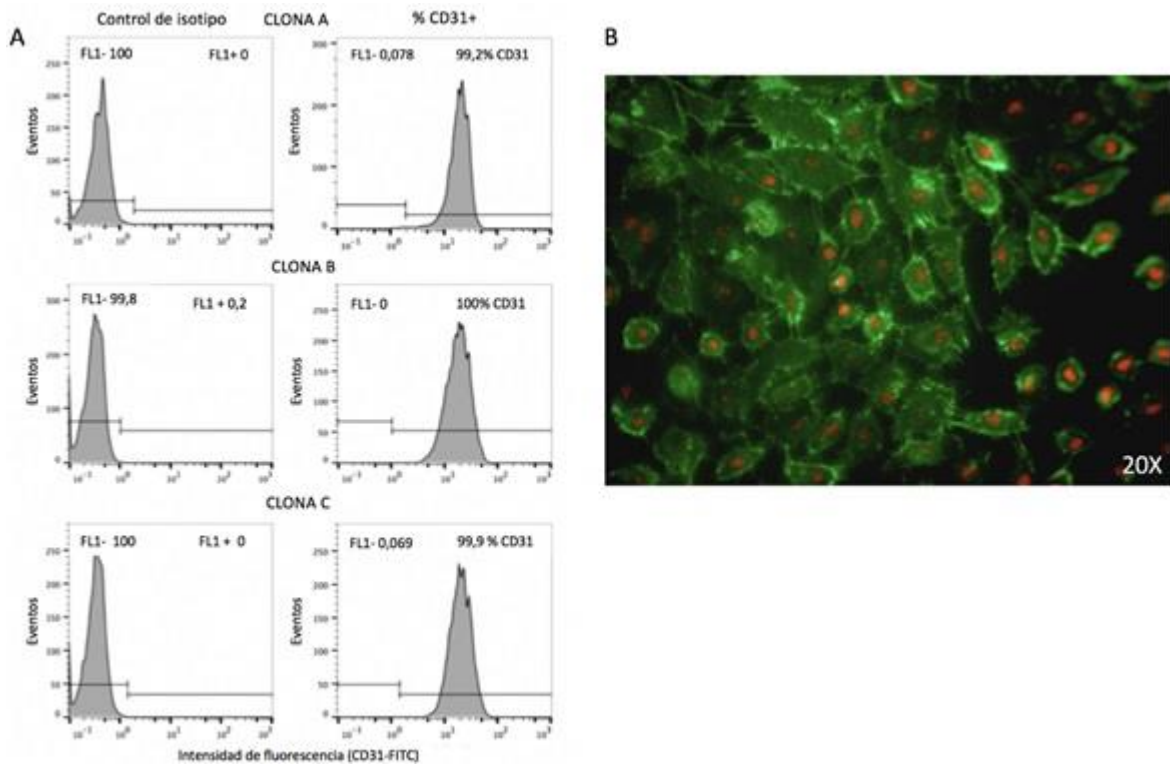


Figura 1. La expresión del CD31 se conservó estable en células HUVEC provenientes de diferentes cordones umbilicales. (A) La expresión de CD31 se observó en más del 99% de las células HUVEC de diferentes cordones umbilicales. Se muestran 3 clonas representativas de diferentes cordones umbilicales utilizados en los ensayos. La detección del CD31 se evaluó en el pase 1. Los gráficos fueron obtenidos con el programa de análisis de datos de citometría *Flowjo X*. (B) Se observa la expresión del CD31 conjugado con FITC en células HUVEC. Los núcleos se detectaron con IP (color rojo). Las fotografías se adquirieron con una magnificación de 20 X.

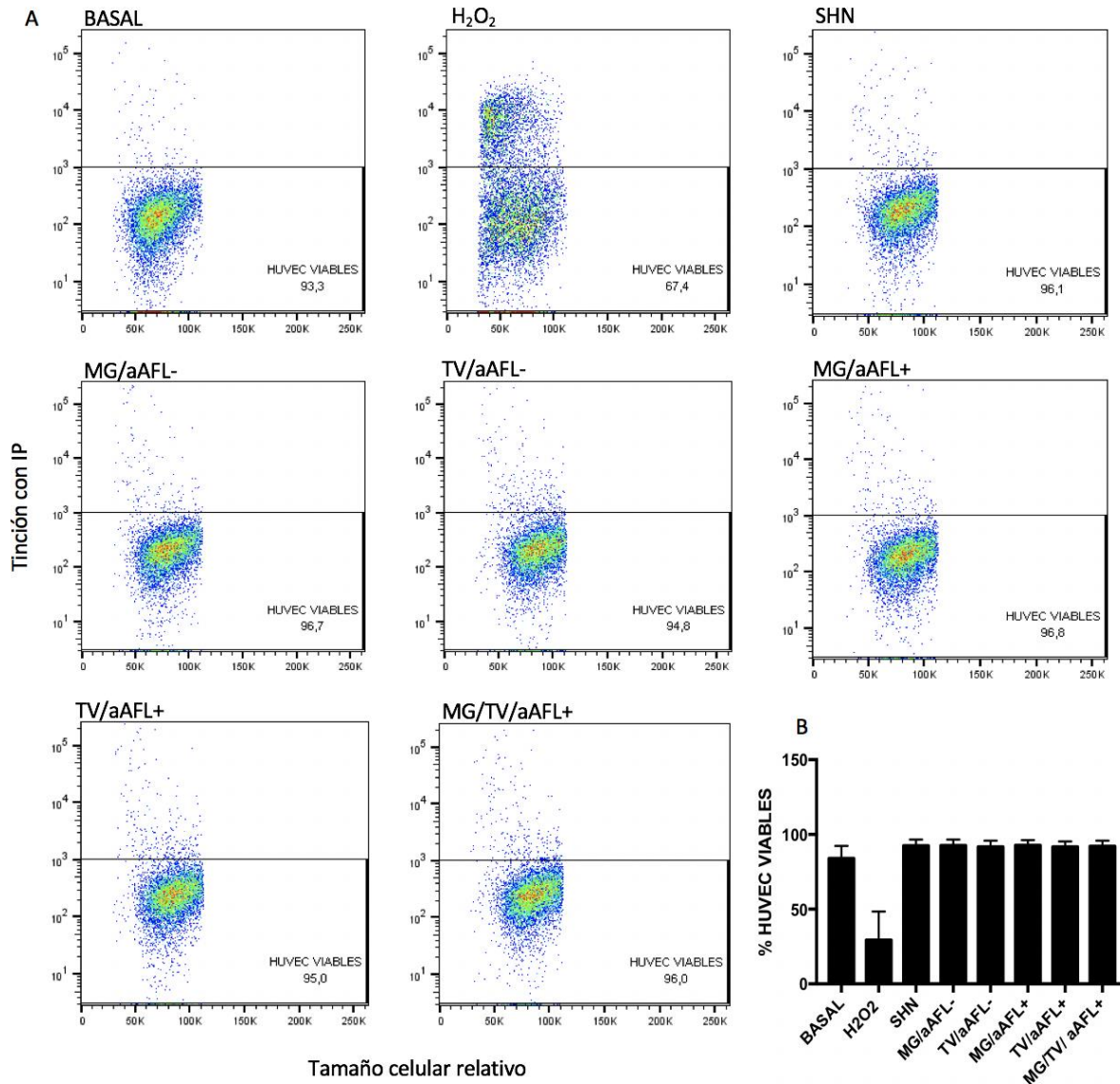


Figura 2. Viabilidad de las células endoteliales por citometría de flujo. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) disminuye la viabilidad celular, sin embargo la producción de ERO se evaluó únicamente en las células negativas para IP. (A) No se observó efecto del suero de los diferentes grupos de mujeres incluidas en el estudio sobre la viabilidad celular como se observa en las imágenes representativas.(B) Los resultados se obtuvieron de cinco experimentos independientes. Los datos se indican como la media ± la desviación estándar.

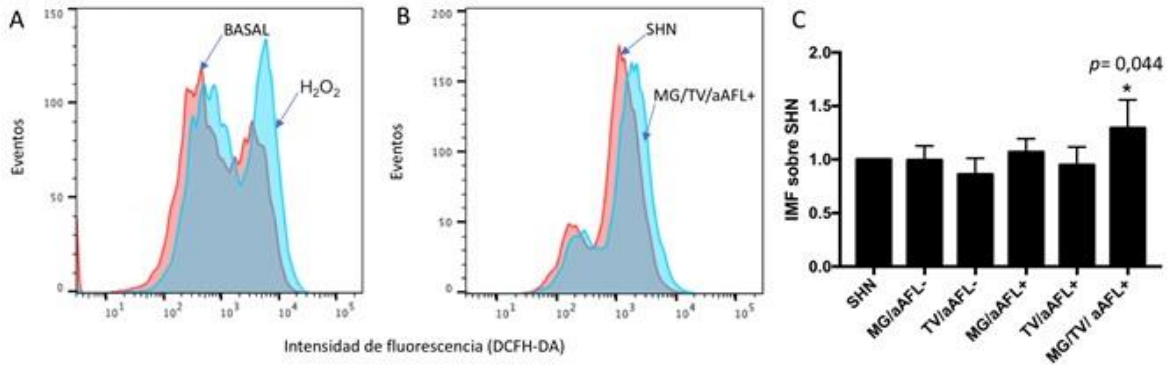


Figura 3. Producción de ERO intracelulares por citometría de flujo. (A) Se observó un incremento de IMF del DCFH-DA en las células tratadas con peróxido de hidrógeno (B) Imagen representativa del efecto inducido por el suero del grupo de mujeres con MG/TV/aAFL+ en el incremento de las ERO intracelulares. (C) Comparación entre los grupos de estudio. Se realizó una ANOVA de una vía y un post-test de Holm-Sidak $p < 0.05$ *. Los resultados se obtuvieron de cinco experimentos independientes. Los datos se indican como la media \pm la desviación estándar.

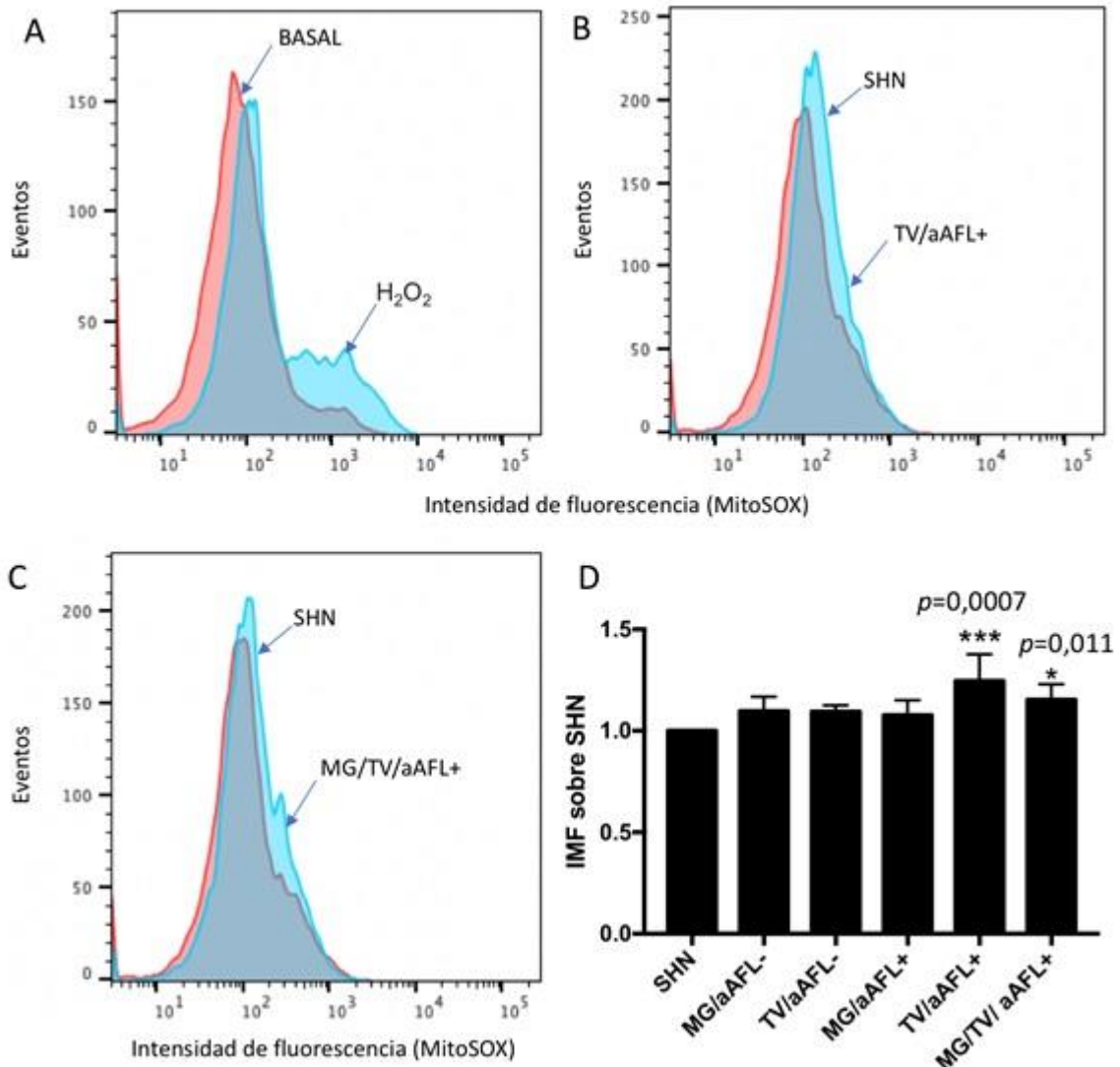


Figura 4. Producción de anión superóxido mitocondrial por citometría de flujo. (A) Se observó un incremento en la IMF del MitoSOX en las células tratadas con peróxido de hidrógeno. (B -C) Imágenes representativas del efecto de los sueros con MG/TV/aAFL+ y TV/aAFL+ en el incremento de anión superóxido. (D) Comparación entre los grupos de estudio. Se realizó una ANOVA de una vía y un post-test de Holm-Sidak $p < 0.05$ * y $p < 0.001$ ***. Los resultados se obtuvieron de cinco experimentos independientes. Los datos se indican como la media \pm la desviación estándar.

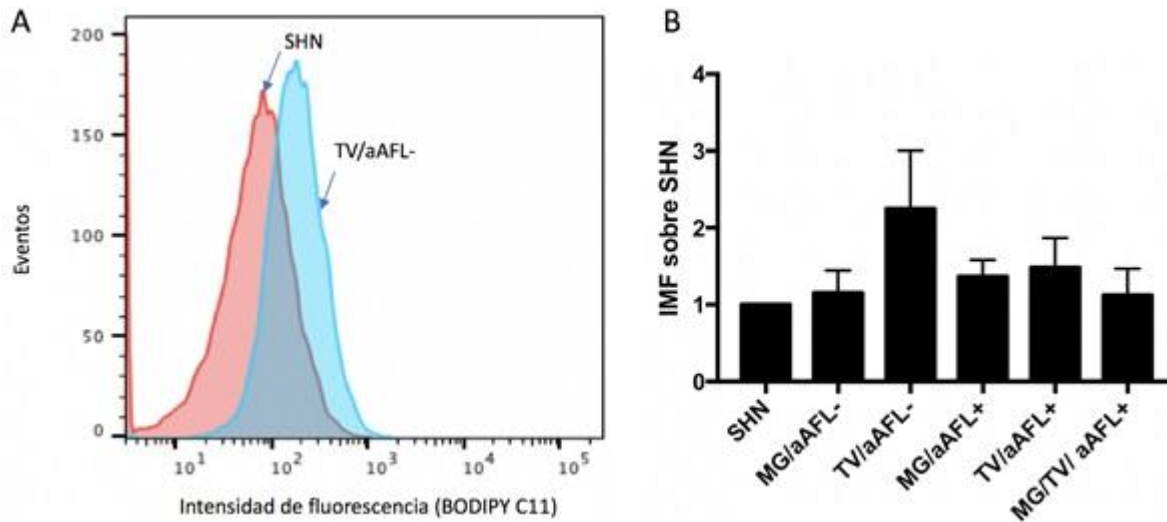


Figura 5. Lipoperoxidación endotelial por citometría de flujo. (A) Imágenes representativas del efecto de los diferentes sueros de las pacientes del estudio en la lipoperoxidación endotelial. (B) Comparación entre los grupos de estudio. Se realizó una ANOVA de una vía y un post-test de Holm-Sidak. Los resultados se obtuvieron de cuatro experimentos independientes. No se observaron diferencias en la lipoperoxidación de la membrana de las células endoteliales. Los datos se indican como la media \pm la desviación estándar.

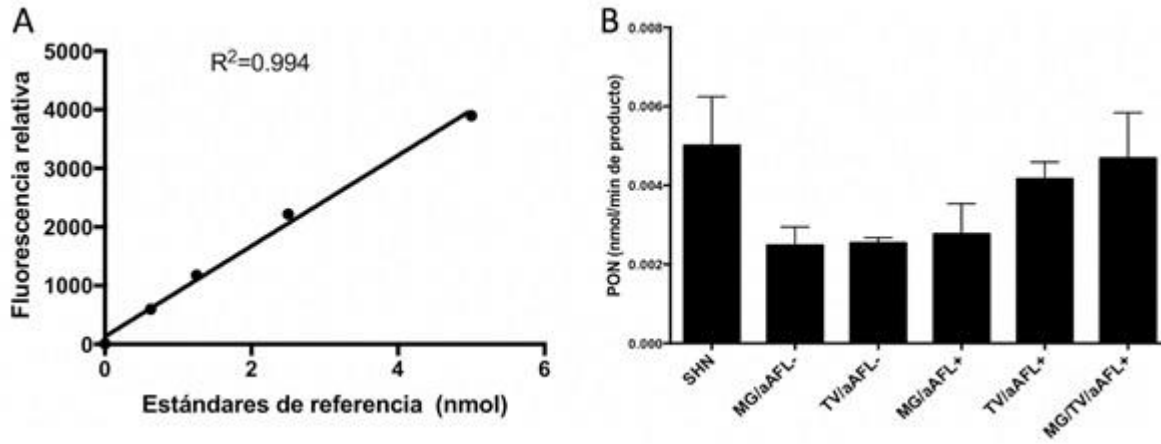


Figura 6. Actividad basal de la enzima PON-1 en los sueros de los grupos de estudio. (A) Curva estándar del ensayo. (B) Comparación de la actividad basal de la PON-1 entre los diferentes grupos de estudio con relación al grupo de SHN. Se realizó un ensayo por duplicado. Se realizó un análisis de Kruskal- Wallis y un post-test de Dunns.

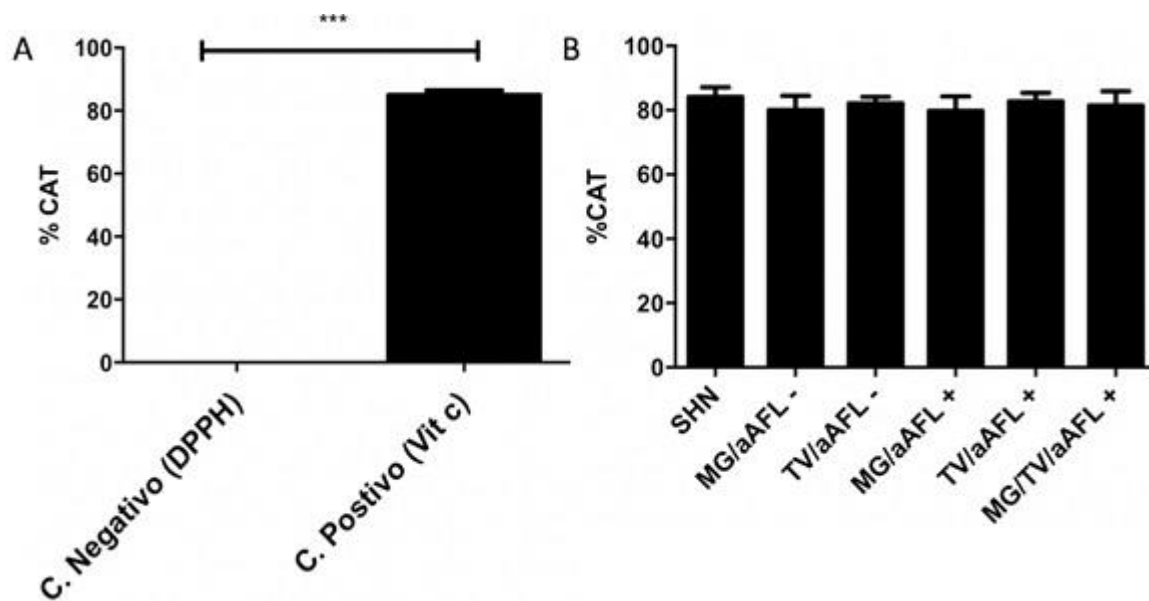


Figura 7. Porcentaje de capacidad antioxidante total (%CAT) de los sueros de los grupos de estudio. (A) %CAT del control negativo DPPH y del control positivo vitamina C. (B) Evaluación del %CAT de los diferentes grupos de estudio en comparación con el SHN. Se realizaron 3 ensayos independientes. Para comparar los grupos de estudio se realizó un análisis de Kruskal- Wallis y un post-test de Dunns; para los controles del ensayo se realizó una t de Student $p < 0,001^{***}$.

Parámetro	SHN (n=10)	MG/aAFL- (n=10)	TV/aAFL- (n=4)	MG/aAFL+ (n=10)	TV/aAFL+ (n=4)	MG/TV/aAFL+ (n=10)	
Edad (media de años +/- DE)	35,5 +/- 1,7	30,9 +/- 1,9	35,0 +/- 7,4	34,8 +/- 2,4	29,7 +/- 7,2	37,2 +/- 1,8	
Pérdidas gestacionales (media y rango)							
≤ 10 semanas de gestación	0	1,9 (1-3)	0	1,2 (1-2)	0	1,3 (1-5)	
> 10 semanas de gestación	0	0,7(1-3)	0	0,9 (1-4)	0	1,7 (1-5)	
Preeclampsia <34 semanas (número de pacientes)	0	0	0	0	0	6	
Restricción del crecimiento intrauterino (número de pacientes)	0	0	0	1	0	1	
Trombosis arterial/venosa (número de pacientes)	0	0	4	0	4	10	
Anticoagulante lúpico (promedio +/- SD)	1,06+/-0,05	1,13+/-0,01	1,12+/- 0,04	1,17+/-0,13	2,32 +/- 0,31	2,38 +/- 0,28	
Valor positivo > 1.2							
Anti-β2 glicoproteína I (U/ml)	10,42	4,21	5,04	6,12	63,4	100,7	
Valor positivo > 15 U/ml							
Anti cardiolipina por el ELISA comercial Aesku	5,63	4,91	8,53	8,30	156,7	300,2	
Valor positivo > 15 GPL/ml							
Anti cardiolipina por ELISA estandarizado en el laboratorio (% del control)	24,0	19	9,6	100	60,2	49,1	
Valor positivo >25%							
Anticuerpos antifosfolípidos “no criterio” (% del control) Valor positivo >25%	GPG	17,0	24,0	10,0	176,9	63,6	66,5
	GPA	0,9	3,7	0	23,0	60,5	114,8
	GPS	0,9	4,6	0,8	20,5	28,9	18,2
	GPE	4,3	16,8	0	25,5	21,1	3,6
	GPI	4,9	8,9	1	18,7	17,4	15,1

Cuadro 1. Características de las mujeres incluidas en el estudio. **SHN:** mujeres negativas para aAFL y embarazos previos sin complicaciones; **MG/aAFL-:** mujeres con morbilidad gestacional, negativas para anticuerpos antifosfolípidos (aAFL); **TV/ aAFL-**, mujeres con trombosis vascular, negativas para aAFL; **MG/aAFL+:** mujeres con morbilidad gestacional sola y aAFL positivos. **TV/ aAFL+:** mujeres con trombosis vascular sola y aAFL positivos; **MG/TV/aAFL+:** mujeres con trombosis vascular y morbilidad gestacional, positivas para aAFL. agulante lúpico, **GPL:** unidades estándar de inmunoglobulina G anti-cardiolipina, **GPG:** inmunoglobulina G anti-fosfatidilglicerol, **GPA:** inmunoglobulina G anti-ácido fosfatídico, **GPS:** inmunoglobulina G anti-fosfatidilserina, **GPE:** inmunoglobulina G anti-fosfatidiletanolamina, **GPI:** inmunoglobulina G anti-fosfatidilinositol.