

Universidad de Carabobo

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela de Bioanálisis

Departamento de Estudios Clínicos

Incidencia de Anticuerpos antifosfolípidos en mujeres embarazadas sanas y en mujeres con abortos espontáneos, atendidas en la consulta de ginecología y obstetricia de la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera. Valencia.

Carabobo.2006

(Trabajo de investigación para ascender a la categoría de Profesor Agregado)

Tutor: Dra. Sioly Mora de Orta

Autor: Lic. Sarah E Bethencourt C

## RESUMEN

Los anticuerpos antifosfolípidos son una familia heterogénea de inmunoglobulinas que se unen a los fosfolípidos cargados negativamente presentes en las membranas celulares. Los anticuerpos anticardiolipinas y los anticoagulantes lúpicos son los principales representantes de esta familia de autoanticuerpos, que están siendo relacionados con complicaciones obstétricas, principalmente abortos espontáneos a repetición. Se determinó la incidencia de estos autoanticuerpos en mujeres con embarazos normales y en mujeres con más de 2 abortos a repetición; para ello se realizaron determinaciones séricas de los isotipos M y G de las inmunoglobulinas para anticuerpos anticardiolipinas (ACA) y para anti beta2glicoproteína I (anti $\beta$ 2GPI) utilizando la metodología ELISA. Los resultados obtenidos muestran 11,1% de las mujeres con embarazos normales dieron resultados positivos para la IgM ACA, mientras que en las mujeres con abortos espontáneos a repetición el porcentaje de positividad fue de 23%. En cuanto al isotipo IgG ACA se obtuvo 15% de positividad en las mujeres con embarazos normales contra 57% de positividad en las mujeres con abortos ( $p < 0,01$ ). Cuando se evaluó el isotipo IgM de la anti $\beta$ 2GPI la positividad observada fue de 1% en las mujeres con embarazos normales contra 43% de positividad en mujeres con abortos ( $p < 0,01$ ). En cuanto a los porcentajes de positividad para el isotipo IgG de la anti $\beta$ 2GPI fue de 20% para las mujeres con embarazos normales y de 9% en las mujeres con abortos. Se concluye que IgG ACA e IgM anti $\beta$ 2GPI pueden estar asociadas a interrupción espontánea del embarazo.

Palabras claves: Anticuerpos antifosfolípidos, Anticardiolipinas, Antibeta2glicoproteína I, embarazo, aborto, problemas obstétricos.

## Abstract

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous family of immunoglobulin that interact with negatively charged phospholipids present in cellular membranes. The main representatives of antiphospholipid family of autoantibodies are anticardiolipin and lupus's anticoagulant antibodies, both of them have been implicated in obstetrical complications, mainly in spontaneous abortions to repetition. In this work, the incidence of serum autoantibodies in women with normal pregnancies and women with more than 2 abortions to repetition was determined. IgM and IgG isotypes anticardiolipins antibodies (ACA) and anti beta2glycoprotein I (anti $\beta$ 2GPI) were measured using the ELISA technique. Our results show that 11.1% of women with normal pregnancies were positive for IgM ACA, whereas 23% of women with spontaneous abortions to repetition were positive for the same isotype. IgG ACA was found positive in 15% of women with normal pregnancies against 57% in women with abortions ( $p < 0,01$ ). IgM anti $\beta$ 2GPI isotype was positive in 1% of women with normal pregnancies against 43% of women with abortions to repetition ( $p < 0,01$ ), IgG anti $\beta$ 2GPI was found positive in 20% of women with normal pregnancies and in 9% of women with abortions. These results suggest that IgG ACA and IgM anti $\beta$ 2GPI may play a role in the induction of spontaneous abortions to repetition.

Key words: Antibodies obstetrical antiphospholipids, Anticardiolipins, Antibeta2glycoproteinI, abortion, pregnancy problems.

## INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la inmunología de la reproducción es fundamental para comprender los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos que ocurren durante el desarrollo del embarazo. Actualmente se sabe que, seis días después de completarse la fecundación se inicia la implantación, la cual está regulada por interacciones complejas entre péptidos y hormonas esteroideas que sincronizan la preparación del endometrio y el subsiguiente desarrollo del embrión. Poco después de la implantación, los tejidos embrionarios comienzan a secretar gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona que promueve la conversión del cuerpo amarillo del ciclo menstrual ovárico en cuerpo amarillo del embarazo. Este último, secreta progesterona, la cual puede desempeñar una función inmunosupresora significativa en la interfase materno-fetal. (1)

El feto es un verdadero trasplante semialogenéico, dado que la mitad de su genoma deriva del genoma paterno, por lo tanto, el feto posee antígenos extraños para el sistema inmunitario de la madre, y muchos de esos antígenos pueden ser encontrados en la sangre materna. Por otra parte, hoy se sabe que el feto es potencialmente competente, desde el punto de vista inmunitario; y más aún, que la madre posee un sistema inmunitario uterino (SIU) activo y que existe intensa actividad inmunitaria en la placenta o interfase materno- fetal. El conjunto de la actividad del SIU y de la placenta, favorece la tolerancia, la evolución satisfactoria del embarazo y el desencadenamiento fisiológico del parto. (2)

La interfase materno-fetal también conocida como placenta, fue considerada como una barrera de circulación inerte entre la circulación materna y la fetal. Hoy día, se conoce que es un órgano productor de proteínas y hormonas esteroideas, las cuales juegan un papel preponderante en la fisiología del embarazo, (2) y que en ella están presentes componentes celulares y humorales del sistema de defensa que contribuyen a estimular el crecimiento de las células fetales y placentarias, además de jugar un papel de mediador en el fenómeno de tolerancia materno-fetal, en la protección del feto y en la eliminación de potenciales agentes patógenos, y de desechos titulares. (2,3).

La placenta está conformada por el trofoblasto (Citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto), de origen fetal y la decidua (capsular, basal y parietal), de origen materno. El trofoblasto, actúa como una barrera contra la acción de diferentes efectores inmunes, del tipo de los linfocitos, anticuerpos citotóxicos y los complejos antígeno-anticuerpo; pero no puede impedir el paso de los anticuerpos de clase IgG, ni tampoco las señales de reclutamiento de linfocitos, las cuales actúan como mediadoras del crecimiento y desarrollo del embrión.

Durante el desarrollo embrionario las células del trofoblasto, citotrofoblasto, se diferencian en células que están destinadas a formar la placenta y la capa exterior de las membranas fetales. (4)

El sincitiotrofoblasto, es una capa multinuclear de células fusionadas que se desarrolla a partir de las vellosidades formadas por el trofoblasto. Esta capa celular

contribuye a proteger al feto de los fenómenos inmunitarios que desarrolla la madre (5). Función que cobra gran importancia, considerando que esta capa se encuentra directamente expuesta a la sangre materna, con gran contenido de linfocitos y anticuerpos, potencialmente capaces de interferir el adecuado desarrollo y formación del citotrofoblasto, y en consecuencia generar daño en las células fetales que expresan aloantígenos paternos heredados. Esta membrana permite el intercambio bidireccional de moléculas entre la circulación materna y la fetal. (6)

Una vez ocurrida la fecundación, el endometrio se diferencia para formar la decidua. Este es un tejido cuyo rol primario es ejercer funciones nutritivas, estructurales e inmunológicas, durante el proceso de implantación. En esta membrana encontramos, tanto células principales como accesorias del sistema inmunitario, las cuales participan de manera activa y directa en la aceptación ó rechazo del embarazo. Entre estas células destacan los linfocitos T y los B, los macrófagos y las células citotóxicas naturales ó NK (natural Killer) (3).

El sistema inmunitario placentario tiene como función principal, evitar que el feto sea rechazado por la madre, por lo que los diversos factores humorales y celulares del SIU y placentario deben actuar en forma perfectamente regulada para producir la tolerancia feto-materna y en consecuencia el desarrollo normal del embarazo.(2)

En la interfase materno-fetal existe un equilibrio biológico en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad. Los antígenos más polimórficos ó clásicos como HLA-

A y HLA-B se expresan débilmente y en oportunidades no son expresados por el trofoblasto, a diferencia de los antígenos HLA de clase I, no clásicos como HLA-G y HLA-E, muy poco polimórficos. Los antígenos de clase II no son expresados por las células trofoblásticas. (7)

Los antígenos HLA-G paternos son normalmente reconocidos por el sistema inmunitario materno, para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora, aoinmune mediada por anticuerpos bloqueadores que actúan en conjunto con componentes celulares del sistema inmunitario como las células NK. Se forma así, una línea de defensa natural, de suma importancia en la tolerancia del embarazo. Estos anticuerpos maternos con función protectora se unen a los antígenos HLA-DR y HLA-DQ (Clase II) embrionarios, modulando positivamente el crecimiento y desarrollo de la placenta. (8)

Ocurren eventos en los cuales los antígenos HLA-DR y HLA-DQ son similares en la madre y el embrión, lo que trae como consecuencia la falla en la producción de anticuerpos maternos protectores, dando inicio a una respuesta inadecuada, que puede desencadenar diversos problemas obstétricos, entre los que se encuentran las pérdidas recurrentes del embarazo, la muerte fetal in útero, la restricción del crecimiento intrauterino y el parto prematuro, entre otros. (6)

Por otra parte, se conoce que las células NK desempeñan una función protectora de la unidad feto-placentaria, porque modulan la invasión del trofoblasto y su capacidad de adherencia durante el proceso de implantación. Esta actividad la realizan a través de la

expresión en su superficie de receptores estimuladores e inhibidores del tipo KAR y KIR. El antígeno HLA-G, expresado en el trofoblasto, actúa como un potente inhibidor de la actividad de las células NK (9). Estas células secretan citocinas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ), el factor estimulador de colonias Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF), las cuales son transferidas al feto, y estimulan el crecimiento y desarrollo de las células fetales. Por otra parte, la placenta sintetiza múltiples citocinas supresoras y antiinflamatorias que modulan la actividad de estas células, en consecuencia cuando la actividad de las células NK no es suprimida, se producen fenómenos inmunitarios que interfieren el progreso normal del embarazo. (10)

Las diferentes complicaciones obstétricas como el aborto espontáneo, la restricción del crecimiento intrauterino, y la preeclampsia. (11), son atribuidas a diversas etiologías, a saber: genéticas (anormalidades cromosómicas), endocrinas (alteraciones del cuerpo lúteo con insuficiente producción de progesterona, problemas tiroideos y diabetes gestacional), anatómicas (incompetencia istmico-cervical, miomatosis uterina, alteraciones congénitas por defectos en la fusión de los conductos de Müller). También se señalan, aun cuando, con muy baja frecuencia las causas infecciosas y causas desconocidas en las que se encuentran incluidas las de tipo inmunitario, muchas de ellas por alteraciones de los mecanismos antes citados.

Uno de los problemas obstétricos más frecuente es el aborto ó interrupción espontánea del embarazo, y se define así a la pérdida del embarazo antes de las 22 semanas de gestación. (12). Esta patología, se clasifica en:

- Amenaza de aborto
- Aborto inevitable
- Aborto incompleto
- Aborto diferido ó muerte fetal intrauterina
- Aborto recurrente

El aborto recurrente se ha descrito como una alteración en los mecanismos fisiológicos del embarazo, que pueden llevar a la muerte fetal. Este tipo de aborto, es aquel que ocurre dos a más veces de forma sucesiva. Investigaciones realizadas evidencian que la probabilidad de sufrir un nuevo aborto luego de un aborto espontáneo es muy alta, y esta probabilidad aumenta aún más cuando han ocurrido cuatro abortos espontáneos consecutivos. (13)

El término síndrome antifosfolípidos (SAF), fue introducido y definido en 1987, con el fin de aunar criterios en la identificación de pacientes con desordenes clínicos asociados con test positivo de anticoagulante lúpico o anticardiolipina (11). Se le conoce como una entidad clínica caracterizada, principalmente, por la asociación de uno ó más eventos clínicos tales como, trombosis arteriales o venosas, trombocitopenias y complicaciones obstétricas que producen infertilidad, restricción del crecimiento intrauterino, abortos recurrentes, siempre asociados con títulos séricos elevados de anticuerpos antifosfolípidos en la paciente. (14)

El SAF se clasifica en primario ó secundario, dependiendo de su asociación ó no con otra patología. En el primario, las únicas manifestaciones son las señaladas para el síndrome antifosfolípido, mientras que en el secundario existen enfermedades asociadas, por lo general autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (11).

El conocimiento de los anticuerpos antifosfolípidos data de 1930, cuando se identificaron individuos que daban resultados falsos positivos para la prueba serológica de sífilis. El componente antigénico esencial de estas pruebas es un fosfolípido, denominado cardiolipina. En 1950 se identificó en algunos pacientes portadores de lupus eritematoso sistémico (LES), la presencia *In Vitro* de inhibidores de la coagulación, los cuales, son anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos que favorecen *In Vivo* el desarrollo de trombosis. A estos anticuerpos se les denominó anticoagulantes lúpicos. (AL).

La importancia clínico-biológica de los Anticuerpos Antifosfolípidos (aAF), es uno de los problemas científicos actuales más difíciles de determinar con precisión, debido a las controversias que existen entre los numerosos reportes publicados, con respecto de la frecuencia, incidencia y prevalencia de los aAF en mujeres en edad reproductiva. Por otra parte, se ha determinado que un porcentaje significativo de personas aparentemente sanas son seropositivas para estos anticuerpos.

En la actualidad, se sabe que, los anticuerpos antifosfolípidos, son una familia heterogénea de inmunoglobulinas dirigidas contra diferentes complejos proteína-fosfolípido, tanto séricos como de membrana, lo que les confiere una gran heterogeneidad

antigénica (diferentes anticuerpos y numerosos antígenos potenciales a los cuales se pueden unir) y una gran heterogeneidad funcional que va desde leves efectos patológicos hasta daños severos, con diferentes manifestaciones clínicas. Estos anticuerpos pueden ser de clase IgA, IgG, y IgM, los del isotipo IgG son considerados como factor predictivo para que ocurran interrupciones espontáneas del embarazo, cuando sus títulos son muy elevados (15).

Los anticuerpos antifosfolípidos reconocen diferentes fosfolípidos aniónicos de membrana, como cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, y ácido fosfatídico, además de ciertas proteínas plasmáticas como la  $\beta$ 2 Glicoproteína I, la protombina y la proteína C, entre otras. (16).

La  $\beta$ 2 Glicoproteína es una proteína plasmática de unión a fosfolípidos, cuya función principal es la de actuar como un anticoagulante natural, cuando se une a los fosfolípidos (18). Ella actúa inhibiendo la vía intrínseca de la coagulación, inhibe la actividad del complejo protombinasa y la agregación plaquetaria. (18, 19).

Otro tipo de anticuerpos antifosfolípidos son las anticardiolipinas (ACA). Estos incluyen los diferentes isotipos IgM, IgG, IgA, siendo considerado el isotipo IgG, y específicamente el sub tipo IgG2, el más patogénico. Este tipo de anticuerpo ejerce su acción sobre las membranas de las plaquetas, glóbulos rojos, células endoteliales, neutrófilos, sincitiotrofoblasto así como sobre reacciones de la coagulación promoviendo trombosis y vasculopatías.

Por su parte los anticoagulantes lúpicos son otro tipo de anticuerpos antifosfolípidos cuyos isotipos son de las clases IgM, IgG, IgA, los cuales reaccionan con los fosfolípidos de la membrana de la célula trombocítica ó plaquetaria (factor 3 plaquetario), inhibiendo la formación del complejo activador de la protombina. Esto trae como consecuencia que se origine un efecto anticoagulante de tipo heparínico, evidenciado mediante la detección de alargamientos en los tiempos de las pruebas de coagulación. (16, 17)

Durante el desarrollo del proceso gestacional, las células del citotrofoblasto, se diferencian para dar origen al sincitiotrofoblasto. Este proceso avanza a medida que se produce la adhesión entre las células trofoblásticas, a través de puentes de fosfolípidos, para dar lugar a un fenómeno de fusión. (5) En presencia de elevados niveles de aAF el proceso de fusión no se lleva a cabo, en virtud de que dichos anticuerpos tienden a unirse con los fosfolípidos de unión presentes en el trofoblasto. Los anticuerpos ocupan el sitio de las células, lo que impide la formación del sincitiotrofoblasto, y ocasiona fallas en la implantación y rechazo del embarazo. (22)

En la última década se ha observado que la presencia de anticuerpos antifosfolípidos en mujeres embarazadas, tiene relación con complicaciones obstétricas, tales como abortos a repetición, muerte fetal in útero, retardo del crecimiento intrauterino, parto prematuro, desprendimiento prematuro de la placenta, insuficiencia útero-placentaria, hipertensión arterial inducida por el embarazo y preeclamsia; aun cuando la paciente no sea portadora de patologías autoinmunes. (23)

La frecuencia de los aAF en pacientes con aborto espontáneo recurrente varía ampliamente, en los diferentes estudios realizados en el mundo, posiblemente esto sea debido a las diferencias poblacionales, a la falta de estandarización de las pruebas utilizadas para la determinación de los mismos, y a la variación de las definiciones de los rangos considerados resultados positivos.

Los mecanismos mediante los cuales probablemente los aAF producen complicaciones obstétricas, son la producción de una vasculopatía en la decidua y trombosis plaquetarias. (1). De los aAF que mas frecuentemente se determinan en el laboratorio clínico son, los anticuerpos anticardiolipinas (ACA) y los anti  $\beta$ 2 glicoproteína I (anti-  $\beta$ 2 GPI), utilizando tecnologías inmunoenzimática ó quimioluminiscente. (20)

Se desconoce la frecuencia con la cual se presentan títulos elevados de aAF en mujeres embarazadas sin patologías autoinmunes, que llegan al final del embarazo sin complicaciones obstétricas. De igual forma, se desconoce su presencia y significación clínico-biológica en mujeres con pérdidas fetales a repetición antes de las 22 semanas de gestación.

Por lo tanto la detección precoz de títulos considerados positivos de anticuerpos antifosfolípidos en los dos grupos de pacientes a estudiar, sería importante para tratar de establecer el valor predictivo de estos anticuerpos, lo que contribuiría a mejorar el manejo terapéutico y pronóstico del embarazo de estas pacientes.

En Venezuela, aun cuando, diferentes grupos han estudiado los aAF en diversas patologías del embarazo, la mayor parte de estos se ha realizados en pacientes que presentan LES asociado, y existen muy pocos trabajos reportados sobre aAF en aborto recurrente sin otras patologías asociadas. (44). Por tal motivo, decidimos investigar la presencia de aAF en mujeres embarazadas aparentemente sanas y en mujeres con abortos recurrentes sin patologías asociadas.

### Objetivo General:

Investigar la frecuencia relativa y niveles séricos de los anticuerpos antifosfolípidos en mujeres embarazadas, aparentemente sanas, y en mujeres con abortos espontáneos a repetición de menos de 22 semanas de gestación.

### Objetivos Específicos:

- Determinar los niveles séricos de los isotipos IgM e IgG de anticuerpos anticardiolipina (ACA), en mujeres con embarazos normales a término y en mujeres con abortos espontáneos a repetición de menos de 22 semanas de gestación.
- Determinar los niveles séricos de los isotipos IgM e IgG de anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I en los dos grupos objeto de estudio.
- Comparar los niveles séricos de los diferentes isotipos de ACA y Anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I en los dos grupos objeto de estudio.
- Comparar los porcentajes de positividad de los diferentes isotipos de ACA y Anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I en ambos grupos de estudio.

## Marco Metodológico

### 3.1 Tipo de Investigación

La investigación realizada es un estudio prospectivo, de corte transversal, no experimental, comparativo y correlacional, mediante el cual se determinó la presencia de anticuerpos antifosfolípidos en mujeres con embarazos normales a término y en mujeres con abortos espontáneos recurrentes, comparando los niveles séricos de los mismos en cada grupo de estudio, lo que permitió establecer la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los mismos.

### 3.2 Población y Muestra.

La población estudiada estuvo constituida por todas aquellas mujeres con embarazos normales y mujeres con pérdidas espontáneas del embarazo antes de las 22 semanas de gestación, que asistieron a la admisión del servicio de Ginecología y Obstetricia de la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera (CHET) entre los meses de abril y diciembre de 2005. La muestra fue de tipo no probabilística circunstancial, ya que su selección no dependió del azar, sino de las pacientes disponibles para el momento del estudio.

### 3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

Previo consentimiento informado, se aplicó la ficha obstétrica (anexo A) a todas las mujeres que cumplían con los criterios de inclusión y que asistieron a la admisión del Servicio de Ginecología y Obstetricia de la Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera (CHET). Dicha ficha permitió recoger la siguiente información: Identificación del paciente: nombre, apellido, edad, lugar y fecha de nacimiento, estado civil, ocupación, motivo de la consulta y enfermedad actual.

Antecedentes personales: enfermedades tromboembólicas, alergias, lupus eritematoso sistémico (LES), Artritis reumatoide, hematomas, accidentes hemorrágicos, cefaleas, petequias, várices, diabetes, hipertensión arterial, tabaquismo, cardiopatías, infertilidad y esterilidad.

Antecedentes Familiares: diabetes, hipertensión arterial, infertilidad, esterilidad, enfermedades autoinmunes.

Antecedentes obstétricos: fecha de última menstruación y abortos previos.

Antecedentes ginecológicos: menarquia, uso de anticonceptivos, y patologías ginecológicas.

Los criterios de inclusión establecidos para todas las pacientes con embarazos normales o abortos eran: no presentar manifestaciones clínicas previas o actuales de enfermedad autoinmune de base, ser normotensas, no cardiopatas. En cuanto a las pacientes con abortos se estableció como criterio de inclusión el haber sufrido más de 2 abortos espontáneos a repetición de menos de 22 de semanas de gestación.

A todas las pacientes les fueron determinados anticuerpos anti-cardiolipina y anti- $\beta$ 2 glicoproteína I, en ambos casos de los Isotipos IgM e IgG

### 3.4 Procedimiento metodológico.

La obtención de la muestra de sangre se realizó mediante una punción venosa en el pliegue del codo, bajo condiciones de asepsia y antisepsia, utilizando el sistema Venojet y tubos vacutainer ( Becton Dickinson Vacutainer System, New Jersey , USA). A cada paciente se le extrajeron 10 mL de sangre mediante el llenado de un tubo tapa roja sin anticoagulante, estéril y siliconado. Se transportó al laboratorio de la Unidad de Investigación en Inmunología (UNIVENIN), en el departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Ciencias de la Salud, en la Universidad de Carabobo, dentro de una cava con hielo seco. Luego esta muestra fue incubada a 37 grados, en baño de maría, por 10 minutos para acelerar el proceso de retracción del coágulo para aplicarle posteriormente un procedimiento de centrifugación a 2500 r.p.m. por 10 minutos. Se obtuvo así el suero, el cual se alicuotó en criotubos estériles y se conservó a -70 °C hasta el momento de ser procesado.

La determinación de los isotipos IgM e IgG de anticuerpos anticardiolipinas y anti  $\beta$ 2 glicoproteína, se realizó por inmunoanálisis de fase sólida (ELISA), de IMMUCO Diagnostics, utilizando una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, para ambos tipos de autoanticuerpos, en la cual los isotipos IgM o IgG presentes en el suero del paciente se unen con el antígeno cardiolipina  $\beta$ 2 Glicoproteína I, respectivamente, se inmovilizan y reaccionan posteriormente con una antiinmunoglobulina antihumana, conjugada con peroxidasa, obtenida en cabras. Al añadir el sustrato específico para la

enzima se genera una reacción de color, el cual es directamente proporcional a la cantidad de isotipo presente.

El suero se diluyó 1:100 y se colocó en los micropozos que están recubiertos con los antígenos cardiolipina ó  $\beta$ 2 glicoproteína I, y en los correspondientes a los controles y calibradores proporcionados por el Kit. Se procedió a incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, para favorecer en la microplaca sensibilizada con el antígeno, la unión de los anticuerpos a determinar. Luego de la primera incubación, los anticuerpos libres y otras proteínas séricas fueron removidos mediante tres lavados, con una solución proporcionada por el Kit. Se agregó la antiinmunoglobulina conjugada con peroxidasa, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se repitió el proceso de lavado a fin de remover el exceso de conjugado. A continuación, se añadió la solución sustrato-peroxidasa (TMB) a temperatura ambiente y en oscuridad, por 15 minutos, generándose la reacción de color. Finalmente, se agregó a cada pozo solución de detención (ácido). Cada pozo se leyó en un espectrofotómetro a 405 nm contra el pozo blanco. El valor de la densidad óptica (DO) fue convertido en unidades de valor/ml (U/ml), siguiendo la siguiente ecuación según la casa fabricante:  $U/ml \text{ de la muestra} = (DO \text{ de la muestra} \times U/ml \text{ del Calibrador}) / DO \text{ del Calibrador}$ .

Los rangos considerados como positivos según la clasificación de Harris, para anticuerpos anticardiolipinas son  $IgG > 19 \text{ GPL}$  e  $IgM > 10 \text{ MPL}$  y para anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I  $IgG$  e  $IgM > 20$  unidades respectivamente. Las unidades para  $Ig G$  son expresadas en GPL y las unidades de  $IgM$  son expresadas en MPL. Estas unidades

derivan de la estandarización internacionalmente reconocida de antifosfolípidos realizada por el Dr. Harris (1983) en la Universidad de Louisville, EE.UU. Todas las muestras, los controles y los calibradores se procesaron por duplicado.

### 3.5: Técnica y análisis de datos.

Para el análisis estadístico de los datos se usaron los programas estadísticos SPSS 10.5 y el programa STATISTA, en su versión Windows XP. Se obtuvieron las frecuencias absolutas y relativas de los datos y las medidas de dispersión (media y desviación estándar). Se utilizó la prueba estadística Chi Cuadrado como prueba de bondad de ajuste, para buscar el grado de asociación entre los grupos estudiados (embarazos normales y abortos espontáneos a repetición). También se utilizó como prueba de independencia para verificar el grado de asociación entre las variables del estudio.

Se utilizó además la prueba de coeficiente de correlación de Pearson para correlacionar los valores séricos obtenidos en cada una de las muestras estudiadas, así como la prueba Z para correlacionar proporciones de muestras independientes. Se usó la prueba T-Student para comparar las medias aritméticas de los valores séricos obtenidos en cada uno de los sueros estudiados, y conocer si entre los valores promedio de los dos grupos objeto de estudio existen diferencias significativas. Se consideró significativa para todos los test  $p < 0,05$ .

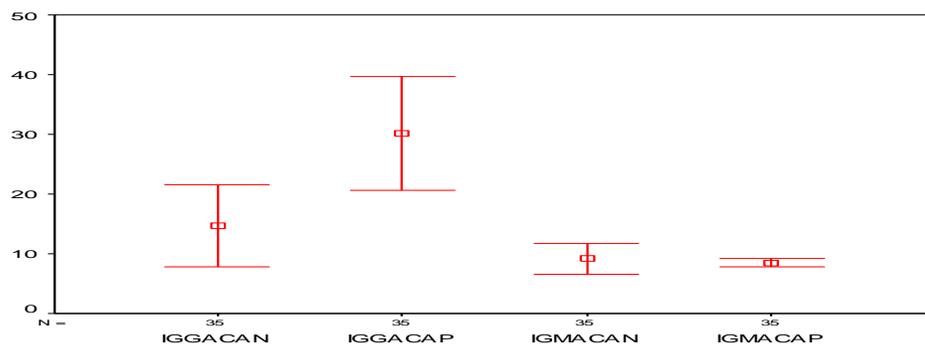
## RESULTADOS

En el presente estudio se evaluaron 45 mujeres con embarazos normales a término y 35 mujeres que presentaron abortos espontáneos recurrentes, que asistieron a la consulta de Ginecología y Obstetricia de la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera (CHET), entre los meses de abril y diciembre de 2005, a las cuales se les determinó utilizando la metodología de ELISA los isotipos (IgM e IgG) de anticuerpos anticardiolipinas y anti  $\beta 2$  Glicoproteína I, con el fin de establecer la frecuencia y niveles séricos de estos anticuerpos en la población de mujeres fértiles, aparentemente sanas, y con trastornos del embarazo (abortos) que asistieron al citado centro asistencial.

En el gráfico 1 se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores séricos de los isotipos IgM e IgG ACA, en mujeres con embarazos normales y en mujeres con abortos espontáneos a repetición. Observándose que los niveles séricos de IgG ACA son más elevados ( $30,17 \pm 27,89$ ) en el grupo de mujeres con abortos espontáneos a repetición que los niveles de IgM ACA ( $8,41 \pm 2,13$ ), con una diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ). En las mujeres con embarazos normales los niveles séricos de IgG ACA ( $14,14 \pm 19,88$ ) e IgM ACA ( $8,80 \pm 6,70$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,01$ ). (Tablas de datos en anexos)

Gráfico 1

Niveles séricos de Anticuerpos IgG/IgM Anticardiolipina en mujeres con embarazos normales a término y mujeres con abortos espontáneos a repetición.

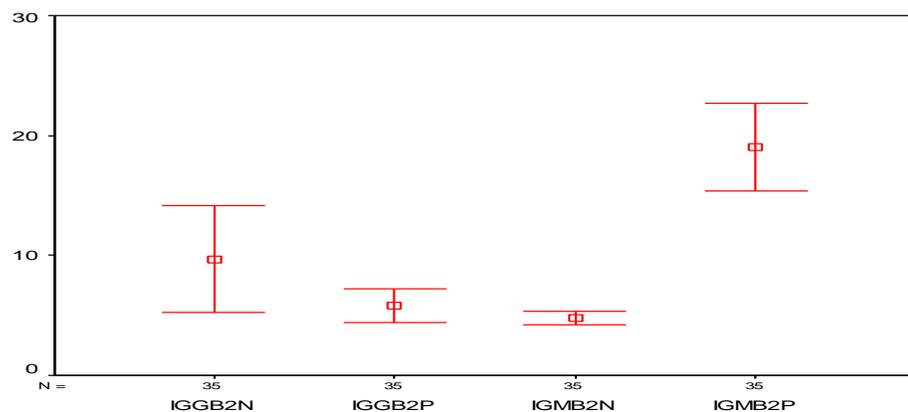


Fuente: datos tomados de la base de datos del estudio.

En el gráfico 2 se muestran las medias y desviación estándar de los valores de IgM e IgG anti  $\beta 2$  GPI, en ambos grupos de estudio. En las mujeres con abortos espontáneos a repetición se observa que los valores (5,81 $\pm$ 4,13) de IgG anti  $\beta 2$  GPI son menores que los de IgM anti  $\beta 2$  GPI (19,03 $\pm$ 10,54), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ). En las mujeres con embarazos normales los niveles séricos de IgG anti  $\beta 2$  GPI (16,54 $\pm$ 18,71) e IgM anti  $\beta 2$  GPI (4,83 $\pm$ 1,64) no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Gráfico 2

Niveles séricos de Anticuerpos IgG/IgM anti  $\beta 2$  Glicoproteína I en mujeres con embarazos normales y en mujeres con abortos espontáneos a repetición.



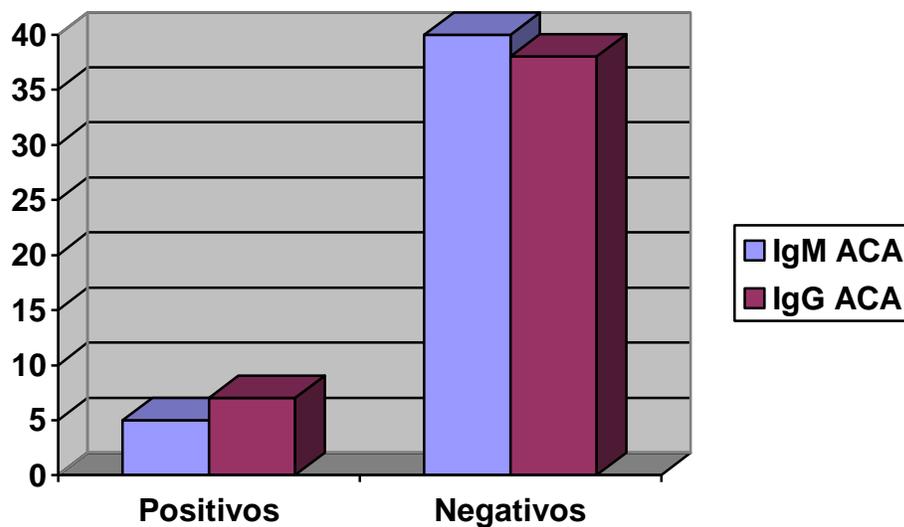
Fuente: datos tomados de la base de datos del estudio.

En el gráfico 3 se muestra la frecuencia relativa de casos positivos y negativos de IgM e IgG ACA en mujeres con embarazos normales. Como se observa IgG ACA está positiva en 7 pacientes (15,6%) y negativa en 38 pacientes (84,4%). En cuanto a IgM

ACA se observaron 5 casos positivos (11,11%) y 40 negativos (89,9%). No encontrándose asociación estadística entre la presencia de los autoanticuerpos con el embarazo normal. ( $X^2= 2,559$ ) con una  $p>0,05$

Gráfico 3

Frecuencia relativa de casos positivos para los Anticuerpos (IgG/IgM) Anticardiolipinas en embarazos normales a término.



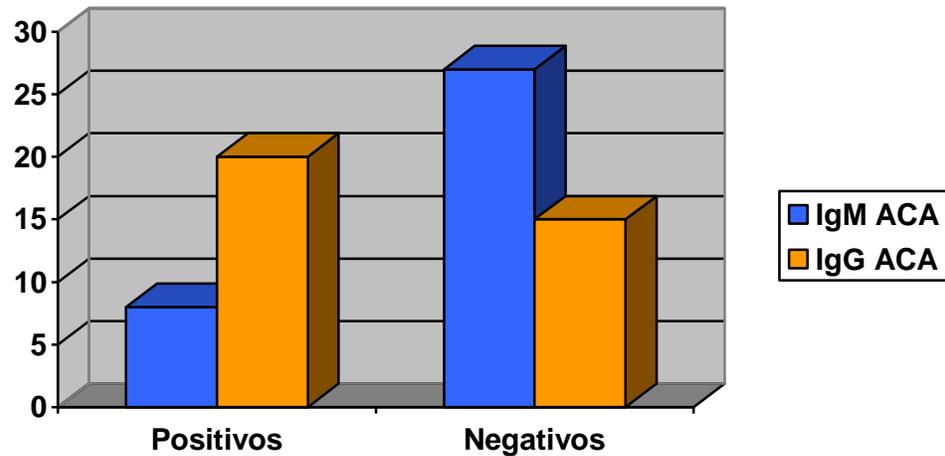
. ( $X^2= 2,559$ )  $p>0,05$

Datos obtenidos de la base de datos del estudio.

En el gráfico 4 se muestra la frecuencia relativa de casos positivos y negativos de IgM e IgG ACA en las mujeres con abortos espontáneos a repetición, observándose que IgG ACA es positiva en 20 pacientes (57,1%) y negativa en 15 (42,9%). En relación con IgM ACA fueron positivos 8 casos (22,8%) y negativos 27 (77,2%). No encontrándose asociación estadísticamente significativa entre estas dos variables al aplicar el Chi cuadrado ( $X^2 = 2,559$ ) con una  $p>0,05$

Gráfico 4

Frecuencia relativa de los casos positivos y negativos de Anticuerpos Anticardiolipina (IgM/IgG) en mujeres con abortos espontáneos a repetición.



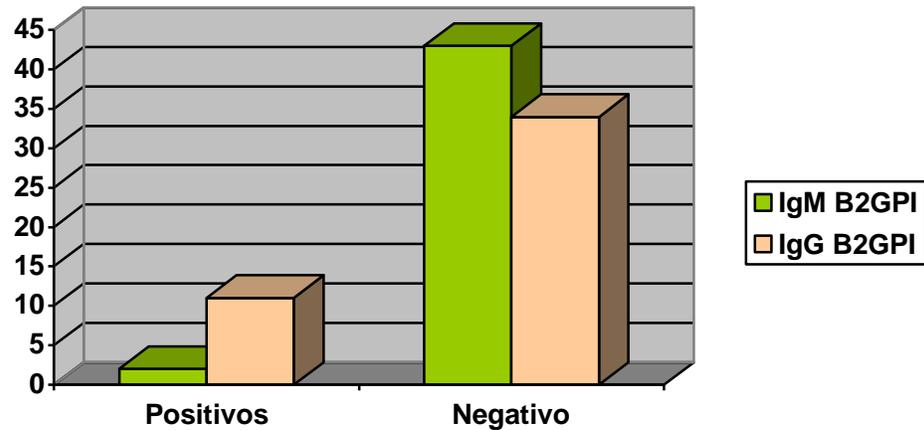
( $X^2 = 2,559$ )  $p > 0,05$

Fuente: Datos obtenidos de la base de datos del estudio.

En el gráfico 5 se muestra la frecuencia relativa de casos positivos y negativos de IgM e IgG anti  $\beta 2$  GPI en mujeres con embarazos normales. Se observó que IgM anti  $\beta 2$  GPI estaba positiva en 2 pacientes (4,4%) y negativa en 43 (95,6%), con respecto de la IgG anti  $\beta 2$  GPI el número de casos positivos fue de 11 (24,4 %) y el de negativos de 34 (75,6 %). No encontrándose asociación estadísticamente significativa entre estas dos variables. ( $X^2 = 1,97$ ) ( $p > 0,05$ )

Gráfico 5

Frecuencia relativa de casos positivos y negativos de Anticuerpos IgM/IgG Anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I en mujeres con embarazos normales.



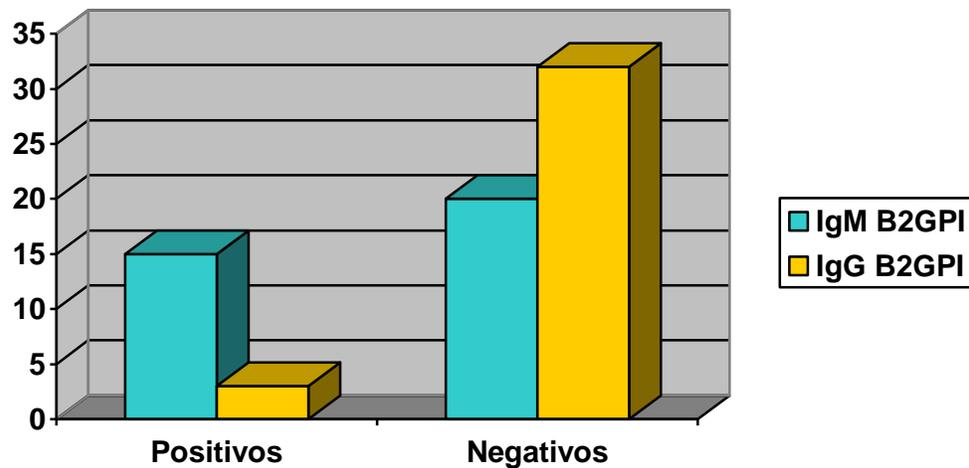
( $X^2= 1,97$ ) ( $p>0,05$ )

Fuente: datos obtenidos de la base de datos del estudio.

El gráfico 6 representan la frecuencia relativa de casos positivos y negativos de IgM e IgG anti  $\beta$ 2 GPI en mujeres con abortos espontáneos a repetición, encontrándose que IgG anti  $\beta$ 2 GPI está positiva en 3 pacientes (8,5 %) y negativa en 32 (91,5 %). Con respecto de IgM anti  $\beta$ 2 GPI el número de casos positivos fue de 15 (42,8%) y negativos de 20 (52,7%). No observándose asociación estadísticamente significativa entre estas dos variables. ( $X^2=2,57$ )  $p>0,05$

Gráfico 6

Frecuencia relativa de casos positivos y negativos de Anticuerpos IgM/IgG Anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I en mujeres con abortos espontáneos a repetición.



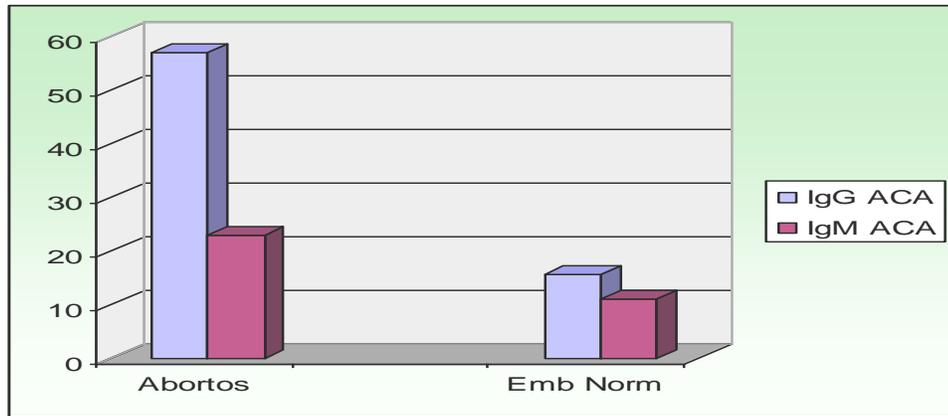
( $X^2=2,57$ )  $p>0,05$

Fuente: Datos obtenidos de la base de datos del estudio.

En el gráfico 7 se representan los porcentajes de positividad de los isotipos IgM/IgG para los anticuerpos anticardiolipinas en ambos grupos de estudio, donde al aplicar la prueba Z se obtuvo una asociación estadísticamente significativa entre el isotipo IgG ACA en las pacientes con embarazos normales a término al compararlo con el mismo isotipo de anticuerpo en las mujeres con abortos espontáneos a repetición  $p<0,01$ . Cuando se compararon los isotipos IgM ACA en ambos grupos de estudio no se encontró ninguna diferencia significativa.  $p>0,05$

#### Gráfico 7

Los porcentajes de positividad de los isotipo IgM/IgG Anti cardiolipina en mujeres con embarazos normales a término y en mujeres con abortos espontáneos a repetición.



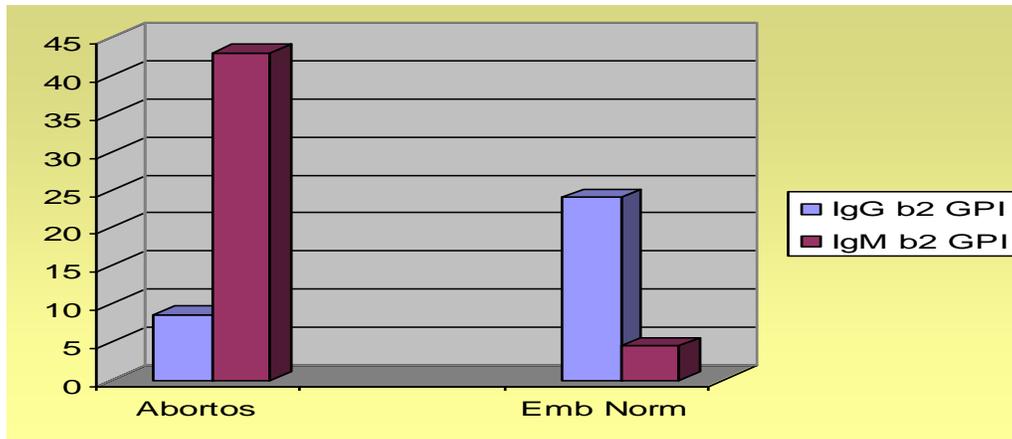
IgG ACA Emb Norm Vs IgG ACA Abortos:  $p < 0,01$

Fuente: datos obtenidos de la base de datos de estudio.

En el gráfico 8 se representan los porcentajes de positividad de los isotipos IgM/IgG de los Anticuerpos Anti  $\beta 2$  Glicoproteína I, en donde al aplicar la prueba Z se observó una asociación estadísticamente significativa entre el isotipo IgM Anti  $\beta 2$  Glicoproteína I en mujeres con embarazos normales a término y el mismo isotipo en las mujeres con abortos espontáneos a repetición.  $p < 0,01$ . En cambio cuando se relacionaron los isotipos IgG de Anti  $\beta 2$  Glicoproteína I en ambos grupos de estudio, estos no mostraron asociación estadísticamente significativa.

Gráfico 8

Porcentajes de positividad los isotipos IgM/IgG de Anticuerpos Anti  $\beta 2$  Glicoproteína I en mujeres con embarazos normales a término y en mujeres con abortos espontáneos a repetición.



IgM  $\beta$ 2 Glicoproteína Emb Norm Vs IgM  $\beta$ 2 Glicoproteína Abortos:  $p < 0,01$

Fuente: datos obtenidos de la base de datos del estudio.

## Discusión

La presencia de títulos elevados de autoanticuerpos ACA y anti  $\beta$ 2 GPI ha sido ampliamente asociada con pérdida fetal recurrente (11,15,47), en pacientes con diagnóstico de síndrome AAF (48) y en enfermedades autoinmunes como el LES (34,36), pero también en abortos espontáneos recurrentes de causa desconocida (6,11). Como una forma de contribuir al conocimiento de las causas de aborto espontáneo recurrente en nuestro medio, se estudiaron los niveles séricos y la frecuencia de positividad de IgM e IgG ACA y de IgM e IgG anti  $\beta$ 2 GPI en mujeres con dicha patología en comparación con mujeres con embarazos normales, sin antecedentes de pérdida fetal ni de enfermedades autoinmunes.

Nuestros resultados muestran que entre 9% y 57% de las pacientes con abortos espontáneos recurrentes fueron positivas para ambos isotipos de anticuerpos ACA y anti  $\beta$ 2 GPI, similar a los hallazgos de investigaciones previas (7), quienes encontraron una incidencia de 3 a 50%. El porcentaje de positividad fue mayor para IgG ACA (57,1%) en relación con IgM ACA (22,8%), existiendo una asociación significativa de ambos isotipos ( $p < 0.05$ ) con esta patología. El porcentaje de positividad de IgG ACA, en este estudio, coincide con un estudio realizado en India (45), usando la misma técnica e iguales criterios (Harris), mientras que el de IgM ACA es diferente a lo reportado en 342 casos de abortos espontáneos a repetición, en los cuales se encontraron 75% de positividad (5). Es posible que el hallazgo más significativo de este trabajo sea el porcentaje de positividad de AAF en embarazadas normales, que alcanza entre 4% y 24%, para ambos isotipos de anticuerpos. Del total de embarazadas normales, sólo tres

resultaron positivas para ambos isotipos de ACA, sin embargo lograron culminar su embarazo satisfactoriamente. La incidencia de AAF en embarazadas normales podría ser debido a la presencia no patológica de autoanticuerpos en la población normal (10%), una intensa exposición antigénica debido a la procedencia de las pacientes (bajos estratos socioeconómicos) o a un efecto hormonal propio del embarazo, en ausencia de alteraciones del embarazo.(49,50)

Al analizar los niveles séricos de los isotipos de inmunoglobulinas encontramos diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre IgG ACA ( $30,1 \pm 27,8$  U/mL) e IgM ACA ( $8,4 \pm 2,1$  mL) y significativas ( $p < 0.05$ ) entre IgM anti  $\beta 2$  GPI ( $19 \pm 10,5$  mL) e IgG anti  $\beta 2$  GPI ( $5,8 \pm 4,1$  mL). Otro hallazgo importante en este estudio es la asociación significativa ( $p < 0.01$ ) entre los niveles séricos de IgG ACA e IgM anti  $\beta 2$  GPI. Nuestros resultados confirman los hallazgos de otros autores en cuanto a la importancia de los AAF (ACA y anti  $\beta 2$  GPI) como posibles inductores de la pérdida del embarazo a repetición. (39,44)

Estos datos coinciden con estudios realizados en Venezuela (34 y 44), en los que se reporta una incidencia de ACA cercana a 30% en mujeres que presentaron pérdidas fetales, en comparación con 12%, en mujeres con títulos positivos que lograron un embarazo satisfactorio. Estos datos revelan que dentro de la población estudiada una porción de la misma a pesar de presentar títulos positivos para estos anticuerpos no presentaron complicaciones obstétricas, esto sin descartar la posibilidad de que en un futuro pudiesen presentar cualquier manifestación clínica del Síndrome antifosfolípídico.

Es de hacer notar que en el grupo de mujeres con embarazo normal que tenían niveles séricos positivos expresados en porcentajes de anti IgM e IgG ACA (11,1% vs 15,5%), fueron superiores a reportes previos (37) cuyos porcentajes de positividad no superaban el 3% para ambos isotipos. Sin embargo lograron culminar su embarazo satisfactoriamente. Es relevante el hecho que de 35 mujeres del grupo de pacientes que presentaron abortos espontáneos recurrentes, cinco pacientes (14,2%) tuvieron títulos positivos para ambos anticuerpos tanto anticuerpos anticardiolipinas (IgG) como de anticuerpos anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I (IgM), Isotipos en los cuales observamos diferencias significativas al asociarlos con la patología de abortos espontáneos a repetición y síndrome antifosfolípido.

Al ser considerada la  $\beta$ 2 GPI un cofactor necesario para que ejerzan su actividad los anticuerpos antifosfolipidos, en este estudio, los porcentajes de positividad de la anti  $\beta$ 2 GPI, en las embarazadas normales fue de 4,4% (2 pacientes) para IgM mientras 24,4% (11 pacientes) dieron positividad para la IgG. Se obtuvo un resultado diferente en las pacientes con abortos espontaneos a repetición, donde la mayor frecuencia relativa se observa en el isotipo IgM (42,8%) con respecto a 8,5% de IgG. Estos resultados difieren de lo informado en estudios previos (5), se observan los porcentajes de positividad casi equivalentes para ambos isotipos en 57 pacientes. Esta variabilidad en los resultados pudiera deberse a las diferencias en las muestras estudiadas ó ausencia de estandarización de las pruebas utilizadas. Razón por la cual, se determinaron los diferentes isotipos de anti  $\beta$ 2 Glicoproteina I, la cual representa un antígeno proteico asociado con frecuencia a la cardiolipina.

## CONCLUSIONES

En la presente investigación, donde se determinaron los Isotipos IgM, IgG de los Anticuerpos anticardiolipinas y anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I, en 45 mujeres con embarazos normales y en 35 mujeres con abortos espontáneos recurrentes, se puede concluir:

- Los niveles séricos del isotipo IgG Anticardiolipinas en mujeres con embarazos normales fue mayor que los niveles séricos del isotipo IgM en el mismo grupo de estudio no existiendo asociación significativa entre ellas.
- Los isotipos IgM e IgG de la anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I en las mujeres con embarazos normales presentaron un comportamiento similar, al observarse un mayor nivel sérico del isotipo IgG sobre el IgM, no existiendo asociación significativa entre ellos.
- La frecuencia relativa de positividad del isotipo IgM ACA en las pacientes con embarazos normales fue mayor que la observada para los isotipos IgM de anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I, encontrándose una asociación significativa entre ellos.
- La frecuencia de positividad del isotipo IgG ACA en las mujeres con abortos espontáneos a repetición fue mayor que la del isotipo IgM ACA, existiendo una asociación significativa entre los niveles serológicos elevados del isotipo IgG ACA y la manifestación de abortos espontáneos.
- La frecuencia de positividad del isotipo IgM anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I en las mujeres con abortos espontáneos a repetición fue mayor que la

observada para IgG anti  $\beta$ 2 Glicoproteína I, existiendo una asociación significativa entre el isotipo IgM y la manifestación de abortos.

## Bibliografía.

1. Palmore K, Stites D, Terr A, Parslow T. (1998). **Inmunología básica y clínica**. Manual moderno, Méjico, 744-756.
2. Mora S, Corado J. (2003) **Inmunología actual**. Dirección de Medios y publicaciones Universidad de Carabobo, Venezuela, 287-304.
3. Beer A, Kwak J, Ruiz J. (1996) **Reproductive immunology**. Editorial Mosby, England, 1537-1550.
4. Palmore K, Dudley D, Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden, J. (2001). **Inmunología básica y Clínica**. Manual Moderno, Méjico, 649-669.
5. Rotes NS, Lyden TW, Vogt E. Antiphospholipid antibody and placental development. *Immunobiology of reproduction 1994; 27: 25-42*.
6. Ober C, Stick T, Van der Ver K. MHC compatibility in aborted fetuses and term infants of copules with recurrent spontaneous abortion. *Journal Reproduction Immunology 1993; 25: 195-200*
7. Buyon J. The effects of pregnancy on autoimmune disease. *Journal of Leukocyte Biology 1998; 63: 281-287*
8. Gill T, Ho H, Kanbour-shakir A. MHC-linked genes and their roles in growth and reproduction. *Immunobiology of Reproduction 1994; 52: 368-375*.

9. Bates S, Ginsberg J. Thrombosis in Pregnancy. *Hemostasis and Trombosis* 1997; 78: 335-343.
10. Hernandez J. (1997) **Tratado de Obstetricia y Ginecología**. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 67-86.
11. Der Parsehian S. Síndrome antifosfolípidos en obstetricia y ginecología. *Revista Hospital Materno infantil "Ramón Sarda"* 1999; 18:2-4.
12. Mc Intyre J. Antiphospholipid antibodies in implantation failures. *Am J Reprod Immunolo* 2003; 49 : 221-229.
13. Rote N, Stetzer, B. Autoimmune disease as a cause of reproductive failure. *Clin Lab Med*.2003; 23: 265-273.
14. Wilson W, Gharavi A, Koike T. International consensus stament on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*1999; 42:1309-1311
15. Lockshim M. Antiphospholipid antibody. *Jama* 1997;19: 1549-1551.
16. Piarangeli S, Gharavi A, Harris N. Testing for antiphospholipid antibodies. Problems and solutions. *Clinical Obstetric and Ginecology*. 2001; 44: 48-57.
17. Perez Requejo, J. (1995). **Hematología**. Disinlimed, Venezuela, 1083-1088.
18. Di Simoni N, Raschi E, Testoni C, Castellani R, D'Asta M, Shi T, Krilis A, Caruso A, Moroni P. Pathogenic role of  $\beta$ 2-glicorotein I

- antibodies in antiphospholipid associated fetal loss. *Ann Rheumatic Disease* 2005; 64: 462-467.
19. Myounes B, Mc Curdy D. The Antiphospholipid Syndrome, immunological and clinical aspect. *Rheumatol* 2000; 27: 20-28.
  20. Aguilar F, Cuesta L. Anticuerpos Antifosfolipidos en población pediátrica asintomática. *Anales españoles de pediatría* 2001; 54: 444-449.
  21. Roubay R. Immunology of the Antiphospholipid antibody Síndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1444-1454.
  22. Chicago Medical School 1999. Antiphospholipid antibodies.[Resumen en línea].Reproductive Medicine Program, University of Health Science. Disponible: <http://www.medschool.northwestern.edu/research>
  23. Reddel S, Krilis S. Testing and clinical significance of cardioliipin antibodies. Clinical and Diagnostic Laboratory. *Immunology* 1999; 6: 775-782.
  24. Barburi T, Finazzi G. Clinical trials on antiphospholipid Syndrome. *Lupus*1994; 3: 303-308.
  25. Horbach D, Oort E, Donders R. Lupus Anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus eritematosus. *Thombosis and Haemostasis* 1996; 8: 916-924
  26. Carlos J, Castro-Sansores R, Renan A, Góngora-Bianchi. Síndrome primario de Anticuerpos Antifosfolípidos. *Biomed* 1999; 8: 84-97

27. Galli M, Fináis G, Barburi T. Antiphospholipids Antibodies. *Thombosis and Haemostasis* 1997; 78: 75-78
28. Atsumi T, Khamashta M, Amengual O, Mackie I, Donohoe S, Ichikawa K. Binding of Anticardiolipin Antibodies to Protein C and  $\beta$ 2-Glicoprotein I, a posible mechanism in the inhibitory effect of Antiphospholipid Antibodies on the Protein C system. *Clinical Experimental Immunol* 1998; 112: 325-333.
29. Mendoza G, Aller J, Pagés G. (1999). **Obstetricia Moderna**. Mc Graw-Hill Interamericana, Venezuela, 31-54.
30. Sargent I. Maternal and fetal immune response during pregnancy. *Exp Clin Immunology* 1993;. 10: 85-94.
31. Haller H, Radillo O, Rukavina D. An immunohistochemical study of leukocytes in human endometrium, first and third trimester basal desidua. *J Reproduction Immunology* 1993; 23: 41-49.
32. Hunt J. Citokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J Reprod Immunol* 1989; 16: 1-7.
33. Zuckermann F, Head J. Murine trofoblast resist cell-mediated lysis. *Cell Immunol* 1998; 116: 274-285.
34. Flores M., Chacón M, Pacheco M, Castro L, Varela I, Valera C, Zambrano B. Anticuerpos Antifosfolípidos y niveles de  $\beta$ 2-microglubulina en un grupo de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. *Salus* 1999; 3: 32-38.

35. Levine S, Brey R, Joseph A. Risk of recurrent thromboembolic events in patients with focal cerebral ischemia and antibodies antiphospholipid. *Stroke* 1992; 23: 29-32.
36. Abu-Shakra M, Gladman D, Urowitz M, Farewell V. Anticardiolipin Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus: clinical and Laboratory correlation. *Am Journal Medicine* 1995; 99: 624-628.
37. Yasuda M, Takakuwa K, Tokunaga A, Tanaka K. Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 555-559.
38. Magid M, Kaplan C, Sammaritano L, Peterson M, Druzin M, Lockshin M. Placental pathology in systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Am Obstet Gynecol* 1998; 179:226-234.
39. Eisenberg G. Antiphospholipid Syndrome: the reality and implications. *Hospital Practice* 1992; 15:119-131
40. Shorer A, Duane P, Woods V. Some antiphospholipid antibodies inhibit phospholipase A2 activity. *J Lab Clin Med* 1992;120: 67-77.
41. Rand J, Wu X, Guller S, Scher J, Andree H, Lockwood C, Harpel P.. Pregnancy loss in the antiphospholipid antibody syndrome a possible thrombogenic mechanism. *B Eng J Med* 1997; 337: 154-160.
42. Shabita S, Harpel P, Gharavi A. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III thrombin complex. *Blood* 1994; 83: 2532-2540.

43. Simamtov R, La Sala J, Lo S. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96:2211-2219.
44. Ramirez Alvarado M, Oñate de Gonzalez N, Gonzalez-Amaro C, Gonzalez-Cintra C, Sanoja-Breña A. Anticuerpos antifosfolípidos en pacientes con pérdidas del embarazo y pacientes con infertilidad primaria. *Salus* 2005; 9: 28-31
45. Velayuthaprabhu S, Archunan G. Evaluation of cardiolipin antibodies and antiphosphatidylserine antibodies in women with recurrent abortion. *Indian Journal Medical Sciences* 2005;59:347-352.
46. Fialova L, Mikulikova L, Matous-Malbohan I, Benesova O., Zwinger A. Prevalence of various antiphospholipid antibodies in pregnancy. *Physiol Res* 2000;49:299-305
47. Hanly J. Antiphospholipid syndrome: an overview. *Canadian Medical Association Journal* 2003; 168: 13-15
48. Rand J. Molecular Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *Circulation research* 2002;90:29-37.

49. Koleva R, Chernev T, Karaq'ozova Zh, Dimitrova V. Antiphospholipid Syndrome and pregnancy. *Akush Ginecol* 2004; 43: 36-42.
50. Kdous M, Hachicha R, Lombroso R, Gallardo G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy. *Tunis Med* 2005; 83:1-5

