

INDICE	N° Página.
1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1 Síndrome Antifosfolípidos.....	12
4.2 Generalidades de Anticuerpos Antifosfolipidos (aFl).	15
4.2.1 Anticuerpos Anti- β_2 GPI.	20
4.3 Mecanismos trombogénicos.....	25
4.3.1 Alteración de reacciones hemostáticas.	25
4.3.2 Activación Celular.....	27
4.3.2.1 Activación plaquetaria.....	27
4.3.2.2 Activación de Células Endoteliales.	28
4.3.2.3 Activación de Monocitos....	30
4.3.2.4 Alteración de Células trofoblásticas.	31
4.3.3 Activación del complemento.....	31

5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1	Protocolo de inmunización.....	34
5.2	ELISA anti- β_2 GPI.....	36
5.3	Purificación anticuerpos anti β_2 GPI.....	37
	5.3.1 Cromatografía de afinidad para purificación de IgG	37
5.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).	38
5.5	Western Blot.....	40
5.6	Agregación plaquetaria.....	44
	5.6.1 Agonista plaquetario.....	44
	5.6.2 Toma de muestra.....	44
	5.6.3 Obtención de concentrado plaquetario.	45
	5.6.4 Protocolo para curvas de Agregación plaquetaria.	45
	5.6.5 Análisis estadísticos de los resultados obtenidos.	46
6.	RESULTADOS.....	47
6.1	ELISA Anti- β_2 GPI a plasma de ratones inmunizados.	47
6.2	Cromatografía de afinidad para purificación de IgG,	48
6.3	Cromatografía de afinidad para purificación de IgG anti- β_2 GPI.	49
6.4	Western Blot.....	53
6.5	Agregación plaquetaria.....	55

7. DISCUSIÓN.....	60
8. CONCLUSIÓN.....	63
9. BIBLIOGRAFÍA.....	64

INDICE DE TABLAS

N° Página.

TABLA N°1: ANTÍGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS	15
TABLA N°2: VOLUMENES UTILIZADOS DE LOS REACTIVOS PARA PREPARAR LAS SOLUCIONES DEL GEL CONCENTRADOR Y DEL GEL SEPARADOR.	37
TABLA N°3: DATOS DE LAS CURVAS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA, INDUCIDO POR ADP (2 μ M).	58

INDICE DE FIGURAS:

FIGURA N°1. ESTRUCTURA DE LA β_2 -GLICOPROTEÍNA I (β_2 GPI).	17
FIGURA N°2: REPRESENTACIÓN ESTRUCTURAL DE LA β_2 GPI DE PLASMA HUMANA	20
FIGURA N°3: REPRESENTACIÓN ESTRUCTURAL DEL DOMINIO V DE LA PROTEÍNA β_2 GPI.	21
FIGURA N°4: INTERACCIONES DE LA SUPERFICIE CELULAR DE β_2 GLICOPROTEÍNA I	32
FIGURA N°5: MODELO DE RATÓN UTILIZADO EN ENSAYOS	33

TIPO C57BL/6.

FIGURA N°6: MÉTODO DE INMUNIZACIÓN INTRAPERITONEAL DE RATONES C57BL/6.	34
FIGURA N° 7: SISTEMA UTILIZADO PARA LA INMUNOTRANSFERENCIA A LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA.	40
FIGURA N° 8: ESQUEMA DISPOSICIÓN CASSETTE DE TRANSFERENCIA.	41
FIGURA N° 9: GRÁFICO ABSORBANCIAS DE 11 RATONES C57BL/6 INUMNIZADOS CON β_2 GPI (R1 A R11) Y DOS RATONES CONTROLES (C1 Y C2).	46
FIGURA N° 10: PROMEDIO DE ABSORBANCIAS OBTENIDAS DESDE PLASMA DE RATONES INMUNIZADOS VERSUS PLASMA DE RATONES CONTROLES.	47
FIGURA N°11: GRÁFICO FRACCIONES ELUIDAS DE LA COLUMNA PROTIENA A SEFAROSA V/S ABSORBANCIA DE CADA FRACCIÓN, LEIDAS A 405 nm.	48
FIGURA N° 12: GRÁFICO FRACCIONES ELUIDAS DE LA COLUMNA DE AFNIDAD DE BROMURO DE CIANOGENO V/S ABSORBANCIA DE CADA FRACCIÓN, LEIDAS A 405nm.	50
FIGURA N° 13: GRÁFICO FRACCIONES CONCENTRADAS DE LA COLUMNA DE AFNIDAD DE BROMURO DE CIANOGENO V/S	51

ABSORBANCIA DE CADA CONCENTRADO, LEIDAS A 405nm.

FIGURA N° 14: MEMBRANA DE NITROCELULOSA TEÑIDA CON ROJO PONCEAU 0,1% A PARTIR DE GEL DE ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA. 52

FIGURA N° 15: GEL DE ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA TEÑIDO CON AZUL DE COOMASIE G250 LUEGO DE LA TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA. 53

FIGURA N° 16: REVELADO DE WESTERN BLOT. 53

FIGURA N°17: AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI β_2 GPI, CONTROL NEGATIVO, (SUERO FISIOLÓGICO 0,9%) ADP 2 μ M. 54

FIGURA N°18: CONTROLES AGREGACIÓN PLAQUETARIA, CONTROL NEGATIVO, (SUERO FISIOLÓGICO 0,9%) ADP 8 μ M. 54

FIGURA N°19: AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI β_2 GPI, CONTROL NEGATIVO, (SUERO FISIOLÓGICO 0,9%) ADP 2 μ M. 55

FIGURA N°20: AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI β_2 GPI, PREINCUBADOS CON ÁCIDO FERÚLICO, CONTROL NEGATIVO, (SUERO FISIOLÓGICO 0,9%) ADP 2 μ M. 55

FIGURA N°21: AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI β_2 GPI, CONTROL NEGATIVO, PREINCUBADOS CON ÁCIDO P-CUMARÍNICO (SUERO FISIOLÓGICO 0,9%) ADP 2 μ M.	56
FIGURA N°22: AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI β_2 GPI, CONTROL NEGATIVO, PREINCUBADOS CON ADENOSINA (SUERO FISIOLÓGICO 0,9%) ADP 2 μ M.	57
FIGURA N°23 AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI β_2 GPI, PREINCUBADOS CON ÁCIDO CAFEICO, CONTROL NEGATIVO, (SUERO FISIOLÓGICO 0,9%) ADP 2 μ M.	57