

Posible papel de la $\beta 2$ glicoproteína I y la apoptosis durante la diseminación intermolecular de epítopes en lupus eritematoso sistémico

Possible role of $\beta 2$ -glycoprotein I and apoptosis during intermolecular epitope spreading in systemic lupus erythematosus

Mauricio Restrepo E.¹, Carolina Muñoz G.¹, Adriana L. Vanegas G.¹, Luis Alonso González¹, Gloria María Vásquez D.¹

RESUMEN

Palabras clave: lupus eritematoso sistémico, apoptosis, micropartículas, $\beta 2$ glicoproteína I, diseminación del epítipo.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad caracterizada por la pérdida de la tolerancia hacia antígenos propios que conlleva a la aparición de autoanticuerpos contra antígenos nucleares y daño de órganos asociado. Durante la apoptosis se expone al sistema inmune a múltiples antígenos nucleares y se piensa que alteraciones en la remoción de cuerpos apoptóticos pueden iniciar o perpetuar una respuesta autoinmune. Otra fuente de material nuclear expuesto al medio extracelular son las denominadas micropartículas, las cuales son liberadas de diferentes células no solo durante la apoptosis sino también durante la activación celular o el estrés mecánico. Se ha demostrado que los pacientes con LES presentan autoanticuerpos varios años antes de la fase clínica de la enfermedad, y esta aparición de autoanticuerpos tiende a seguir un curso predecible, con acumulación progresiva de autoanticuerpos específicos. Esta aparición consistentemente ordenada de autoanticuerpos, precediendo por varios años la aparición de la enfermedad clínica, apoya fuertemente las teorías de diseminación de epítopes en LES humano. Varios modelos murinos han tratado de reproducir la enfermedad humana utilizando cuerpos apoptóticos pero sin resultados contundentes. Un reciente modelo animal logra reproducir más fielmente la secuencia de autoanticuerpos y las manifestaciones clínicas del LES al utilizar a la $\beta 2$ GP-I como inmunógeno potenciado por una respuesta de célula T inducida por lipopolisacárido. Las micropartículas, rodeadas de fosfatidilserina y cargadas de material nuclear incluyendo DNA extracelular antigénicamente activo, son asimismo candidatas ideales para servir de plataforma para la diseminación de epítopes en un medio inflamatorio, con la posterior aparición secuencial de autoanticuerpos específicos patogénicos.

Recibido:
18 de octubre de 2011.

Aceptado:
15 de febrero de 2012.

SUMMARY

Key words: systemic lupus erythematosus, apoptosis, microparticles, $\beta 2$ glycoprotein I, epitope spreading.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a disease characterized by loss of tolerance to self-antigens leading to the development of autoantibodies against nuclear antigens and organ damage. During apoptosis, immune system is exposed to multiple nuclear antigens and is thought that alterations in the removal of apoptotic bodies could start or perpetuate an autoimmune response. Another source of nuclear material exposed to extracellular medium are called microparticles, which are released from various cells not only during apoptosis but also during cell activation or mechanical stress. It has been shown that patients with SLE already have autoantibodies several years before clinical phase of disease, and this appearance of autoantibodies tends to follow a predictable course, with progressive accumulation of specific autoantibodies. This steadily orderly appearance of autoantibodies preceding for several years the onset of clinical disease strongly supports theories of spreading epitopes in human SLE. Several mouse models have tried to replicate the human disease using apoptotic bodies but without conclusive results. A recent animal model can reproduce more closely the sequence of autoantibodies and clinical manifestations of SLE using the $\beta 2$ -glycoprotein I ($\beta 2$ GP-I) as an immunogen powered by a lipopolysaccharide induced T cell response. Microparticles, surrounded by phosphatidylserine and nuclear material loaded including antigenically active extracellular DNA, are also ideal candidates to serve as a platform for the epitopes dissemination in an inflammatory environment, with subsequent sequential appearance of pathogenic specific antibodies.

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés al momento de la redacción del manuscrito.

1. Sección de Reumatología. Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Correspondencia:
Mauricio Restrepo E.: mauresco90@hotmail.com

Lupus eritematoso sistémico y síndrome antifosfolípido

El LES es una enfermedad del tejido conectivo, autoinmune, sistémica, con un amplio rango de manifestaciones clínicas. Puede aparecer en personas de cualquier edad, raza o sexo, pero predomina en mujeres en edad reproductiva. Usualmente se convierte en una enfermedad crónica con períodos de exacerbación y puede poner en peligro la vida cuando afecta órganos vitales. Algunos factores tales como la luz solar o medicamentos pueden desencadenar la enfermedad, sin embargo la etiología y la patogénesis tienen bases complejas y en permanente investigación.¹⁻³

Aunque el LES puede ser considerado un conjunto de enfermedades relacionadas que presentan un espectro amplio de manifestaciones clínicas, una característica en común es la presencia de diversos anticuerpos dirigidos contra varios antígenos propios. Tales anticuerpos pueden ir desde aquellos que son muy específicos para LES como los anti-Smith (anti-Sm) y los anti-DNA de doble cadena (anti-DNAs), hasta anticuerpos que son inespecíficos para LES ya que pueden estar presentes en otros escenarios clínicos diferentes.⁴⁻⁶ Los anticuerpos antifosfolípidos (aPL) son algunos de los autoanticuerpos que pueden detectarse tanto en presencia como en ausencia de LES, e incluso en personas sanas. Los aPL también pueden encontrarse en síndrome antifosfolípido primario, infecciones virales, y en otras enfermedades autoinmunes.⁷

Aunque la patogénesis del LES sigue siendo desconocida, los modelos actuales se basan en el fenómeno de la apoptosis para explicar de alguna manera como el sistema inmune reconoce predominantemente antígenos intracelulares. La apoptosis es un proceso que lleva a la destrucción ordenada de células, evitando la liberación del contenido intracelular en el microambiente extracelular donde tendría un poderoso efecto inflamatorio. Bajo circunstancias normales los desechos apoptóticos son fagocitados por macrófagos durante la fase temprana de la muerte celular apoptótica sin inducir inflamación ni activación del sistema inmune.⁸⁻¹⁰ Los autoantígenos son liberados tanto por células necróticas como por cé-

lulas apoptóticas. Se han descrito defectos en la depuración de células apoptóticas en pacientes con LES, y estos defectos podrían incrementar la exposición del sistema inmune a antígenos propios debido a la incapacidad para eliminarlos de una manera efectiva.^{11,12}

Otra fuente potencial de antígenos intracelulares son las micropartículas (MP), las cuales son pequeñas vesículas rodeadas de membrana que miden entre 0,1 y 1 micra de diámetro. Estas MP son liberadas de las células durante los procesos de activación celular y muerte celular. Como organelas extracelulares, las MP contienen constituyentes nucleares y citoplasmáticos que están envueltos por membranas plasmáticas. El rico contenido de moléculas biológicamente activas, incluyendo receptores de membrana, permite que las MP posean propiedades protrombóticas y proinflamatorias que pueden promover respuestas inmunes innatas y adaptativas.¹³⁻¹⁷

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune caracterizada por trombosis vasculares recurrentes y pérdidas gestacionales, asociadas con autoanticuerpos contra una variedad de fosfolípidos y proteínas de unión a fosfolípidos.¹⁸⁻²⁰ El diagnóstico de SAF requiere la presencia de al menos un criterio clínico más un criterio de laboratorio.^{21,22} Los criterios de laboratorio aceptados durante la última reunión de consenso incluyen la demostración de la presencia persistente de anticoagulante lúpico, anticuerpos anticardiolipinas IgG o IgM, o anticuerpos anti- $\beta 2$ glicoproteína I IgG o IgM²³.

Se ha planteado al SAF como una variedad del espectro del LES debido a múltiples puntos de concordancia y similitudes clínicas y de laboratorio. En un porcentaje importante los pacientes con LES muestran aPL y muchas veces también presentan todo el espectro de manifestaciones de un SAF. Algunas veces puede aparecer un LES en pacientes con SAF previamente no relacionado con ninguna enfermedad autoinmune. La distinción entre SAF primario y SAF relacionado con LES puede ser difícil y a veces parece una convención bastante artificial.²⁴⁻³⁰

Años antes de la fase clínica del LES aparecen autoanticuerpos con acumulación progresiva de autoanticuerpos específicos:

En pacientes con LES se ha podido demostrar la presencia de autoanticuerpos muchos años antes del diagnóstico de la enfermedad. Esta aparición de autoanticuerpos tiende a seguir un curso predecible, con acumulación progresiva de autoanticuerpos específicos. En un estudio se observó que los anticuerpos antinucleares (ANA), los aPL, los anti-Ro y los anti-La estuvieron presentes antes que los anti-Sm y los anti-RNP (un promedio de 3,4 años antes del diagnóstico frente a 1,2 años, $p = 0,005$).^{31,32}

Esta aparición consistentemente ordenada de autoanticuerpos precediendo por varios años la aparición de la enfermedad clínica apoya fuertemente las teorías de diseminación de epítopes en LES humano. Existe consenso general de que, a medida que la enfermedad progresa, la respuesta autoinmune se disemina para involucrar no solo un número mayor de autoantígenos, sino también más epítopes dentro de cada autoantígeno. Este concepto de una diseminación secuencial de la respuesta autoinmune, que lleva a la aparición ordenada de autorreactividad contra múltiples autoantígenos, se conoce como diseminación del epítope.³³

La diseminación del epítope comprende el reconocimiento adquirido de nuevos epítopes dentro de la misma molécula (diseminación intramolecular del epítope), así como de nuevos epítopes alojados en proteínas que están asociadas en el mismo complejo macromolecular, tal como el nucleosoma, el espliceosoma y el ribosoma (diseminación intermolecular del epítope).³⁴⁻³⁶

La apoptosis tiene el potencial de generar autoantígenos que rompen la tolerancia cuando este proceso de eliminación de desechos es defectuoso

La apoptosis es fundamental para el funcionamiento biológico normal de organismos multicelulares. Este proceso de muerte celular es complejo y comprende múltiples etapas y participantes moleculares. Una característica clave de la apoptosis es la degradación de proteínas del citoesqueleto por medio de proteasas

aspartato específicas, las cuales inducen el colapso de componentes subcelulares. Otras características fundamentales son la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de burbujas de membrana plasmática.³⁷

La apoptosis normalmente resulta en una rápida captación y depuración no inflamatoria de células apoptóticas y sus contenidos. Sin embargo, existe evidencia creciente de que los cambios proteolíticos y morfológicos que ocurren durante este proceso tienen el potencial de generar autoantígenos que rompen la tolerancia cuando este proceso de eliminación de desechos es defectuoso.^{38,39} Durante la apoptosis los contenidos celulares se redistribuyen y se producen burbujas de membrana sobre la superficie celular. Muchos de los autoantígenos implicados en el LES son empaquetados y concentrados sobre estas burbujas y pueden así ser accesibles a los autoanticuerpos en los diferentes órganos blanco.^{11,40}

Además de permitir el acceso de los autoanticuerpos a los antígenos intracelulares, la redistribución celular que ocurre durante la apoptosis puede generar complejos potencialmente inmunogénicos sobre la superficie de la célula apoptótica.⁴¹ Por ejemplo, la fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido de membrana cargado negativamente que está normalmente distribuido sobre la porción intracelular de la membrana. De manera temprana durante la apoptosis la PS se redistribuye hacia la membrana externa donde se vuelve disponible para formar complejos con proteínas de unión a fosfolípidos tales como la β 2GP-I y la anexina V. Tales complejos pueden ser inmunogénicos y, si son removidos y procesados de manera inapropiada, pueden terminar en la generación de anticuerpos antifosfolípidos.^{11,40}

La β 2GP-I es el principal antígeno unido por los anticuerpos demostrables en el SAF. Se trata de una proteína de cadena única con 326 aminoácidos y un peso molecular de 54,2 kDa. La β 2GP-I consiste de cinco dominios o secuencias repetidas, al igual que otros miembros de la superfamilia de proteínas de control del complemento. Los primeros cuatro dominios tienen

sesenta residuos de aminoácidos, incluyendo cuatro cisteínas cada uno. El quinto dominio tiene una región conservada cargada positivamente (múltiples lisinas) entre las cisteínas 281 y 288 que es crítica para la unión a los fosfolípidos⁴².

La $\beta 2$ GP-I se produce en el hígado y la placenta. El nivel sérico promedio de $\beta 2$ GP-I es de 200 mg/l, lo cual la convierte en una de las proteínas más abundantes en el suero humano. Circula en el plasma principalmente en forma libre, aunque también circula unida a lípidos. Sus niveles plasmáticos pueden aumentarse durante infecciones crónicas. En infecciones agudas se comporta como un reactante de fase aguda negativo, disminuyendo junto con la albúmina.⁴³⁻⁴⁵

La $\beta 2$ GP-I se une a fosfolípidos aniónicos sin la necesidad de iones de calcio. La unión se logra a través de interacciones de la región rica en lisina y el asa hidrofóbica móvil en el dominio 5 de la proteína. Aunque la función fisiológica exacta de la $\beta 2$ GP-I en individuos sanos es aún desconocida, se cree que, en condiciones normales, la proteína ejerce un efecto anticoagulante al desplazar varias proteínas de la coagulación de los sitios aniónicos de los fosfolípidos.⁴⁵

La fagocitosis de los macrófagos es inducida por la unión de la $\beta 2$ GP-I a fosfolípidos aniónicos, aún en ausencia de aPL, lo cual sugiere que esta proteína funciona como un marcador para las células necróticas y apoptóticas.⁴⁵

La apoptosis puede ser desencadenada a través de dos vías distintas, las cuales convergen corriente abajo para generar caspasas efectoras activadas que finalmente llevan a la fragmentación del DNA y a la exposición de la fosfatidilserina. Sin importar el origen del disparador, la remoción de las células apoptóticas del sistema circulatorio antes de que ocurra lisis celular o necrosis es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis. El reconocimiento de las células moribundas es iniciado por la aparición de ligandos específicos sobre la superficie celular que se unen a los receptores de los fagocitos ya sea en forma directa o en forma indirecta a través de proteínas puente, entre las que sobresale la $\beta 2$ GP-I.⁴⁶

Las células apoptóticas y las micropartículas pueden constituirse en la plataforma sobre la cual ocurre la diseminación del epítipo

Los cambios en la membrana que llevan a un aumento de la adhesividad y a la captura por parte de los fagocitos incluyen la exposición de anexina I, alteraciones en la composición de los lípidos como resultado de la acumulación de productos de peroxidación lipídica, y exposición de PS sobre la superficie celular. De estos, la pérdida de la asimetría de lípidos en la membrana plasmática y la consecuente aparición de PS sobre la superficie celular han sido reportados como los cambios más prominentes en el fenotipo de superficie de las células apoptóticas.⁴⁶

Los fagocitos reconocen la PS de la superficie de la célula por unión directa mediante *scavengers* y receptores de PS, o mediante interacción indirecta a través de proteínas puente que ligan la PS. Mediante el uso de varios modelos in vivo, se ha presentado evidencia de que la $\beta 2$ GP-I endógena se une a células apoptóticas in situ sin importar cuál sea la vía disparadora. Esta información proporciona evidencia de un papel fisiológico de esta proteína en el reconocimiento y la remoción de células apoptóticas in vivo.⁴⁶⁻⁴⁸

Muchos de los autoantígenos en LES pueden encontrarse sobre la superficie de los cuerpos apoptóticos y de las MP, sugiriendo que ellos pueden constituirse en las plataformas sobre las cuales ocurre la diseminación del epítipo. Normalmente la diseminación intermolecular de epítipes ocurre en moléculas cuya asociación o interacción física permite su captación simultánea por células presentadoras de antígenos (APC). La captación de una célula apoptótica o una MP por una APC resultaría en la presentación de todos los antígenos dentro o sobre la superficie de la célula apoptótica o la MP por parte de la APC. De esta manera, las células apoptóticas y las MP sirven como plataformas que conectan físicamente múltiples autoantígenos que son eventualmente blanco de la respuesta autoinmunitaria.³⁴

¿Cómo inducir LES en ratones?: nuevo modelo animal

A pesar de esta fuerte conexión entre las células apoptóticas y el LES, la inmunización de ratones normales con células necróticas no ha podido reproducir la patología renal y la multiplicidad de autoanticuerpos observados en los pacientes con LES.^{49,50} En esos estudios, la inmunización con células apoptóticas indujo principalmente autoanticuerpos de isotipo IgM (ANA, anticardiolipinas y anti-DNA de cadena sencilla), sin anti-DNAs detectable ni evidencia histológica de nefritis.

Se ha postulado que la falla para inducir enfermedad franca en estos modelos animales es atribuible al uso mismo de células apoptóticas, ya que aunque representan una plataforma donde están contenidos casi todos los autoantígenos relevantes en el LES, también existe clara evidencia de que las células apoptóticas pueden suprimir la respuesta inmune, especialmente a través de la liberación de citoquinas antiinflamatorias por parte de las células fagocíticas.

Un modelo diferente muestra que la inducción de una respuesta fuerte y persistente contra la proteína de unión a células apoptóticas (β 2GP-I) en presencia de lipopolisacárido resulta tanto en la diseminación de epítopes contra múltiples autoantígenos dirigidos en LES como en el desarrollo de glomerulonefritis. En este modelo además de seleccionar un inmunógeno capaz de dirigirse contra las células apoptóticas y sus múltiples antígenos, fue necesario generar una fuerte y persistente respuesta de célula T contra el inmunógeno incitante.³³

Finalmente, los autores de este novedoso modelo proponen que para inducir un LES múrido se requerirían los siguientes pasos: en primer lugar usar un inmunógeno, por ejemplo la β 2GP-I, que aproveche a las células apoptóticas

como superficies para lograr la diseminación del epítope, pero que al mismo tiempo logre evadir la inmunosupresión asociada con las células apoptóticas, y en segundo lugar lograr la inducción de una fuerte y persistente respuesta de célula T contra el inmunógeno incitante, por ejemplo mediante la adición de LPS.

Conclusiones

La apoptosis es el principal proceso de muerte celular programada. Las células que mueren secretan señales que permiten su reconocimiento e ingestión por parte de los macrófagos, de una manera eficiente y silenciosa. Las células liberan durante su activación o apoptosis pequeñas vesículas llamadas MP que contienen material nuclear y citoplasmático. La β 2GP-I es una proteína puente que se une a la PS expuesta por los cuerpos apoptóticos y las MP y facilita su depuración por los macrófagos. La presencia de anticuerpos anti- β 2GP-I podría generar trastornos en la usualmente rápida y eficiente depuración de células apoptóticas y MP. La respuesta inmune desencadenada por la interacción anti- β 2GP-I - β 2GP-I predominará donde haya más PS proveniente de más cuerpos apoptóticos o MP no depurados, y las superficies de estos remanentes se constituirán en la plataforma para la diseminación de epítopes en un medio inflamatorio, con la posterior aparición secuencial de autoanticuerpos específicos patogénicos. Los anti- β 2GP-I pueden originarse por la sobresaturación del sistema inmune ocasionada por deficiencias en la apoptosis normal, como se ha demostrado en pacientes con LES. Aunque la aparición de los anti- β 2GP-I puede no ser el evento inicial en la patogénesis del LES, ellos podrían representar un eslabón que conecta la apoptosis anómala con la diseminación del epítope para antígenos nucleares expuestos sobre las superficies de los cuerpos apoptóticos y las MP.

Referencias

1. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GRV. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007;369:587-596.
2. Rahman A, Isenberg DA. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2008;358:929-939.
3. Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365:2110-2121.

4. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Auto-antibody Explosion in Systemic Lupus Erythematosus: More than 100 Different Antibodies Found in SLE Patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:501-537.
5. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: Antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002;47:434-444.
6. Kavanaugh AF, Solomon DH. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: Anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum* 2002;47:546-555.
7. McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Rubertone MV, et al. The Prevalence, Onset, and Clinical Significance of Antiphospholipid Antibodies Prior to Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:1226-1232.
8. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481-490.
9. Gualtierotti R, Biggioggero M, Penatti AE, Meroni PL. Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2010;10:3-7.
10. Means TK, Luster AD. Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1062:242-251.
11. Navratil JS, Ahearn JM. Apoptosis, Clearance Mechanisms, and the Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:191-198.
12. Yassin LM, Rojas M, Ramírez LA, García LF, Vásquez G. Monocyte activation by apoptotic cells removal in systemic lupus erythematosus patients. *Cell Immunol* 2010;266:52-60.
13. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiol* 2005;20:22-27.
14. Pisetsky DS, Gauley J, Ullal AJ. Microparticles as a source of extracellular DNA. *Immunol Res* 2011;49:227-234.
15. Ardoin SP, Pisetsky DS. The role of cell death in the pathogenesis of autoimmune disease: HMGB1 and microparticles as intercellular mediators of inflammation. *Mod Rheumatol* 2008;18:319-326.
16. Ullal AJ, Reich CF 3rd, Clowse M, Criscione-Schreiber LG, Tochacek M, Monestier M, et al. Microparticles as antigenic targets of antibodies to DNA and nucleosomes in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2011;36(3-4):173-180.
17. Pisetsky DS, Lipsky PE. Microparticles as adjuvants in the pathogenesis of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(6):368-372.
18. Mejía-Romero R, García-Carrasco M, Galarza-Maldonado C, Santos P, Mendoza-Pinto C, Escárcega RO, et al. Primary antiphospholipid syndrome in Latin American mestizo patients: clinical and immunologic characteristics and comparison with European patients. *Clin Rheumatol* 2008;27:891-897.
19. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome. Clinical and Immunologic Manifestations and Patterns of Disease Expression in a Cohort of 1,000 Patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:1019-1027.
20. de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(4):192-199.
21. Baker WF, Bick RL. The Clinical Spectrum of Antiphospholipid Syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008;22:33-52.
22. Sangle NA, Smock KJ. Antiphospholipid antibody syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(9):1092-1096.
23. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.
24. Grossman JM. Primary versus secondary antiphospholipid syndrome: is this lupus or not? *Curr Rheumatol Rep* 2004;6:445-450.
25. Rottem M, Krause I, Fraser A, Stojanovich L, Rovensky J, Shoenfeld Y. Autoimmune hemolytic anaemia in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2006;15:473-477.
26. Comellas-Kirkerup L, Hernández-Molina G, Cabral AR. Antiphospholipid associated thrombocytopenia or autoimmune hemolytic anemia in patients with or without definite primary antiphospholipid syndrome according to the Sapporo revised classification criteria: a 6-year follow-up study. *Blood* 2010;116:3058-3063.
27. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009;68: 1030-1035.
28. Ramos-Casals M, Campoamor MT, Chamorro A, Salvador G, Segura S, Botero JC, et al. Hypocomplementemia in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: prevalence and clinical significance in 667 patients. *Lupus* 2004; 13:777-783.

29. Builes CE, Durango IC, Velásquez CJ. Lupus eritematoso sistémico con anticuerpos antinucleares negativos y anemia hemolítica. *Acta Med Colomb* 2010;35:179-182.
30. Restrepo M. Con relación al artículo: «Lupus eritematoso sistémico con anticuerpos antinucleares negativos y anemia hemolítica». Cartas al Editor. *Acta Med Colomb* 2011;36:52.
31. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:1526-1533.
32. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapää-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Res Ther* 2011;22;13(1): R30.
33. Levine JS, Subang R, Nasr SH, Fournier S, Lajoie G, Wither J, Rauch J. Immunization with an apoptotic cell-binding protein recapitulates the nephritis and sequential autoantibody emergence of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2006;177: 6504-6516.
34. Monneaux F, Muller S. Epitope Spreading in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46: 1430-1438.
35. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:85-95.
36. Deshmukh US, Gaskin F, Lewis JE, Kannapell CC, Fu SM. Mechanisms of autoantibody diversification to SLE-related autoantigens. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:91-98.
37. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009;361:1570-1583.
38. Muñoz LE, Janko C, Schulze C, Schorn C, Sarter K, Schett G, Herrmann M. Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. *Autoimmun Rev* 2010; 10(1):38-42.
39. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(5):280-289.
40. Navratil JS, Ahearn JM. Apoptosis and autoimmunity: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:32-38.
41. Sheriff A, Gaipal US, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Apoptosis and systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30(3):505-527.
42. Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, Krilis SA. New Insights into the Biology and Pathobiology of Beta2-Glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 2011;13:90-95.
43. Gropp K, Weber N, Reuter M, Micklisch S, Kopka I, Hallström T, Skerka C. β 2-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood* 2011;118(10):2774-2783.
44. Matsuura E, Shen L, Matsunami Y, Quan N, Makarova M, Geske FJ, et al. Pathophysiology of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010; 19(4):379-384.
45. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I function in health and disease. *Thrombosis Research* 2004;114:335-346.
46. Balasubramanian K, Maiti SN, Schroit AJ. Recruitment of beta-2-glycoprotein 1 to cell surfaces in extrinsic and intrinsic apoptosis. *Apoptosis* 2005;10:439-446.
47. Manfredi AA, Rovere P, Galati G, Heltai S, Bozzolo E, Soldini L, Davoust J, Balestrieri G, Tincani A, Sabbadini MG. Apoptotic Cell Clearance In Systemic Lupus Erythematosus. I. Opsonization by Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 1998;41:205-214.
48. Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, Galati G, Nebbia G, Tincani A, Balestrieri G, Sabbadini MG. Apoptotic Cell Clearance In Systemic Lupus Erythematosus. II. Role of β 2-Glycoprotein I. *Arthritis Rheum* 1998;41:215-223.
49. Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkou KB. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med* 1998;188:387-392.
50. Georgiev M, Agle LM, Chu JL, Elkou KB, Ashany D. Mature dendritic cells readily break tolerance in normal mice but do not lead to disease expression. *Arthritis Rheum* 2005;52:225-238.