

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO



Título:

“Relación entre el Sistema del complemento y el Síndrome por anticuerpos antifosfolípidos”

Presenta

Dr. Sergio Ignacio Moreno Urbina

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Biomédicas

Chihuahua, Chihuahua, México, noviembre del 2023.



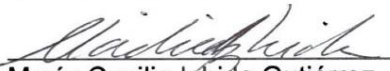
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih. A 05 de marzo de 2024


SAID ALEJANDRO DE LA CRUZ REY
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T E.-

Por medio de la presente informamos a usted que el C. **Sergio Ignacio Moreno Urbina** con número de matrícula **195305**, ha concluido la elaboración de la tesis "RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO Y EL SÍNDROME POR ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDÓS" como requisito para obtener el grado de: Maestro en Formación Biomédica.

Así mismo, manifestamos que la tesis ha sido revisada y aprobada los miembros del Comité de Grado.



María Cecilia Ishida Gutiérrez
Director de Tesis


Abraham Salvador Majiluf Cruz
Co-director de Tesis


Arturo Luevano González
Asesor

Sin otro particular, quedemos de usted.

ATENTAMENTE
"MENTI DA LUCEM; MANIBUS ARTEM"


Dr. Everardo González Rodríguez
Coordinador de la Maestría en Formación Biomédica
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, U.A.CH



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

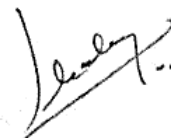
Chihuahua, Chih. 17 de enero del 2024

Dr. Said Alejandro de la Cruz Rey
Secretaría de Investigación y Posgrado
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que el Dr. SERGIO IGNACIO MORENO URBINA del programa de MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, ha concluido la elaboración de la tesis "Relación entre el Sistema del complemento y el Síndrome por anticuerpos antifosfolípidos" de la cual se adjunta un ejemplar.

Así mismo manifestamos que la tesis ha sido revisada por los abajo firmantes, miembros del Comité de Tesis integrado con fecha 23 de octubre del 2023 y que las correcciones indicadas han sido realizadas, por lo que no tenemos inconveniente en que se proceda con los trámites para la presentación de la defensa de grado.

Sin otro particular, quedamos de usted,



Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz
Co-Director de tesis



Dr. Arturo Luévano González
Asesor de Tesis



Dra. María Cecilia Ishida Gutiérrez
Directora de Tesis

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
Circuito Universitario, Campus II, C.P. 31109,
Tel. 52(614) 238 6030
Chihuahua, Chih., Mexico
www.fm.uach.mx



Universidad Autónoma de Chihuahua



Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas

Título:

Relación entre el Sistema del complemento y el Síndrome por anticuerpos antifosfolípidos

Presenta:

Dr. Sergio Ignacio Moreno Urbina

Programa de Posgrado:

Maestría en Ciencias Biomédicas

Miembros del Comité de Tesis

Directora:

Dra. María Cecilia Ishida Gutiérrez

Co-Director:

Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz

Asesor:

Dr. Arturo Luévano

Fuentes de Financiamiento:

Instituto Mexicano Del Seguro Social, Laboratorio de Hematología Clínica y Celular, Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, UACH.

Beca CONACHYT folio: 2022-000002-01NACF-08375 otorgada por el CONAHCYT.

Chihuahua, Chihuahua, México, noviembre del 2023.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a los pacientes y controles sanos por acceder a participar, a las autoridades tanto del IMSS como de la UACH por acceder a aceptar que el protocolo se llevara a cabo, a las y los enfermeros que ayudaron en la toma de las muestras, al Q.B.P. Francisco por su ayuda incondicional para separar y congelar las muestras de suero, a mis profesores y tutores y a los laboratorios de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas por darnos el espacio para la realización de los experimentos y a la Q.B.P. Magda Rivera Abaid por su expertise en la realización de las pruebas de ELISA.

Finalmente a la ciencia y a los pilares y personajes que la han fundamentado y defendido a lo largo de la historia, en algunas ocasiones sufriendo persecuciones, a ellos les dedico mi tesis.

RESUMEN

El síndrome por anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) es una entidad conocida desde 1980, se trata de una enfermedad autoinmune multisistémica que se caracteriza por trombosis y pérdidas obstétricas asociados a la detección de anticuerpos antifosfolípidos tales como el anticoagulante lúpico, los anticuerpos anticardiolipinas y los anticuerpos anti- β 2glicoproteína-1. La evidencia temprana de la participación del complemento en el desorden trombótico llamado SAAF vino de estudios en los cuales animales deficientes en complemento estaban protegidos de complicaciones trombóticas cuando se les infundían anticuerpos antifosfolípidos. El rol exacto de las anomalías del complemento en SAAF no se ha establecido. En este estudio piloto biomédico realizamos mediciones de fracción soluble del complejo de ataque de membrana (sMAC, SC5b9) utilizando el método de ELISA en 10 pacientes con diagnóstico de SAAF (según los criterios de Sydney) y los comparamos con 10 controles sanos. El valor promedio de concentración del SC5b9 activado fue de 7.37 μ g/mL (SD= 2.67 g/mL) en los individuos con SAAF mientras que en el grupo de controles el promedio de la concentración del SC5b9 fue de 3.60 g/mL (SD= 146 μ g/mL, $p < .001$). Por lo tanto, concluimos que en los pacientes con SAAF los niveles solubles de SC5b9 activado se encuentran significativamente más elevados que en controles.

Palabras clave: SAAF, Complemento, Trombosis, MAC, Autoinmunidad.

ABSTRACT

The antiphospholipid syndrome (APS) is a condition known since 1980, it is an autoimmune multisystemic disease characterized by thrombosis and obstetric losses associated with the detection of antiphospholipid antibodies such as lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies, and anti- β 2-glycoprotein-1 antibodies. Early evidence of complement involvement in the thrombotic disorder called APS came from studies in which complement-deficient animals were protected from thrombotic complications when infused with antiphospholipid antibodies. The exact role of complement abnormalities in APS has not been established. In this biomedical pilot study, we measured the soluble fraction of the membrane attack complex (sMAC, SC5b9) using the ELISA method in 10 patients diagnosed with APS (according to the Sydney criteria) and compared them with 10 healthy controls. The average concentration value of activated SC5b9 was 7.37 μ g/mL (SD= 2.67 μ g/mL) in individuals with APS, while in the control group, the average concentration of SC5b9 was 3.60 μ g/mL (SD= 146 μ g/mL, $p < .001$). Therefore, we concluded that in patients with APS, soluble levels of activated SC5b9 are significantly higher than in controls.

Keywords: APS, Complement system, Thrombosis, Autoimmune disease, MAC

INDICE

1. ANTECEDENTE	1
1.1 SINDROME POR ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS	1
1.1.2 FORMAS CLÍNICAS DEL SAAF	2
1.1.3 MARCADORES SEROLÓGICOS POSITIVOS PARA SAAF SIN CRITERIOS CLÍNICOS (TRIPLE POSITIVO).	3
1.1.4 EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.	4
1.1.5 CONTROVERSIA EN ANTICOAGULACIÓN EN EL CONTEXTO DE LOS ANTICUERPOS AFL.....	7
1.1.6 MEDIDA DE ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO	8
1.1.7 CUADRO COMPARATIVO Y/O ANÁLISIS CRÍTICO DE LOS ANTECEDENTES DIRECTOS DE LA INVESTIGACIÓN	8
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
3. HIPÓTESIS	9
4. OBJETIVOS	9
4.1 OBJETIVO GENERAL	9
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
5. JUSTIFICACIÓN	9
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
6.1 TIPO DE ESTUDIO.....	10
6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	10
6.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN.....	10
6.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:.....	10

6.2.3 EXCLUSIÓN.....	10
6.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA	11
7. DEFINICIÓN DE VARIABLES	11
8. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	11
8.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRAS.....	11
8.2 CUANTIFICACIÓN DE SC5B9	12
9. ANÁLISIS DE DATOS.....	12
10. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	12
11. RESULTADOS	14
11.1 EL GRUPO DE PARTICIPANTES SIN DIAGNÓSTICO DE SAAF FUE COMPARABLE CON EL GRUPO DE PARTICIPANTES CON SAAF.	14
11.2 EXISTIÓ UNA RELACIÓN PROPORCIONAL ENTRE LA ABSORBANCIA DE LOS ESTÁNDARES Y LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9.	14
11.3 LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9 EN SUERO DE VARIAS MUESTRAS EXCEDIÓ EL VALOR MÁXIMO DE LA CURVA ESTÁNDAR.....	14
11.4 LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9 EN LA MAYORÍA DE LOS INDIVIDUOS CONTROL FUE MENOR QUE LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9 DE LOS INDIVIDUOS CON SAAF.	15
11.5 LA CONCENTRACIÓN SÉRICA PROMEDIO DE SC5B9 DE LOS PACIENTES CON SAAF FUE MAYOR RESPECTO AL GRUPO CONTROL (TABLA 7).	16
12. TABLAS Y FIGURAS.....	17
Tabla 1. Clasificación de criterios para el SAAF.....	17
Tabla 2. Artículos relevantes	18

Tabla 3. Definición de Variables	20
Tabla 4. Características demográficas y clínicas de los casos y controles.	21
Tabla 5. Valores de absorbancia y SC5b9	22
Tabla 6. Concentración de SC5b9	23
Tabla 7. Prueba estadística.....	24
Figura 1. Regresión lineal de la curva de calibración para SC5b9.....	25
Figura 2. Valores séricos de SC5b9 en grupo con SAAF y grupo control	26
14. REFERENCIAS	32
15. ANEXOS.....	35
15.1 FORMATO DE CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	35



1. ANTECEDENTE

1.1 SINDROME POR ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

En diversas enfermedades actualmente ya bien conocidas y descritas, desde el síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa), la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), la enfermedad por aglutininas frías (1) y, recientemente, el síndrome por anticuerpos antifosfolípidos (SAAF), el sistema del complemento ha cobrado importancia (2).

El SAAF se describió por primera vez en 1983 en un artículo publicado en la revista Lancet en la que el grupo de Graham Hughes del Hospital Hammersmith en el cual describieron la presencia de anticuerpos anticardiolipinas (ACL) en pacientes que presentaban lupus eritematoso sistémico (LES) y eventos tromboticos (3). Hoy es una entidad clínica separada de otras patologías autoinmunes y continúa despertando interés entre los clínicos e investigadores. Es una enfermedad autoinmune multisistémica caracterizada por trombosis y/o eventos obstétricos negativos asociados a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (AFL) tales como el anticoagulante lúpico (AL), los anticuerpos ACL y anticuerpos anti-b2 glicoproteína-1 (anti-b2GP1) (4). Los anticuerpos AFL constituyen un grupo heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos contra fosfolípidos de la membrana celular, así como a las proteínas que se unen a éstos. El blanco antigénico más reconocido es la anti-b2GP1, una proteína plasmática que se une a fosfolípidos aniónicos y que junto con la protrombina comprenden >90% de la actividad de unión de anticuerpo en pacientes con SAAF (5). La clasificación preliminar del SAAF de 1999 se postuló después de una reunión de expertos en Sapporo, Japón y luego actualizada en otra reunión internacional en Sydney, Australia en 2006; tanto en la clasificación preliminar como en la revisada, se dividieron los parámetros diagnósticos en criterio clínicos y de laboratorio (Sección Tablas y Figuras, Tabla 1), siendo necesarios para el diagnóstico la presencia de uno de cada uno, con la recomendación de estratificar a los pacientes de acuerdo a la presencia o ausencia de factores heredados o adquiridos para trombosis arterial o venosa. Estos factores de riesgo incluyen edad >55 en hombres y >65 en mujeres, presencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos, trombofilia hereditaria, uso de hormonales, síndrome nefrótico, cáncer, inmovilización o cirugía (6,7).



1.1.2 FORMAS CLÍNICAS DEL SAAF

1.1.2.1 SAAF PRIMARIO.

En un inicio se creía que el SAAF se asociaba forzosamente a alguna patología autoinmune, sin embargo, en 1989 se postuló el término SAAF primario y desde entonces se reconoce como una entidad aparte (8). Se describieron nueve pacientes jóvenes con al menos dos criterios asociados a la presencia de anticuerpos AFL a títulos altos pero que no cumplían criterios para enfermedad autoinmune. A diferencia del LES y otras enfermedades autoinmunes, el SAAF no se considera una enfermedad inflamatoria. Un estudio paneuropeo el cual incluyó 1,000 pacientes, concluyó que la mayoría (51%) se trataba de un SAAF primario y que sólo el 36.2% se asociaba a LES (9). Los criterios de SAAF primario más incluyen trombosis venosa o arterial, abortos (>2), y la presencia del anticoagulante lúpico o anticuerpos ACL positivos y corroborados con 12 semanas de diferencia (6). Generalmente, se acepta que para hablar de SAAF primario se deben cumplir todos los criterios y haber descartado alguna enfermedad autoinmune (10). El SAAF primario parece un espectro clínico, en términos de sus características y la presencia de otras enfermedades autoinmunes. Las características clínicas y serológicas del SAAF primario son similares al secundario, aunque son más fácilmente reconocidas en presencia de otro trastorno inflamatorio o autoinmune. Mas aún, los pacientes con SAAF primario pueden llegar a desarrollar LES. Es importante identificar el SAAF primario ya que puede ser la causa o factor condicionante de alteraciones vasculares en muchos pacientes, lo que puede hacerlo una entidad más importante que el secundario (10).



1.1.2.2 SAAF SECUNDARIO.

A diferencia de los pacientes con SAAF primario que no tienen alguna otra enfermedad autoinmune, el SAAF secundario se diagnostica en pacientes en quienes los criterios de SAAF se cumplen en presencia de otra condición, más comúnmente LES (11).

1.1.3 MARCADORES SEROLÓGICOS POSITIVOS PARA SAAF SIN CRITERIOS CLÍNICOS (TRIPLE POSITIVO).

Los anticuerpos AFL pueden aparecer en diferentes circunstancias: portadores asintomáticos, anticuerpos positivos sin manifestaciones o SAAF catastrófico (12); han sido detectados más frecuentemente en pacientes que no presentan las características clásicas de SAAF. De hecho, se pueden presentar en pacientes con manifestaciones fuera de criterio (trombocitopenia, anemia hemolítica, *livedo reticularis*) o en mujeres en protocolo de infertilidad. Se pueden descubrir previo a un procedimiento quirúrgico con el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) prolongado. ¿Se encuentran estos pacientes en riesgo de trombosis y morbilidad obstétrica? Seguramente si, debido a que se conoce el rol patogénico de estos anticuerpos en la trombosis. Sin embargo, diversos estudios observacionales reportan una baja incidencia de trombosis en los portadores de anticuerpos AFL la cual va desde 0 a 3.8% anual, dependiendo del estudio. Esta discrepancia aparente puede explicarse porque la relación entre AAF y trombosis no es del “todo o nada” (13). Los AAF circulantes se deben considerar factores de riesgo trombotico además de otras variables que modulan la expresión clínica final; entre estos factores los más importantes son: el perfil de anticuerpos, la coexistencia de otros factores de riesgo trombotico y la presencia de una enfermedad autoinmune subyacente, principalmente LES (14). De acuerdo con el consenso realizado en el 13 Congreso Internacional sobre AAF, un perfil de alto riesgo se puede definir como positividad a AL o “triple positividad” (AL + AAC + anti-b2GPI) o la positividad aislada de anticuerpos ACL a títulos altos. Un estudio italiano prospectivo y multicéntrico encontró que la ocurrencia de un primer evento trombotico en un paciente con alto perfil de riesgo es considerable y es



más frecuente en pacientes de género masculino y ante la presencia de otros factores de riesgo trombóticos (15)

1.1.4 EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

El complemento comprende más de 50 proteínas solubles unidas a la membrana celular que funcionan para asegurar la inmunidad antimicrobiana, remoción eficiente de complejos inmunes y regeneración tisular. La activación del complemento se inicia por tres vías distintas: la vía clásica, la alternativa y la de la lectina, las cuales convergen para disparar el depósito covalente de proteínas del complemento en la superficie del blanco y destruirlo mediante lisis o fagocitosis.

1.1.4.1 EL COMPLEMENTO Y LA COAGULACIÓN

Una revisión del desarrollo evolucionario de las cascadas (coagulación y complemento) indica que los elementos centrales, como la proteólisis de los componentes (complemento y fibrinógeno) son procesos ancestrales y ligados. También cobra relevancia el hecho de que ambas cascadas utilicen proteasas de serina e inhibidores y su diseño de proteínas es compartido. Estas interacciones influyen la coagulación y la trombofilia bajo circunstancias tanto fisiológicas como patológicas y contribuyen a la observación consistente de que los estados inflamatorios se asocian comúnmente con trombosis.

Se sabe desde hace tiempo que el complejo de ataque de membrana (MAC) lesiona e irrumpe en el endotelio, lo que provoca la producción de microvesículas que exponen fosfatidilserina y provee un nido para el ensamblaje directo de la protrombinasa.

Debido a que el factor tisular (FT) es el principal iniciador fisiológico de la coagulación, la inducción de su expresión en células endoteliales y su liberación en monocitos son de vital importancia en la hemostasia. El FT normalmente se expresa fuera de los vasos, sin contacto externo con la sangre, pero se puede expresar en endotelio o monocitos en respuesta a citocinas inflamatorias y endotoxinas. El aumento sustancial de la expresión



del FT en el contexto de la inflamación corresponde exactamente con la tríada de Virchow. Hace más de 2 décadas, se describió que C5 a una concentración de 10 mmol/L puede incrementar la expresión del FT hasta 5 veces, que C5 aumenta la expresión del mRNA del FT y que dicho aumento se puede inhibir por la metilprednisolona.

Hace más de una década, se documentó que se puede activar el complemento en ausencia de C3 y en 2010 se midieron C3a y C5a para informar que múltiples factores de coagulación son capaces de actuar como C3 convertasa *in vitro*. Luego se evidenció que una parte del factor XII, llamado FXII-f puede escindir C1. Un receptor de superficie para C1q, también se une al FXII y puede servir para localizar las 2 proteínas para la activación del complemento. La calicreína producida en la fase de contacto de la hemostasia escinde directamente al factor B, C3 y C5. La activación del complemento en la fase de contacto de la hemostasia (FXIIa, calicreína) se ha observado en superficies artificiales como catéteres médicos las cuales provocan activación del complemento, generación de C3a y C5a y reacciones anafilactoides clínicamente relevantes.

El factor de von Willebrand (FvW) es un actor primordial en la hemostasia y se ha demostrado también su participación en la regulación del complemento. El factor H se co-localiza con el FvW en los cuerpos de Weibel-Palade. Se ha demostrado que el factor H se une a los dominios A1 y A2 del FvW. Por otra parte, los multímeros del FvW pueden servir de soporte para el ensamblaje de la vía alternativa del complemento; esto último sugiere la posibilidad que la activación del complemento pueda acompañar a condiciones como la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y el SHU, en los cuales los multímeros de alto peso molecular del FvW tienen un papel central. Si esto es clínicamente relevante, la inhibición del complemento por esteroides puede ser un mecanismo para explicar por qué los corticoesteroides son útiles en algunos desórdenes trombóticos. Similar al FvW, la trombomodulina (TM) aumenta la inactivación del factor I de C3b. La importancia fisiológica de la TM como regulador a la baja del complemento se sugirió al observar que aproximadamente 5% de los pacientes con SHUa tenían una mutación en el gen de la TM que reduce su capacidad de inactivar C3b. En este caso, la protección de la TM contra el exceso de activación del complemento puede ser más



relevante en ciertas regiones endoteliales específicas donde el daño es primordial, como en los riñones (16).

1.1.4.2 SAAF Y LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

La evidencia temprana de la participación del complemento en el SAAF vino de estudios en los cuales, animales deficientes en complemento estaban protegidos de complicaciones trombóticas cuando se les infundían anticuerpos AFL. Luego de inocular lipopolisacárido en ratones, posteriormente se les administraron anticuerpos AFL IgG e IgG de control. Los animales que recibieron anticuerpos AFL desarrollaron trombosis mesentérica y los controles no. La trombosis también fue más leve en animales con deficiencia del complemento. También se ha observado que anticuerpos AFL que no fijan complemento no inducen trombosis. El rol exacto de las anomalías del complemento en SAAF no se ha establecido claramente. Sin embargo, el interés se ha centrado recientemente en la β 2GP-1 ya que tiene una estructura similar al factor H y puede servir para desdoblarse C3, haciendo a ésta más fácil de inactivar por el factor I. Se han encontrado anticuerpos dirigidos contra el factor H en aproximadamente 30% de los pacientes con SAAF y esto se asoció con un riesgo alto de presentar tromboembolismo. Aunque el mecanismo exacto por el cual los anticuerpos contra reguladores del complemento puedan promover la trombosis se desconocen, puede ser que los anticuerpos contra el factor H interfieren con la inhibición de C3, resultando en un incremento de la conversión de C5 en C5a y promoviendo la trombosis. Cualquiera que sea la causa exacta de la desregulación del complemento en SAAF, existe evidencia de concentraciones elevadas de productos de activación del complemento. Se han medido una variedad de proteínas del complemento en 4 tipos de pacientes: 95 pacientes con SAAF trombótico, 52 con SAAF obstétrico, 39 pacientes con anticuerpos AFL aislados y 30 controles. El fragmento Bb se encontró 10 veces más elevado en pacientes comparados con los controles (16). Hace casi 3 décadas, se demostraron niveles elevados de C5b-9 en el suero de pacientes con AAF y evento vascular cerebral (EVC) comparados con EVC de otro origen. También se ha demostrado hipocomplementemia. Sin embargo, la relación de eventos trombóticos asociados a SAAF con la serología ha sido inconsistente. Se ha descrito el caso de una paciente con SAAF primario que



desarrolló trombosis arterial y venosa, con recurrencias graves de las primeras a pesar de la anticoagulación; tras la administración de eculizumab fue posible la colocación de un bypass femoro-poplíteo sin que ocurriera una nueva trombosis. Se observaron niveles elevados en plasma de C5a y C5b-9 al examen por inmunohistoquímica de la arteria involucrada y depósitos de C1q, C4, C3 y C5b-9 en asociación con β 2GPI e IgG en el vaso sanguíneo, lo cual sugiere activación de la vía clásica del complemento (17).

1.1.5 CONTROVERSIA EN ANTICOAGULACIÓN EN EL CONTEXTO DE LOS ANTICUERPOS AFL.

Se ha demostrado que los pacientes triple positivos (3AAF) tiene un riesgo alto para ambas formas de trombosis y de presentar recurrencia a pesar de estar bajo tratamiento anticoagulante, sin embargo, saber si esta situación debiera recibir un manejo diferente, aún no se ha establecido. A raíz de lo publicado por el estudio TRAPS la literatura internacional se ha pronunciado en contra de la anticoagulación con anticoagulantes orales directos (DOACs) para la prevención secundaria de la trombosis en todos los pacientes con SAAF. Sin embargo, no existe evidencia en pacientes que presentan 1 o 2 anticuerpos y se pudiera tratar de una interpretación sesgada de los datos. Para confundir más la situación, actualmente la trombopprofilaxis no está recomendada en pacientes asintomáticos, que presentan anticuerpos AFL positivos ya que no existe evidencia convincente del beneficio (18). El riesgo anual reportado de trombosis en pacientes positivos a algún anticuerpo y asintomáticos varía de 0 a 3-8%, pero para los 3AAF asciende hasta 3-5% (15).

Recientemente se publicó un estudio retrospectivo de 3 años, donde se analizaron 6500 pacientes con serología positiva, únicos positivos o triples positivos y se encontró que entre estos 2 grupos no existe diferencia en el número de eventos clínicos, el tipo, la localización de la trombosis, la recurrencia y recaída de la enfermedad por lo que no se puede concluir un mayor riesgo en pacientes triple positivos. También se observaron



diferencias en el manejo terapéutico, siendo los 3AAF más anticoagulados que el grupo control (19).

1.1.6 MEDIDA DE ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

La activación del complemento activa más fracciones de polipéptidos funcionales de varias especies moleculares que cualquier otra vía inmunológica o hematológica. La actividad enzimática de las proteasas de serina del complemento es responsable de la producción de al menos una docena de fragmentos activados. El MAC soluble (sMAC) es una excepción; se genera por la activación de las vías del complemento y su formación en la fase fluida comienza con la ruptura de C5 por las C5 convertasas a C5a y C5b, la adición de C6, C7, C8, C9 a C5b forma la estructura clásica MAC, la cual se asocia a proteínas regulatorias como clusterina y vitronectina, para formar el complejo soluble sMAC el cual no se puede unir a la bicapa lipídica. También es sabido que la activación de la hemostasia y el sistema fibrinolítico puede contribuir a la generación del sMAC. En la literatura se menciona un ensayo realizado por ELISA el cual mide niveles séricos y plasmáticos de sMAC, siendo la media entre 121 y 175 ng/ml en donadores sanos. El sMAC se ha medido en plasma y suero en diferentes escenarios clínicos, como enfermedades autoinmunes, trasplante, trauma y deficiencias de complemento y se ha observado un aumento de los niveles relacionados con la actividad de la enfermedad, aunque no se ha establecido una regla general debido a la variabilidad de los ensayos y a las diferencias basales. En conclusión, la activación terminal de la vía del complemento genera MAC y diferentes isoformas de sMAC y, aunque se les han atribuido múltiples roles inmunológicos, se sabe poco acerca de estos y de sus intermediarios.(20)

1.1.7 CUADRO COMPARATIVO Y/O ANÁLISIS CRÍTICO DE LOS ANTECEDENTES DIRECTOS DE LA INVESTIGACIÓN (SECCIÓN TABLAS Y FIGURAS, TABLA 2.)



2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se encuentra el sistema del complemento alterado en los pacientes con SAAF?

3. HIPÓTESIS

Los pacientes con SAAF presentan alteraciones en la activación del complemento.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Establecer si existe activación del complemento en pacientes con SAAF.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir la actividad del complemento en mujeres con el diagnóstico de SAAF.
- Medir la actividad del complemento en participantes mujeres sin SAAF aparentemente sanas.
- Comparar los valores obtenidos entre los grupos

5. JUSTIFICACIÓN

La población mexicana en general, más aún la que habita en la parte norte del país, presenta características diferentes a la población global, debido al mestizaje y la cercanía con los países desarrollados del norte del hemisferio. Se sabe que las enfermedades autoinmunes son más prevalentes y que el curso clínico difiere en algunos aspectos con respecto del resto del país (este apartado tampoco es cierto hoy día). Además, a la fecha no contamos con un estudio que describa el SAAF y, menos aún, su asociación con el complemento. Aparte de lo antes señalado, el fracaso de la anticoagulación en algunos pacientes nos estimula a buscar nuevas vías de inflamación/trombosis que puedan explicar mejor el fenómeno y puedan ser susceptibles de intervención.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Biomédico, experimental, ensayo de laboratorio. Observacional, proyectivo, comparativo.

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Grupo 1: Mujeres con diagnóstico de SAAF que reciben tratamiento con anticoagulantes

Grupo 2: mujeres sin criterios de SAAF y que no reciben tratamiento con anticoagulantes.

6.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

- La población de estudio comprende a mujeres mayores de 18 años, con diagnóstico de SAAF.
- Periodo del estudio: Las muestras fueron recolectadas del 10 de mayo al 28 de julio del 2023.

6.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Mujeres.
- Edad igual o mayor de 18 años.
- Diagnóstico de SAAF en terapia anticoagulante (grupo problema) o pacientes sin criterios serológicos positivos para SAAF, sin presencia de criterios clínicos para el mismo y sin terapia anticoagulante (grupo control)

6.2.3 EXCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria, cáncer activo, embarazo o puerperio, deficiencias genéticas o adquiridas del complemento o enfermedades que alteran las vías de activación del complemento
- Pacientes bajo tratamiento con hormonales y/o glucocorticoides



- Pacientes con tabaquismo activo
- Paciente con pruebas serológicas negativas para SAAF
- Pacientes con dímero D por encima del valor máximo del laboratorio de referencia.
 - o Anticoagulación: tratamiento con algún fármaco que actúe directamente en las proteínas de la coagulación impidiendo su funcionamiento adecuado. Incluye heparinas, antagonistas de la vitamina K e inhibidores directos de los factores Xa o de la trombina.
 - o Activación del complemento: aumento significativo de la media respecto a la población sin SAAF de SC5b9.

6.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se trata de un estudio en 2 fases, la primera fue una prueba de validación. La n se calculó en base a la fórmula de Viechtbauer. Posteriormente, se realizó un estudio piloto. Se utilizó la ecuación de Viechtbauer para el cálculo de tamaño de muestras en estudios piloto, arrojando un numero de 6 para cada grupo (21).

7. DEFINICIÓN DE VARIABLES (SECCIÓN TABLAS Y FIGURAS, TABLA 3)

8. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

8.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRAS

Se tomaron muestras de sangre venosa periférica a 10 pacientes y 10 controles en tubo al vacío con tapón rojo. Después de 30 min las muestras fueron centrifugadas a 1,600 g por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente el suero fue alicuotado y congelado a -60°C hasta el momento de la cuantificación de SC5b9.



8.2 CUANTIFICACIÓN DE SC5B9

Se utilizó el kit comercial Human SC5b9 (soluble terminal complement complex) (Novus Biologicals, NBP2-66708, Colorado, USA), diseñado para hacer las cuantificaciones mediante técnica de ELISA en placa de 96 posos. Brevemente, a cada poso se agregaron 100 uL de muestra o solución estándar (incluida en el kit) y se incubaron por 90 min a 37°C. El líquido se retiró y se agregaron 100 ul de anticuerpo biotinilado anti-C5b4 y se incubó por 1 h a 37 °C. Posterior a la incubación, el sobrenadante fue retirado por aspiración y cada poso fue lavado con 350 uL de solución de lavado (proveído con el kit). Después del último lavado, en cada poso se incubaron 100 uL de solución de anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano y se hizo una incubación por 30 min a 37 °C. El líquido fue aspirado y lavado 5 veces con el 350 ul de la solución de lavado. Se agregaron 90 uL del reactivo con sustrato y se incubaron las muestras por 15 min a 37 °C. Se agregaron 50 uL de solución de paro e inmediatamente se leyó la absorbancia a 450 nm. Se hizo el cálculo de los resultados mediante utilizando la curva de calibración (Fig. 1).

9. ANÁLISIS DE DATOS

Análisis univariado, por medio T de student para diferencia de medias, de 2 colas con error alfa de 5% utilizando IBM SPSS statistics versión 29

10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo a la *Declaración de Helsinki* en materia de confidencialidad, en este protocolo se tomaron toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participó en la investigación y la confidencialidad de su información personal, respetando siempre lo principios de autonomía, justicia, benevolencia y no maleficencia (21).

Además, existía el riesgo para el paciente de presentar hematoma en sitio de punción de toma de sangre venosa en la investigación de acuerdo al Reglamento de la Ley General



de Salud en Materia de Investigación para la Salud por lo que no se realizó en población vulnerable como menores de edad, embarazadas o grupos subordinados.

El beneficio hacia los pacientes y la sociedad radicó en poder establecer estrategias terapéuticas para evitar la morbimortalidad asociada al SAAF. En el balance riesgo/beneficio, la balanza se inclinó claramente al beneficio ya que el riesgo para el paciente, en caso de presentarlo, fue mínimo y sin secuelas funcionales o daño que pusiera en riesgo la vida.



11. RESULTADOS

11.1 EL GRUPO DE PARTICIPANTES SIN DIAGNÓSTICO DE SAAF FUE COMPARABLE CON EL GRUPO DE PARTICIPANTES CON SAAF.

El valor estadístico de U fue de 0.273, al cual le corresponde un valor de $p < 0.05$ y que hace a nuestros 2 grupos comparables (Tabla 4).

Incluimos en el estudio un total de veinte participantes mujeres, divididas en dos grupos: sin SAAF u otra patología aparente ($n=10$) y mujeres con SAAF ($n=10$); la variable demográfica incluida en la recolección de datos fue la edad de las participantes. El rango de edad fue 18-65 años; el promedio de edad en el grupo control fue 34.7 años ($SD=11,6$) mientras que el de las mujeres con SAAF fue 41.5 años ($SD=15$) (Tabla 4) (sección Tablas y Figuras). La edad promedio de ambos grupos no fue significativamente diferente lo cual permite descartar posibles diferencias en la concentración plasmática del complemento debidas a diferencias demográficas entre los grupos.

11.2 EXISTIÓ UNA RELACIÓN PROPORCIONAL ENTRE LA ABSORBANCIA DE LOS ESTÁNDARES Y LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9.

La cuantificación de SC5b9 en el kit comercial (Material y métodos) se analizó mediante regresión lineal incluyendo los valores de absorbancia correspondientes (Figura 1) (sección Tablas y Figuras); el valor de correlación 0.89 nos permitió concluir que existía una relación directamente proporcional entre la absorbancia de los estándares y su concentración de SC5b9 y que esta curva podía ser utilizada para calcular las concentraciones de SC5b9 de las muestras problema.

11.3 LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9 EN SUERO DE VARIAS MUESTRAS EXCEDIÓ EL VALOR MÁXIMO DE LA CURVA ESTÁNDAR.



Realizamos un ensayo piloto con doce muestras seleccionadas al azar para corroborar la aplicabilidad de la curva de calibración y tener información preliminar sobre las concentraciones de SC5b9 soluble, sobre todo en los casos, ya que los valores publicados al respecto son escasos, variados y no concluyentes. Los valores de SC5b9 obtenidos utilizando la curva de calibración se muestran en la Tabla 5 (sección Tablas y Figuras). Se observa que algunos controles presentan valores más elevados de SC5b9 activado, lo cual no es lo esperado para pacientes que no presentan padecimientos de tipo trombótico; por lo tanto, consideramos que era necesario excluir a las participantes control del protocolo que mostrarán valores elevados de dímero D. Este criterio fue incluido adicionalmente para incluir participantes al protocolo para la determinación definitiva de SC5b9 soluble.

11.4 LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9 EN LA MAYORÍA DE LOS INDIVIDUOS CONTROL FUE MENOR QUE LA CONCENTRACIÓN DE SC5B9 DE LOS INDIVIDUOS CON SAAF.

Una vez establecido el criterio de inclusión adicional para controles de valor de dímero D dentro de límites normales ($<0.5 \text{ ug/mL}$), realizamos la determinación de SC5b9 soluble tanto en pacientes con SAAF y controles. En la Tabla 6 (sección Tablas y Figuras) se muestra el promedio de dos determinaciones realizadas por duplicado, el rango de concentración de SC5b9 para los controles fue $960.8\text{-}4892.8 \text{ ng/mL}$ mientras que en las participantes con SAAF la concentración más baja obtenida fue de $4,912.2 \text{ ng/mL}$ ($p<0.05$). Esto apoya la hipótesis de que en pacientes con SAAF el SC5b9 se encontró constitutiva y significativamente activado. La Figura 2 (sección Tablas y Figuras) muestra la representación gráfica de los datos obtenidos, la mediana para los casos fue $6,412.0 \text{ ng/mL}$ mientras que el dato homólogo para los controles es de $4,089 \text{ ng/mL}$ ($p<0.05$). Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los valores de SC5b9 para los controles estuvieron por debajo del valor mínimo de los casos ($4,912.2 \text{ ng/mL}$); los datos de los controles mostraron poca dispersión, en cambio los valores de SC5b9 para los casos tuvieron una dispersión hacia los valores más altos.



11.5 LA CONCENTRACIÓN SÉRICA PROMEDIO DE SC5B9 DE LOS PACIENTES CON SAAF FUE MAYOR RESPECTO AL GRUPO CONTROL (TABLA 7).

Se realizó un análisis t de student para evaluar la diferencia entre controles e individuos con SAAF en relación al promedio de las concentraciones de SC5b9 activado (sección Tablas y Figuras, Tabla 7). El valor promedio de concentración del SC5b9 activado fue de 7.37 $\mu\text{g/mL}$ (SD= 2.67 $\mu\text{g/mL}$) en los individuos con SAAF mientras que en el grupo de controles el promedio de la concentración del SC5b9 fue de 3.60 $\mu\text{g/mL}$ (SD= 146 $\mu\text{g/mL}$) ($p < .001$).



12. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Clasificación de criterios para el SAAF (revisada 2006)

Criterios Serológicos
<ul style="list-style-type: none">- Anticoagulante lúpico- Anticuerpos anticardiolipinas (IgG y/o IgM)- Anticuerpos anti-β_2-glicoproteína-1 (IgG y/o IgM)
Criterios clínicos
<ul style="list-style-type: none">- Uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos- Morbilidad gestacional con una o más muertes fetales inexplicadas de fetos > 10 semanas morfológicamente normales o uno o más nacimientos prematuros de neonatos normales en la semana 34 de gestación o antes de la gestación o tres o más abortos espontáneos consecutivos inexplicados antes de la semana 10 de gestación

El SAAF está presente cuando al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio se cumplen (7). IgG= Inmunoglobulina G, IgM= Inmunoglobulina M

Tabla 2. Artículos relevantes

Título	Autor(es)	Año	DOI	PMID	Hallazgos principales
1. Complement in the Pathophysiology of the Antiphospholipid Syndrome.	Chaturvedi S, Brodsky RA, McCrae KR.	2019	10.3389/fimmu.2019.00449	30923524	Las vías del complemento y de la coagulación están estrechamente relacionadas, y cada vez hay más datos que indican que el complemento puede activarse en pacientes con aPL y funcionar como cofactor en la patogénesis de los eventos clínicos asociados a aPL.
2. Antiphospholipid syndrome: Complement activation, complement gene mutations, and therapeutic implications	Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA.	2021	10.1111/jth.15082	32881236	La activación de la cascada del complemento a través de anticuerpos antifosfolípidos puede causar lesión celular y promover la coagulación a través de múltiples mecanismos.
3. Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome	Oku K, Nakamura H, Kono M, T., et al.	2016	10.1016/j.autrev.2016.07.020	27485012	Descubrimos que los anticuerpos anti-C1q se detectan con mayor frecuencia en pacientes con SAF primario que en pacientes de control y en pacientes con SAF refractario con eventos trombóticos repetidos.
4. Antibodies Against Complement Components: Relevance for the Antiphospholipid Syndrome- Biomarkers of the Disease and Biopharmaceuticals	Bećarević M.	2017	10.1007/s11926-017-0669-1	28631067	El sistema del complemento tiene un papel en la mediación de la trombosis inducida por aPL. Abs en modelos animales. Se revisa la importancia de los anticuerpos contra los componentes del complemento (potenciales biomarcadores del SAF) y la importancia de los anticuerpos con efectos anticomplemento beneficiosos en el SAF (como biofarmacéuticos).

Tabla 1. Continuación

Título	Autor	Año	DOI	PMID	Hallazgos Principales
5. Pathogenic Role of Complement in Antiphospholipid Syndrome and Therapeutic Implications	Tedesco F, Borghi MO, Gerosa M, et al.	2018	10.3389/fimmu.2018.01388	29971066	Se han encontrado niveles elevados de productos de activación del complemento en ausencia de anomalías en las moléculas reguladoras en el plasma de pacientes con SAF, lo que sugiere fuertemente que la activación de la cascada del complemento es el resultado de la unión de aPL al antígeno diana y no de una regulación defectuosa.

DOI: Identificador de Objeto Digital, PMID: Identificador en PubMed, aPL= Anticuerpos antifosfolípidos, por siglas en inglés. SAF= Síndrome por antifosfolípidos.



Tabla 3. Definición de Variables

Variable	Nombre	Definición	Tipo	Indicador
Independiente	Diagnóstico SAAF	Diagnóstico de SAAF de acuerdo con los criterios de Sidney (7)	Dicotómica	No = 0 Sí = 1
Dependiente	SC5b9	Concentración sérica del Complejo terminal de complemento soluble determinada por técnica de ELISA	Continua	0-10.0 µg/mL
Demográfica	Edad	Medición del tiempo que una persona ha vivido desde su nacimiento	Continua	Años

Variables incluidas en el estudio. SAAF= Síndrome por anticuerpos antifosfolípidos, SC5b9= Complejo terminal de complemento soluble, ELISA= Ensayo por enzima unida por inmunoabsorción (por siglas en inglés)



Tabla 4. Características demográficas y clínicas de los casos y controles.

Características	Todos los casos (N=10)	Todos los controles (N=10)	p<0.05
Edad			
Media	41.5 (+/- 15)	34.7 (+/- 11.6)	Sig. Asint. (2- colas) 0.273
Rango	18-65	23-57	



Tabla 5. Valores de absorbancia y SC5b9 (piloto)

ABS		SC5b9 ($\mu\text{g/mL}$)	
Controles	SAAF	Controles	SAAF
0.14	1.55	2.43	0.08
0.52	1.51	2.37	0.71
1.92	2.47	3.97	3.05
1.41	1.00	1.52	2.20
1.18	1.20	1,85	1.81
-	1.69	2.66	-
-	1.90	3.00	-

Valores de absorbancia y SC5b9 en participantes con SAAF y controles obtenidos en el ensayo piloto. SAAF= Síndrome antifosfolípido, ABS= absorbancia, SC5b9= Complejo terminal de complemento soluble.



Tabla 6. Concentración de SC5b9 ($\mu\text{g/mL}$)

SAAF (n=10)	Control (n=10)
4.91	4.70
5.00	9.61
6.54	4.37
12.91	4.80
7.79	4.89
5.01	3.83
8.86	3.28
10.49	4.14
6.28	1.01
5.94	4.04

Concentración de SC5b9 en suero de pacientes con SAAF y controles, determinada mediante ELISA. Abreviaturas como en Tabla 5.



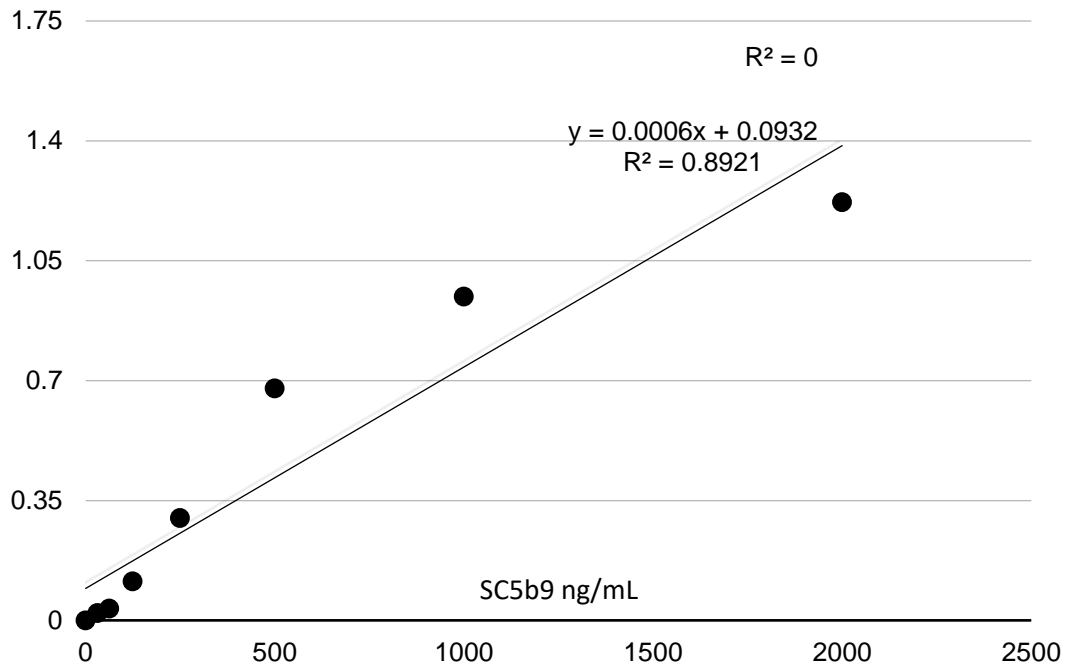
Tabla 7. Prueba estadística

	SC5b9 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SD	p
SAAF	7.37	2.67	<0.001
Controles	3.6	1.46	<0.001

Prueba t de student para grupo con SAAF y control.
Abreviaturas como en tabla 5.



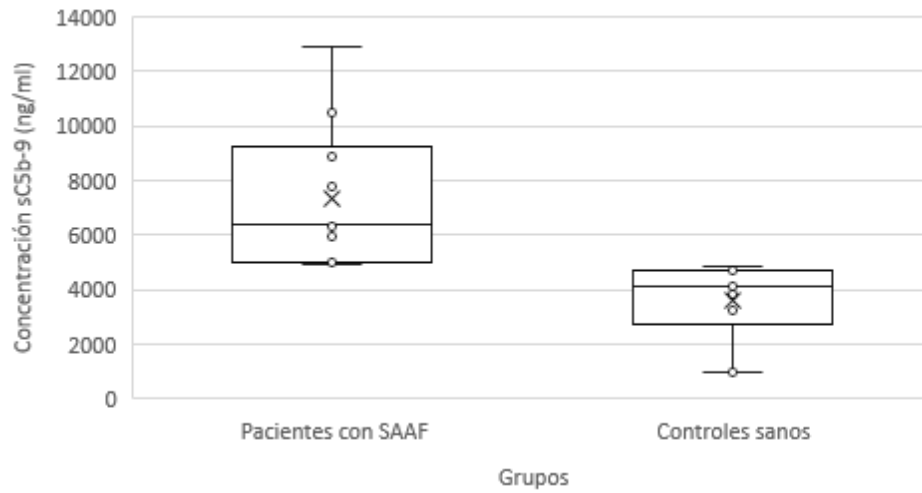
Figura 1. Regresión lineal de la curva de calibración para SC5b9



Regresión lineal de la curva de calibración elaborada con los datos de la determinación de SC5b9 en estándares de concentraciones conocidas incluidas en el kit, (Sección Materiales y Métodos, Tabla 4))

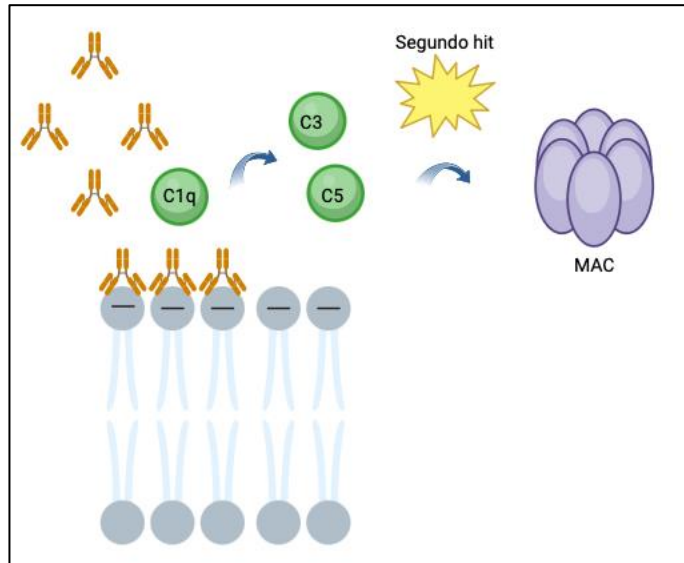


Figura 2. Valores séricos de SC5b9 en grupo con SAAF y grupo control



Box plot de los valores séricos de SC5b9 en grupo con SAAF y grupo control. SC5b9= Complejo terminal de complemento soluble, por siglas en inglés, SAAF= Síndrome por anticuerpos antifosfolípidos.

Figura 3. Hipótesis de la activación de la vía clásica del complemento y segundo hit





13. DISCUSIÓN

El SAAF se conoce desde 1980, la presencia de trombosis vascular es característica, tanto en su forma primaria como secundaria. Es sabido por parte de los clínicos que tratamos esta patología, que los eventos trombóticos y catastróficos se siguen presentado aún en pacientes con una adecuada anticoagulación, utilizando como criterios para la misma el INR o el dímero D, lo cual nos lleva a plantear vías paralelas que puedan estar activadas y puedan ser objeto de blancos terapéuticos.

La activación del complemento comprende el MAC es decir, las proteínas séricas solubles C5b hasta C9 polimerizadas y ha sido estudiada en varias enfermedades, sin embargo no se ha llegado a un consenso sobre el punto de corte de la concentración normal debido a que la bibliografía además de ser escasa, reporta niveles inconsistentes (1).

Actualmente, la medición de las proteínas solubles del complemento, y especialmente el MAC está limitado a centros de investigación, también se sabe que medir los productos de activación del complemento o las proteínas por individual no tienen un valor predictivo en SAAF.

Recientemente Chaturvedi *et al*, (2020) demostraron mediante el ensayo de Ham modificado (mHAM), una activación de complemento en 6.8% de los pacientes con LES, 35.6% de pacientes con SAAF y 85.7% de pacientes con SAAF catastrófico en población caucásica, con dichos resultados plantearon un modelo en el cual los anticuerpos AFL dirigen la activación del complemento y disparan trombosis.



En este protocolo se realizó un ensayo biomédico con el objetivo de determinar mediante la técnica de ELISA si la activación del complemento es mayor en pacientes con SAAF en relación con controles sanos, secundariamente se buscó estandarizar la metodología ya que esta determinación no se realiza de manera rutinaria.

En la escasa literatura sobre el tema, no se tiene conocimiento sobre si la edad influye en el nivel de activación del complemento; en este estudio, la edad de los casos fue ligeramente mayor que la de los controles, sin embargo, la prueba estadística mostró que el promedio no muestra diferencia.

La técnica para la determinación de SC5b9 fue estandarizada según las instrucciones del kit comercial tal y como se explica en la sección de Material y Métodos; la curva de calibración, mostró un coeficiente satisfactorio para este tipo de ensayo ($r=0,89$, Figura 1)

En el primer ensayo realizamos mediciones en 7 pacientes y 5 controles (Tabla 2) y se observó que algunos controles presentaron concentraciones de SC5b9b en plasma mayores que los controles, estudiando la posible coagulación alterada en controles, consideráramos agregar como criterio de inclusión concentración de dímero D por debajo de 500 mg/dl como parámetro para incluir a las participantes. El dímero D, marcador de activación hemostática, no se esperaba elevado en este grupo de pacientes con SAAF ya que como se mencionó anteriormente, todas las pacientes se encontraban con tratamiento anticoagulante.

La determinación de SC5b9 en el grupo con SAAF ($n=10$) mostró valores de más del doble con respecto al grupo control ($n=10$) y al comparar los promedios de cada grupo



(7.37 vs 3.6) se concluyó que, en efecto, en el contexto local, la activación del complemento juega un papel importante en la fisiopatología del SAAF. Nuestros datos sugieren que los mecanismos fisiopatológicos en el SAAF no solo dependen de los anticuerpos circulantes, ya que inclusive en controles sanos el complemento está activo, se debe tener un segundo hit para promover que la activación del complemento progrese más allá de C3 y llegue hasta el MAC.

Respecto a las causas, la hipótesis es que en el SAAF encontramos anticuerpos circulantes contra diversos fosfolípidos de la superficie celular, los cuales han sufrido modificaciones como el fenómeno flip-flop, exponiendo zonas que normalmente deberían de estar ocultas, además, el daño a las superficies celulares secundario a estresores biológicos como el daño tisular o infecciones, provocan la expresión de fosfolípidos aniónicos, esto puede llevar a activar tanto el sistema del complemento como el de coagulación. Lo anterior apoya la teoría del segundo hit. Debe de existir un mecanismo por el cual los anticuerpos circulantes activen el complemento, suponemos que se trata de la vía clásica, sin embargo, para que progrese más allá de C3 y C5 y alcance el MAC se requiere de un segundo hit, lo cual explica por qué los controles tienen activado el complemento, pero en los casos se encuentra más allá del doble.

A continuación, mostramos en la figura 3 un esquema hipotético.

Esto abre la puerta a muchas interrogantes que se deben analizar en un futuro, sobre todo involucrando a los anticoagulantes o separando a los grupos, en un supuesto que la anticoagulación proteja contra la hiperactivación del complemento, además del uso de antiinflamatorios como la colchicina, lo cual sería interesante explorar como modificador del curso de la enfermedad.

Dentro de las limitantes del estudio, consideramos no haber incluido a varones, ya que es un área interesante, debido a que sabemos que los desenlaces son más graves en



estos, sin embargo, decidimos excluirlos para evitar incluir factores que pudieran introducir sesgo en la concentración de SC5b9.

En los planes futuros, consideramos ampliar el estudio tanto en número de individuos, centros participantes y variables incluidas. Así mismo, se espera poder caracterizar a los grupos con otros marcadores de inflamación, coagulación y complemento para poder esbozar un modelo fisiopatológico que nos acerque a entender la encrucijada de dichos sistemas en el escenario de los pacientes con SAAF. Además, la inhibición del complemento puede suponer una terapia útil en aquellos pacientes con SAAF refractario a terapias estándar.



14. REFERENCIAS

1. Baines AC, Brodsky RA. Complementopathies. *Blood Rev.* julio de 2017;31(4):213–23.
2. Chaturvedi S, Brodsky RA, McCrae KR. Complement in the Pathophysiology of the Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol.* 2019;10:449.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet Lond Engl.* el 26 de noviembre de 1983;2(8361):1211–4.
4. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol.* junio de 2011;7(6):330–9.
5. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci.* el 1 de junio de 1990;87(11):4120–4.
6. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* julio de 1999;42(7):1309–11.
7. 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 JTH.* febrero de 2006;4(2):295–306.



8. Alarcón-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* el 1 de abril de 1989;16(4):482–8.
9. 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.* abril de 2002;46(4):1019–27.
10. Mackworth-Young C. Primary antiphospholipid syndrome: a distinct entity? *Autoimmun Rev.* enero de 2006;5(1):70–5.
11. Asherson RA, Bucciarelli S, Gómez-Puerta JA, Cervera R. Chapter 1 History, Classification, and Subsets of the Antiphospholipid Syndrome. En: Cervera R, Reverter JC, Khamashta M, editores. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases* [Internet]. Elsevier; 2009 [citado el 20 de octubre de 2021]. p. 1–11. (Antiphospholipid Syndrome in Systemic Autoimmune Diseases; vol. 10). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1571507808004017>
12. Gómez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* marzo de 2014;48–49:20–5.
13. Taraborelli M, Andreoli L, Tincani A. Much more than thrombosis and pregnancy loss: the antiphospholipid syndrome as a “systemic disease”. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* febrero de 2012;26(1):79–90.
14. Roubey R a. S. Risky business: the interpretation, use, and abuse of antiphospholipid antibody tests in clinical practice. *Lupus.* abril de 2010;19(4):440–5.
15. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood.* el 27 de octubre de



2011;118(17):4714–8.

16. Dzik S. Complement and Coagulation: Cross Talk Through Time. *Transfus Med Rev.* octubre de 2019;33(4):199–206.
17. Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA. Antiphospholipid syndrome: Complement activation, complement gene mutations, and therapeutic implications. *J Thromb Haemost JTH.* marzo de 2021;19(3):607–16.
18. Arachchillage DRJ, Laffan M. What is the appropriate anticoagulation strategy for thrombotic antiphospholipid syndrome? *Br J Haematol.* abril de 2020;189(2):216–27.
19. Bertin D, Camoin-Jau L, Veit V, Resseguier N, Lambert M, Buffet Delmas P, et al. Single or triple positivity for antiphospholipid antibodies in “carriers” or symptomatic patients: Untangling the knot. *J Thromb Haemost JTH.* diciembre de 2021;19(12):3018–30.
20. Barnum SR, Bubeck D, Schein TN. Soluble Membrane Attack Complex: Biochemistry and Immunobiology. *Front Immunol.* el 10 de noviembre de 2020;11:585108.
21. Viechtbauer W, Smits L, Kotz D, Budé L, Spigt M, Serroyen J, et al. A simple formula for the calculation of sample size in pilot studies. *J Clin Epidemiol.* noviembre de 2015;68(11):1375–9.
22. WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/polices-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>



15. ANEXOS

15.1 FORMATO DE CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**Carta de consentimiento informado para
participación en protocolos de investigación
(adultos)**

Nombre del estudio:	Relación entre el sistema del complemento y el síndrome por anticuerpos antifosfolípidos.
Patrocinador externo (si aplica):	No aplica
Lugar y fecha:	Chihuahua, Chihuahua, mayo 2022
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	Conocer la relación del complemento con el SAAF para comprender la trombosis recidivante
Procedimientos:	Toma de muestra de sangre venosa
Posibles riesgos y molestias:	Dolor y hematoma (moretón) en sitio de punción.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Conocer mejor la enfermedad para planear estrategias preventivas e incidir en la morbimortalidad
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Se informará a los participantes sobre los resultados en caso de que lo soliciten



Participación o retiro:

Es libre de tomar su decisión en cuanto a participar en el estudio, y podrá retirarse del mismo en el momento que lo desee sin que afecte la atención que recibe del Instituto.

Privacidad y confidencialidad:

Sus datos serán codificados y protegidos de tal manera que solo serán identificados por los investigadores del estudio.

Declaración de consentimiento:

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

- No acepto participar en el estudio.
- Si acepto participar y que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si acepto participar y que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros, conservando su sangre hasta por 5 años tras lo cual se destruirá la misma.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadora o Investigador

Dr. Sergio Ignacio

Responsable:

Dra. Cecilia Ishida Moreno Urbina

Colaboradores:

Técnico en Análisis Clínicos

Francisco Javier Guevara Godínez

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a:
Comité Local de Ética de Investigación en Salud del CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc
330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720.
Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comité.eticainv@imss.gob.mx



Nombre y firma del participante

Nombre y firma de quien obtiene el
consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810-009-013

8