



**INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DE CÓRDOBA**

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO ATEROTROMBÓTICO EN
PACIENTES CON SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO MEDIANTE
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS**

Laura Pérez Sánchez

Córdoba, 2023

TITULO: *Caracterización del riesgo aterotrombótico en pacientes con Síndrome Antifosfolípido mediante análisis transcriptómicos*

AUTOR: *Laura Pérez Sánchez*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

**CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO ATEROTROMBÓTICO EN
PACIENTES CON SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO MEDIANTE
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS**

**CHARACTERISATION OF THE ATHEROTHROMBOTIC RISK IN
PATIENTS WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME BY
TRANSCRIPTOMIC ANALYSES**

Memoria presentada por

Laura Pérez Sánchez

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de los Dres. Alejandro Escudero

Contreras, Rosario López Pedrera y Carlos Pérez Sánchez

Programa de Doctorado de Biomedicina

Febrero 2023



TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización del riesgo aterotrombótico en pacientes con Síndrome Antifosfolípido mediante análisis transcriptómicos.

DOCTORANDO/A: Laura Pérez Sánchez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Dña. Laura Pérez Sánchez presenta un trabajo original, cuyo objetivo principal ha sido caracterizar fenotipos clínicos distintivos en pacientes con síndrome antifosfolípido (SAF) mediante el análisis integrado en plasma y monocitos de perfiles transcriptómicos e inflamatorios.

Los resultados obtenidos en este trabajo se han presentado en numerosos congresos nacionales e internacionales y han sido publicados en una revista científica de reconocido prestigio internacional en el ámbito de la Biomedicina: *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (Decil 1, Factor de impacto:10.5). Cabe reseñar asimismo que dicha publicación fue merecedora del premio al mejor artículo publicado en el ámbito de las patologías autoinmunes sistémicas por la Sociedad Española de Reumatología en el año 2021.

La tesis doctoral presentada se enmarca en un proyecto de investigación financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI18/00837).

Finalmente, es necesario resaltar la relevante formación científica alcanzada por la candidata. El desarrollo de esta tesis doctoral le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que le capacitan para desarrollar

nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos proyectos de investigación y artículos científicos.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de Enero de 2023

Firma del/de los director/es

LOPEZ PEDRERA
MARIA ROSARIO -
30524254B

Firmado digitalmente por LOPEZ PEDRERA MARIA ROSARIO - 30524254B. DN: cn=LOPEZ PEDRERA MARIA ROSARIO, o=UNIVERSIDAD DE CORDOBA, ou=UNIVERSIDAD DE CORDOBA, email=lopez.pedra@uco.es, c=ES. Fecha: 2023.01.10 22:46:01 +01'00' Fuente: PDF Render Versión: 12.0.2

Fdo.: Rosario López Pedrera

PEREZ SANCHEZ
CARLOS -
44368394Z

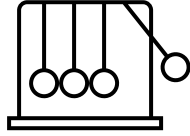
Digitally signed by PEREZ SANCHEZ CARLOS - 44368394Z. Date: 2023.01.10 23:16:35 +01'00'

Fdo.: Carlos Pérez Sánchez

ESCUADERO
CONTRERAS
ALEJANDRO -
30791933Q

Firmado digitalmente por ESCUDERO CONTRERAS ALEJANDRO - 30791933Q. Fecha: 2023.01.11 09:36:52 +01'00'

Fdo.: Alejandro Escudero Contreras



ABREVIATURAS

AAF: Anticuerpos antifosfolípido
AAS: Ácido acetyl salicílico
ACO: Anticoagulantes orales
aCL: Anticuerpos anticardiolipina
aGAPSS: Adjusted Global anti-Phospholipid Syndrome Score
AIT: Accidente isquémico transitorio
Anti-β2GPI: anticuerpos anti-beta2-glicoproteína I.
AL: Anticoagulante lúpico
APC: proteína C activada
APL: Antiagregantes plaquetarios
APS: Antiphospholipid Syndrome
APS/PT: complejo fosfatidilserina-protrombina
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ARNnc: ARN no codificante de proteínas
AT: Aterotrombosis
AT-III: antitrombina III
CE: Células endoteliales
CIMT: grosor de la íntima media carotídea
CCR2: receptor de quimioquinas C-C tipo 2
CV: Cardiovascular
ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular-1
IFN-γ: Interferón-γ
IgA: Inmunoglobulina A
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
IGIV: inmunoglobulina intravenosa
IL-1: Interleuquina-1
IL-8: Interleuquina-8
INR: Relación normalizada internacional
IPA: Ingenuity Pathway analysis
CXCL4: expresión génica del factor plaquetario
DS: Donante sano
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ERK: Quinasa activada por señales extracelulares
EPCR: Receptor endotelial de la proteína C
TEV: Tromboembolismo venoso
EV: Vesículas extracelulares
Flt1: Receptor 1 del VEGF
FITC: isotiocianato de fluoresceína
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GAPSS: Global Antiphospholipid Syndrome Score
GPL: Unidades de IgG
HBPM: heparina de bajo peso molecular.
HD: Donantes sanos
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HLA: Antígeno leucocitario humano
HUVEC: Primary human umbilical vein endothelial cells
Hsp60: Proteína de choque térmico 60
LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LES: Lupus eritematoso sistémico
MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos
MEK: Quinasa de las MAPK
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
miRNAs: MicroRNAs
MMP: Metaloproteinasas

NF-kappa B: Factor de transcripción-kB

p38 MAPK: p38- proteínas quinasas activadas por mitógenos

PARs: Receptores activados por proteasas

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1

PCR: Proteína C Reactiva

pDC: células dendríticas plasmocitoides

PDI: Proteína disulfuro isomerasa

PLS-DA: Partial Least-Squares Discriminant Analysis

PSGL-1: Glicoproteína ligando de la p-selectina

PTT: Tiempo de tromboplastina parcial

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN

RNA pol: RNA polimerasa

SAF: Síndrome antifosfolípido

SAFC: Síndrome antifosfolípido catastrófico

SNV: Variación de un solo nucleótido

STAT-1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1

TF: Factor tisular

TFPI: Inhibidor de la vía del factor tisular

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α

TLRs: Receptores tipo Toll.

TPA: Activador tisular del plasminógeno

TXB2: Tromboxano B2

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1

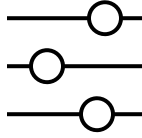
VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VIP: variable importance in projection

vWF: Factor von Willebrand

VSG: Velocidad de Sedimentación Globular

β 2-GPI: β 2-glicoproteína I



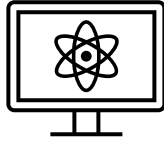
ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	4
2.1. Síndrome Antifosfolípido. Criterios diagnósticos y fisiopatología de la enfermedad.	4
2.1.1. Criterios diagnósticos.	5
2.1.1.1. Criterios clínicos.	5
2.1.1.2. Criterios de laboratorio.	6
2.1.2. Fisiopatología del Síndrome Antifosfolípido.....	7
2.1.2.1. Trombosis vascular.	8
2.1.2.2. Morbilidad del embarazo.	8
2.1.2.3. Manifestaciones clínicas no incluidas en los criterios diagnósticos de SAF.....	9
2.1.2.4. Síndrome Antifosfolípido Catastrófico.....	10
2.1.3. Anticuerpos Antifosfolípido.	11
2.1.3.1. Anticuerpos anti-cardiolipina y anti-beta2-Glicoproteína I.	11
2.1.3.2. Anticoagulante lúpico (AL).	12
2.1.3.3. Anticuerpos antifosfolípido no incluidos en criterios diagnósticos.	14
2.2. Estratificación del riesgo trombótico en SAF.....	14
2.3. Tratamiento.	17
2.4. Factores celulares y moleculares implicados en la patogenia de la trombosis en el SAF.	19
2.4.1. Alteraciones pro-trombóticas y pro-aterogénicas inducidas por AAF en células inmunes y del sistema vascular en el SAF.....	19
2.4.2. Aterotrombosis en el Síndrome Antifosfolípido.....	23

2.5. Factores genéticos de riesgo aterotrombótico en Síndrome Antifosfolípido.	25
2.6. Firmas de expresión génica asociada a aterotrombosis en pacientes con Síndrome Antifosfolípido.....	31
2.7. Mecanismos post-transcripcionales de regulación de la expresión génica en pacientes con Síndrome Antifosfolípido: microARNs.....	36
2.7.1. MicroARN celulares como biomarcadores de enfermedad en el Síndrome Antifosfolípido.....	36
2.7.2. MicroARN circulantes como biomarcadores de enfermedad en el Síndrome Antifosfolípido.....	41
3. Hipótesis.....	45
4. Objetivos.....	47
5. Métodos.....	48
5.1. Pacientes.	48
5.2. Recogida de muestras sanguíneas, aislamiento celular y análisis de parámetros bioquímicos.....	50
5.3. Determinación del grosor de la íntima media carotídea mediante ecografía Doppler.	51
5.4. Estudio de la función endotelial: láser Doppler lineal Periflux 5010.....	52
5.5. Array de proteínas de señalización intracelular (<i>PathScan Array</i>).....	53
5.6. Análisis del perfil inflamatorio en plasma de pacientes con SAF mediante <i>Bio-Plex</i>	53
5.7. Análisis de expresión génica mediante <i>Microarrays</i>	54
5.8. Análisis de expresión de microRNAs mediante <i>NanoString</i>	55

5.9. Caracterización funcional del perfil de genes y miRNAs alterados.....	56
5.10. Análisis Integrado miRNA-mRNA.	56
5.11. PCR cuantitativa a tiempo real.	57
5.12. Transfecciones con miRNA mimic y ensayos de Luciferasa.....	60
5.13. Análisis de la actividad procoagulante y adhesión celular.....	61
5.14. Tratamientos <i>in vitro</i> con anticuerpos antifosfolípidos purificados	
5.15. Análisis estadísticos.....	63
6. Resultados.....	65
6.1. Los monocitos de pacientes con SAF primario muestran perfiles de expresión de genes y miRNAs relacionados con enfermedades cardiovasculares e inflamatorias.....	65
6.2. Las rutas de señalización intracelular asociadas a procesos cardiovasculares y al estado inflamatorio crónico mediado por el sistema inmune se encuentran activadas en los monocitos de pacientes con SAF.....	68
6.3. El análisis integrado de ARNm-miRNA ha permitido identificar una firma de genes alterados en SAF, interconectados entre sí y asociados a enfermedad cardiovascular, y potencialmente modulados por un conjunto específico de miRNA alterados.....	70
6.4. La alteración de la firma específica formada por los genes y sus miRNAs reguladores se validó en la cohorte completa.....	74
6.5. Los ensayos de transfección en monocitos de pacientes con SAF validaron experimentalmente la relación directa entre los miRNAs y sus ARNm diana e identificaron su influencia sobre su actividad celular.....	77

6.6. La alteración de la firma integrada por ARNm y miRNA fue estable en el tiempo y específica respecto a pacientes trombóticos sin enfermedad autoinmune.....	81
6.7. Potencial influencia del tratamiento estándar en SAF sobre la firma alterada de ARNm-miRNA en los monocitos de pacientes SAF.Los anticuerpos antifosfolípidos modularon el perfil molecular de los monocitos y promovieron disfunción endotelial.....	83
6.8. El análisis de cluster no supervisado de la firma integrada por ARNm y miRNAs en SAF, estratificó a los pacientes según su riesgo trombótico.....	84
7. Discusión.....	95
8. Conclusiones.....	103
9. Bibliografía.....	104
10. Anexos.....	114



RESUMEN

1. Resumen

Introducción: Estudios previos han demostrado que múltiples mecanismos pueden conducir al desarrollo de trombosis y aterosclerosis en pacientes con SAF, incluyendo el efecto sinérgico de autoanticuerpos y moléculas protrombóticas, receptores de adhesión, mediadores inflamatorios y diversas moléculas de señalización intracelular. Asimismo, en los últimos años se han producido importantes avances en la comprensión de las bases moleculares de la aterotrombosis en el SAF.

No obstante, aún se desconoce la relación entre los cambios ocurridos en los perfiles transcriptómicos de los monocitos de pacientes SAF, la presencia/títulos de autoanticuerpos y las manifestaciones clínicas.

El análisis integrado a nivel transcriptómico entre la expresión génica (mRNA) y sus reguladores negativos, los microRNAs (miRNAs), podría identificar nuevas redes de interacción moleculares subyacentes al desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV) en pacientes con SAF que contribuya al desarrollo de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas futuras.

Objetivo: Caracterizar fenotipos clínicos distintivos en pacientes con síndrome antifosfolípido (SAF) mediante el análisis integrado en plasma y monocitos de perfiles transcriptómicos e inflamatorios.

Pacientes y Métodos: Monocitos de sangre periférica de 40 pacientes SAF y 40 donantes sanos (DS) se purificaron mediante selección inmunomagnética negativa. El análisis del transcriptoma y el miRNoma a partir de ARN total se realizó utilizando las plataformas Agilent G4112F y nCounter (Nanostring) respectivamente. Mediante el software IPA se realizó un análisis integrado entre los miRNAs y genes diferencialmente

expresados que presentaban complementariedad en su secuencia como potenciales dianas. La red de interacción RNAm-miRNA identificada se analizó en una cohorte paralela de pacientes trombóticos no autoinmunes. Se evaluaron perfiles inflamatorios y CV en plasma mediante ensayos multiplex; la fosforilación de proteínas intracelulares se analizó mediante array PathScan. En paralelo se realizó un estudio clínico/analítico exhaustivo. In vitro, monocitos de DS se incubaron con AAF-IgG purificados y se evaluó su efecto sobre la expresión de genes/microARNs alterados.

Resultados: El análisis de microarrays en monocitos SAF identificó 547 genes diferencialmente expresados, implicados en trastornos inflamatorios, cardiovasculares (CV) y reproductivos, así como en patología renal y dermatológica. Análisis paralelos de activación de rutas intracelulares mostraron fosforilación de quinasas asociadas a trombosis e inflamación. El estudio del miRNoma reveló la expresión alterada de 22 microARNs, implicados en vías moleculares relacionadas con respuesta inmune y enfermedad cardiovascular (ECV). La integración molecular del transcriptoma y el miRNoma identificó una firma de 9 microARNs como moduladores potenciales de 17 genes. Dicha firma molecular se mostró estable en el tiempo y distinta de la identificada en una cohorte de pacientes trombóticos no autoinmunes. Estudios de transfección y ensayos de luciferasa establecieron la interrelación entre microARNs y sus genes diana, así como su implicación en la regulación de la actividad procoagulante y la adhesión celular en monocitos. Los estudios in vitro demostraron la modulación por AAF-IgG en monocitos de varios genes y microARNs, los cuales mediaron los efectos de dichos autoanticuerpos sobre la función endotelial.

La firma molecular identificada permitió la clasificación no supervisada de los pacientes SAF en 3 clústeres con perfiles clínicos distintivos. Así, en el clúster 1 se encontraban los pacientes con mayor alteración de la firma de genes y miRNAs identificados y mostraban una mayor incidencia de factores de riesgo CV, presencia de placas de ateroma y prevalencia de autoanticuerpos. Por el contrario, el clúster 3 englobaba a los pacientes con menor alteración de la firma molecular, caracterizados por una reducida prevalencia de factores de riesgo CV, menor incidencia de placas de ateroma y baja positividad para AAF. El clúster 2 caracterizaba a un grupo de pacientes con alteración clínico-molecular intermedia. Los citados perfiles se observaron asimismo paralelos a la presencia de patrones específicos de expresión de mediadores inflamatorios y CV en plasma.

Conclusiones: En su conjunto, el presente estudio demuestra que el análisis del perfil molecular obtenido con tecnologías de alto rendimiento y herramientas bioinformáticas avanzadas, en combinación con una caracterización clínica exhaustiva, constituye una aproximación experimental que permite identificar fenotipos clínicos relevantes distintivos, lo que podría favorecer en el futuro un manejo más personalizado de estos pacientes.



INTRODUCCIÓN

2. Introducción

2.1 Síndrome Antifosfolípido. Criterios diagnósticos y fisiopatología de la enfermedad.

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune multisistémica caracterizada por un estado de hipercoagulabilidad, involucrando tanto a vasos arteriales como venosos, y/o morbilidad obstétrica, acompañado de la presencia persistente de anticuerpos antifosfolípidos (AAF) en los que se engloban el anticoagulante lúpico (AL) los anticuerpos anti-cardiolipina (*aCL*), y los anticuerpos anti-beta2-glicoproteína I (*anti-β2GPI*).

En diversas situaciones clínicas como algunas infecciones, neoplasias malignas e incluso por inducción de fármacos también pueden encontrarse AAF, aunque en estos casos los anticuerpos suelen ser transitorios, con títulos bajos y sin una clara asociación con las manifestaciones clínicas del SAF.

El síndrome antifosfolípido se define como primario cuando no hay evidencia de enfermedad autoinmune, o secundario cuando está vinculado a otros procesos autoinmunes, principalmente el lupus eritematoso sistémico (LES)¹.

El SAF primario afecta predominantemente a adultos jóvenes de ambos sexos con una mediana de edad de 40 años, aunque se desarrolla principalmente en mujeres (ratio 5:1). Se estima que la prevalencia de SAF en la población general es de 40 a 50 por 100.000².

2.1.1 Criterios diagnósticos

Los criterios de diagnóstico iniciales, conocidos como criterios de Sapporo, se publicaron en 1999 y se actualizaron en 2006. Dichos criterios requieren que se cumplan al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio³.

2.1.1.1 Criterios clínicos

Debe confirmarse uno de los siguientes hallazgos clínicos para el diagnóstico de SAF:

Trombosis vascular

Uno o más eventos de trombosis arterial, venosa o de vasos pequeños de cualquier órgano. La trombosis debe confirmarse objetivamente con imágenes o análisis histopatológicos adecuados. La trombosis debe estar presente sin inflamación significativa de la pared del vaso. Un episodio trombotico en el pasado puede incluirse como criterio, siempre que haya sido debidamente confirmado por medios diagnósticos apropiados y no haya otra causa de trombosis.

Morbilidad del embarazo

- Una o más muertes fetales inexplicables de fetos morfológicamente normales (morfología fetal normal confirmada por ecografía o examen directo) a las 10 semanas de gestación o más.
- Uno o más nacimientos prematuros de recién nacidos morfológicamente normales antes de la semana 34 de gestación.

La prematuridad debe ser secundaria a eclampsia, preeclampsia grave o insuficiencia placentaria.

- Tres o más abortos espontáneos consecutivos antes de la décima semana de gestación tras descartar cualquier anomalía anatómica u hormonal en las causas cromosómicas de la madre y de los padres.

2.1.1.2 Criterios de laboratorio:

Se debe confirmar uno de los siguientes hallazgos de laboratorio para el diagnóstico de SAF.

- Detección de anticoagulante lúpico en plasma en dos o más ocasiones, con doce o más semanas de diferencia, según las directrices publicadas por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH).
- Detección de anticuerpos anticardiolipina IgG o IgM en suero o plasma en títulos moderados a altos (más de 40 GPL o más del percentil 99) medidos por ELISA estándar en dos o más ocasiones, con doce o más semanas de diferencia.
- Detección de anticuerpos IgG o IgM anti-beta-2-glicoproteína I en suero o plasma en títulos moderados a altos (por encima del percentil 99) medidos por ELISA estándar, en dos o más ocasiones, con doce o más semanas de diferencia.

En la tabla adjunta se detallan dichos criterios.

Antiphospholipid antibody syndrome (APS) is present if at least one of the clinical criteria and one of the laboratory criteria are met.	
CLINICAL CRITERIA	
1	Vascular thrombosis One or more documented episodes of arterial, venous, or small vessel thrombosis in any tissue. Thrombosis must be confirmed by objective validated criteria. For histologic confirmation, thrombosis should be present without significant vessel wall inflammation.
2	Pregnancy morbidity^a <ul style="list-style-type: none"> i. One or more unexplained deaths of a morphologically normal fetus at or beyond the 10th week of gestation, with normal fetal morphology documented by ultrasound or direct examination of the fetus, or ii. One or more premature births of a morphologically normal neonate before the 34th week of gestation because of eclampsia or pre-eclampsia diagnosed by standard definitions, or recognized features of placental insufficiency, or iii. Three or more unexplained consecutive spontaneous abortions before the 10th week of gestation, with maternal or hormonal abnormalities, and maternal and paternal chromosomal causes excluded.
^a Investigators are strongly advised to classify subjects with obstetrical morbidity according to groups a, b, and c in populations of patients with more than one type of pregnancy morbidity.	
LABORATORY CRITERIA^b	
1	Lupus anticoagulant (LA) present in plasma, on two or more occasions at least 12 weeks apart, detected according to the guidelines of the International Society of Thrombosis and Hemostasis.
2	Anticardiolipin antibody (aCL) of IgG and/or IgM isotype in serum or plasma, present in medium or high titer (>40 GPL or MPL, or > the 99 th percentile), on two or more occasions, at least 12 weeks apart, measured by a standardized ELISA.
3	Anti- β_2 glycoprotein-I antibody (anti- β_2 GPI) of IgG and/or IgM isotype in serum or plasma with a titer > the 99 th percentile, on two or more occasions, at least 12 weeks apart, measured by a standardized ELISA.
^b Investigators are strongly urged to classify APS patients into one of the following categories: I – more than one laboratory criteria present (any combination) IIa – LA present alone IIb – aCL present alone IIc – anti- β_2 GPI present alone	

Tabla 1. Criterios diagnósticos de SAF. Adapted from Miyakis et al. J Thromb Haemost. 2006;4:295–3061 (Shruti Chaturvedi, M.D and Keith R McCrae, M. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. Blood Rev 2017)

2.1.2 Fisiopatología del Síndrome Antifosfolípido

Las características clínicas del SAF varían significativamente entre pacientes, desde formas leves como sería el hallazgo de AAF en pacientes asintomáticos hasta formas graves con una morbimortalidad muy elevada como ocurre en el SAF catastrófico⁴.

La trombosis arterial y/o venosa y las complicaciones relacionadas con el embarazo son las características distintivas de la enfermedad. Sin embargo, pueden añadirse otras manifestaciones clínicas frecuentes no incluidas en la actualidad como criterio diagnóstico⁵.

2.1.2.1 Trombosis vascular

La trombosis venosa es más frecuente que la trombosis arterial, siendo la trombosis venosa profunda de las extremidades inferiores³ la afectación venosa más común (descritas hasta en un 20-30% de los pacientes con SAF). Otras localizaciones de trombosis venosa incluyen al territorio renal, pulmonar, hepático, portal, axilar, subclavio, ocular y cerebral, así como la vena cava inferior. También puede ocurrir trombosis venosa superficial con menor frecuencia.

La localización más común de trombosis arterial es la circulación arterial cerebral⁴, generalmente en forma de accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio. También pueden producirse oclusiones en arterias retiniana, coronaria, renal y mesentérica, entre otras.

La aparición de compromiso neurológico y/o cardíaco en pacientes jóvenes sin otros factores de riesgo cardiovascular debe hacer sospechar SAF.

2.1.2.2 Morbilidad del embarazo

Además de los eventos tromboticos, las complicaciones del embarazo son el otro sello distintivo del SAF. Estas complicaciones incluyen muerte fetal después de las 10 semanas de gestación, parto prematuro debido a

preeclampsia severa o insuficiencia placentaria, o abortos recurrentes precoces (<10 semanas de gestación). Los defectos genéticos y cromosómicos constituyen una causa común de aborto precoz en población general, y aunque es un criterio sensible, es menos específico para SAF.

La presencia de triple positividad para AAF (AL, aCL y anti-b2GPI), pérdidas de embarazo previas, antecedentes de trombosis y presencia concomitante de LES, son factores de riesgo de resultados adversos relacionados con el embarazo y pérdidas fetales en SAF. Otras complicaciones obstétricas incluyen preeclampsia, sufrimiento fetal, parto prematuro, retraso del crecimiento intrauterino, insuficiencia placentaria, desprendimiento de placenta y síndrome HELLP (complicación obstétrica caracterizada por la presencia de hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y plaquetopenia)¹⁻⁴.

2.1.2.3 Manifestaciones clínicas no incluidas en los criterios diagnósticos de SAF

Existe un conjunto de manifestaciones clínicas además de los eventos trombóticos y de la morbilidad obstétrica que, siendo frecuentes y estando relacionados con la presencia de AAF, no se han incluido en la actualidad como criterios diagnósticos para SAF. Destacan la presencia de livedo reticularis, valvulopatía cardíaca, epilepsia, microangiopatía renal y trombocitopenia entre otras. En la tabla adjunta se detallan las manifestaciones más frecuentes⁶

Table 2. Major Clinical Manifestations of the Antiphospholipid Syndrome That Are Not Included in the Revised Sapporo Classification Criteria.

Hematologic

Thrombocytopenia

More common: mild (platelet count, 50,000–150,000 per mm³), asymptomatic

Less common: severe (platelet count, <20,000 per mm³), with or without thrombotic microangiopathy

Hemolytic anemia

Without schistocytes, suggesting immune-mediated hemolytic anemia

With schistocytes, suggesting thrombotic microangiopathy

Renal

Acute thrombotic microangiopathy

Chronic vaso-occlusive lesions (cortical ischemia or infarction with arteriosclerosis, arteriolosclerosis, arterial fibrous intimal hyperplasia, glomerular ischemia, interstitial fibrosis, tubular thyroidization, tubular atrophy, organized thrombi with or without recanalization, or a combination of such lesions)

Cardiac

Valve vegetations or thickening (valve thickness >3 mm, thickening of the proximal or middle portion of the leaflet, or irregular nodules on the atrial face of the edge of the mitral valve, the vascular face of the aortic valve, or both)

Dermatologic

Livedo reticularis or racemosa

Livedoid vasculopathy (recurrent, painful skin ulcerations)

Neurologic

Cognitive dysfunction (in the absence of stroke)

Subcortical white-matter changes

Tabla 2. Principales manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido no incluidas en los criterios revisados de clasificación de Sapporo (David García, Doruk Erkan. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. N Engl J Med 2018 May 24;378(21):2010-2021).

2.1.2.4 Síndrome Antifosfolípido catastrófico

El SAF catastrófico (SAFC) es una complicación clínica poco frecuente en el SAF, ya que afecta a menos del 1% de los pacientes, pero puede desencadenar un fallo multiorgánico con una elevada mortalidad. Los criterios preliminares para la clasificación de SAFC se publicaron en 2003⁷.

Se caracteriza por trombosis en múltiples órganos en un corto espacio de tiempo, siendo las arterias pequeñas y medianas las más frecuentemente afectadas. La mayoría de los pacientes tienen afectación multiorgánica (y a menudo insuficiencia multiorgánica) en el momento de la presentación. Casi todos los órganos pueden verse afectados, variando de este modo la presentación clínica. La afectación renal es la más frecuente, seguida de afectación cerebral, pulmonar, cardíaca y cutánea⁸.

2.1.3 Anticuerpos Antifosfolípido

Los anticuerpos antifosfolípidos (AAF) representan un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas que pueden ser de isotipos IgA, IgM o IgG, dirigidos contra componentes fosfolipídicos de la membrana celular.

Existen diferentes fosfolípidos frente a los que actúan los AAF, entre los cuales algunos han demostrado ser muy relevantes en la patogenia de los fenómenos trombóticos, tales como la cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o fosfatidilcolina. Además, los AAF también pueden actuar frente a proteínas de unión a fosfolípidos o cofactores, como la β 2GP1, anexina V, proteínas C y S o la proteína de unión a la protrombina C4b⁹.

2.1.3.1 Anticuerpos anti-cardiolipina y anti-beta2-Glicoproteína I

Los anticuerpos anticardiolipinas (aCL) y los anti-beta2-Glicoproteína I (anti- β 2GP1) se detectan mediante técnicas de enzimo-inmunoanálisis¹⁰. Su expresión alterada, junto con la del anticoagulante lúpico (AL), conforman los criterios de laboratorio para el diagnóstico del SAF.

Como se ha comentado anteriormente, además de los criterios clínicos, el diagnóstico de SAF requiere la presencia de AL o títulos moderados-altos de anticuerpos aCL o anti- β 2GPI de isotipo IgG o IgM.

Es necesario igualmente que los niveles de dichos anticuerpos sean elevados (positivos en base a puntos de corte establecidos en cada caso) 12 semanas después de la prueba positiva inicial, para excluir anticuerpos positivos de forma transitoria o clínicamente sin importancia. Si esa duración es menor de 12 semanas, o el tiempo entre las manifestaciones clínicas y las pruebas de laboratorio confirmadas es mayor de 5 años, el diagnóstico de SAF es cuestionable³.

2.1.3.2 Anticoagulante lúpico (AL)

El llamado efecto "anticoagulante lúpico" (AL) es una propiedad funcional de un grupo heterogéneo de anticuerpos, cuyo nombre deriva de su descripción original en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Los anticuerpos con actividad AL interfieren con la coagulación en ensayos in vitro y prolongan los tiempos de coagulación dependientes de fosfolípidos, como el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)¹¹. Se trata de anticuerpos heterogéneos, predominantemente de isotipos IgG e IgM que se dirigen específicamente al componente fosfolípido de la membrana celular.

Los anticuerpos contra beta2GPI o PT son la causa más común de un efecto AL. En general, el AL asociado con anticuerpos anti-beta2GPI parece conferir un mayor riesgo trombótico que el AL independiente de β 2GPI. Además, el riesgo de trombosis aumenta con el número de AFF presentes. En particular, los pacientes con positividad para AL, aCL y

anticuerpos anti- β 2GPI (denominados SAF "triple positivo") tienen un mayor riesgo de un primer evento trombótico o recurrente.

La actividad de AL está fuertemente asociada con la trombosis y la pérdida del embarazo. No obstante, cabe destacar que puede hallarse AL positivo de forma transitoria en el contexto de ciertos medicamentos o infecciones y también pueden estar presentes en pacientes asintomáticos¹².

Es importante subrayar que se pueden observar resultados falsos positivos y falsos negativos en pacientes que toman heparina a dosis terapéuticas o anticoagulantes orales, por lo que su medida debe realizarse en condiciones bien controladas.

Aunque no existe una prueba única para detectar la presencia de AL, existe una prueba secuencial para determinarlo¹³. Como resumen, la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) establece que se deben cumplir cuatro criterios para confirmar la presencia de AL:

1. Resultado de coagulación prolongado en una de las dos pruebas de coagulación que dependen de los fosfolípidos, como PTT-AL o DRVVT.
2. Obtención de un resultado prolongado a pesar de mezclar el plasma del paciente con plasma normal .
3. Corrección o mejora del tiempo prolongado al agregar fosfolípidos adicionales.
4. Exclusión de otro inhibidor del factor de coagulación coexistente, como el factor VII.

2.1.3.3 Anticuerpos antifosfolípido no incluidos en criterios diagnósticos

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios que sugieren que varios autoanticuerpos no incluidos en los criterios de clasificación del SAF podrían ser relevantes para su patogénesis ^{14,15}.

Estos AAF, principalmente los anti-fosfatidil serina y anti-protrombina, además de incluir los isotipos IgA para aCL y anti-β2GPI, tienen una variedad de especificidades, uniéndose a varias dianas: a) dominio 1 de β2GPI, que no son el objetivo de los anticuerpos anti-β2GPI clásicos; b) proteínas plasmáticas involucradas en la cascada de la coagulación (como protrombina o el complejo fosfatidilserina-protrombina -aPS-PT-); c) anexina A5 y vimentina.

El papel clínico de estos anticuerpos, en particular su papel en la evaluación del riesgo trombótico, todavía se encuentra en discusión.

2.2 Estratificación del riesgo trombótico en SAF

La patogenia de la trombosis en el SAF es multifactorial, existiendo diversas situaciones clínicas que aumentan el riesgo de trombosis como factores dependientes del individuo, coexistencia con otras Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (EAS) y el tipo de AAF presentes.

Algunas situaciones protrombóticas y transitorias como infecciones, cirugía, inmovilización, embarazo, puerperio y toma de anticonceptivos orales podrían precipitar un evento trombótico en una situación predisponente.

Otros factores de riesgo de trombosis serían aquellos factores de riesgo cardiovascular clásicos como el tabaco, la hipertensión, la obesidad, la dislipemia y la diabetes que son de gran importancia en la predicción del riesgo de trombosis ya que todos pueden ser modificables.

Además, sabemos que la existencia de una enfermedad autoinmune sistémica subyacente, especialmente el LES por su frecuente asociación al SAF, confiere mayor riesgo de trombosis. El LES se asocia con un mayor riesgo de eventos tromboembólicos arteriales y venosos independientemente de los AAF, y la presencia de estos aumentaría dicho riesgo produciendo un aumento secundario del daño orgánico¹⁶.

En cuanto al tipo de AAF presentes, se ha descrito un perfil de "alto riesgo" definido como AL persistente, AAF doble positivo (cualquier combinación de AL, aCL o anti-beta2GPI) y AAF triple positivo (presencia de AL, aCL o anti-beta2GPI, especialmente con títulos elevados de aCL o anti-beta2GPI)¹⁷, provocando este último la situación de mayor riesgo trombótico como se describe más adelante.

Por esta razón, debido a la complejidad de la presentación clínica, la identificación de pacientes con presencia de AAF y mayor riesgo de desarrollar cualquier manifestación clínica de SAF (morbilidad trombótica y / o del embarazo) sigue siendo una necesidad clínica insatisfecha y sigue siendo un desafío importante en la práctica clínica habitual¹⁸.

La estratificación del riesgo tiene como objetivo principal identificar a los pacientes con un alto riesgo de desarrollar un resultado adverso durante un período de tiempo específico, para que puedan ser objeto de estrategias preventivas y posibles tratamientos de forma temprana.

Recientemente, Sciascia S. et al desarrollaron un índice de riesgo para las manifestaciones clínicas de SAF (GAPSS, del inglés *global antiphospholipid syndrome score*) que tiene en cuenta la combinación de factores de riesgo cardiovascular y el perfil de positividad para AAF. Estos incluyen hiperlipidemia, hipertensión arterial, aCL, anti-β2GPI, aPS-PT y AL¹⁹.

A pesar de la gran cantidad de datos que respaldan la utilidad de aPS-PT como biomarcador de diagnóstico y pronóstico, estos anticuerpos no están incluidos en la actualidad como criterio de laboratorio para el diagnóstico de SAF y, por lo tanto, aunque están disponibles, todavía no se utilizan de forma rutinaria en la práctica clínica²⁰. Por este motivo, también se diseñó el índice aGAPSS (del inglés, *Adjusted Global anti-Phospholipid Syndrome Score*), una versión complementaria del índice original, en el que se excluye aPS-PT. Este cálculo se realiza asignando un punto para la presencia de hipertensión arterial y tres puntos para la presencia de hiperlipidemia, cuatro puntos a la positividad para anticuerpos anti-β2GPI de isotipo IgG o IgM, cuatro puntos a la positividad para LA y cinco puntos a la positividad para anticuerpos aCL de isotipo IgG o IgM.

La potencial utilidad clínica de este score ha sido revisada sobre un total de 10 estudios incluyendo 2273 pacientes¹⁸. Los resultados indicaron que existían diferencias estadísticamente significativas entre el GAPSS y aGAPSS de pacientes que habían experimentado una trombosis arterial y/o venosa [GAPSS 10.6 (4.74) y aGAPSS 7.6 (3.95)], pacientes que no habían presentado ninguna manifestación trombótica [GAPSS 7.01 (5.46) y aGAPSS 4.9 (4.33)] y pacientes con morbilidad obstétrica [GAPSS 8.79 (2.59) y aGAPSS 6.7 (2.8)]. Los niveles más altos de GAPSS correspondían a pacientes con antecedentes de trombosis arterial [GAPSS 12.2 (5.2)] y

aquellos que habían experimentado recurrencias, tanto trombóticas como obstétricas [GAPSS 13.7 (3.1)].

2.3 Tratamiento

El tratamiento del SAF es variable en función del perfil del paciente. Existen diferentes recomendaciones para pacientes portadores asintomáticos de AAF (prevención primaria de trombosis), para prevenir las recurrencias una vez que se ha producido una trombosis, arterial o venosa (prevención secundaria), para el tratamiento de SAFV y para el tratamiento de las manifestaciones obstétricas. El manejo de las recurrencias trombóticas y de manifestaciones no incluidas en criterios de clasificación no está definido en la actualidad.

El primer paso en el tratamiento de pacientes que tienen AAF en ausencia de trombosis es la estratificación del riesgo según la edad, el perfil de AAF, los factores de riesgo concomitantes de trombosis destacando en este sentido los factores de riesgo tradicionales de enfermedades cardiovasculares, como el tabaquismo, la hipertensión, la diabetes y la hipercolesterolemia, así como la presencia de una enfermedad autoinmune sistémica activa¹.

El tratamiento del SAF se basa en la anticoagulación prolongada con un antagonista de la vitamina K oral (acenocumarol o warfarina), con asociación o no de AAS a dosis bajas en el caso de trombosis arterial, según las series. Es importante una monitorización de la intensidad de la anticoagulación, manteniendo un INR objetivo de forma individualizada. En el caso del SAFV el tratamiento está dirigido a prevenir más trombosis con anticoagulación y suprimir la cascada de citoquinas⁵. Cualquier

infección identificable que pueda haber precipitado el SAFC debe tratarse con los antibióticos apropiados. El tratamiento médico suele implicar una combinación de anticoagulación, glucocorticoides sistémicos, plasmaféresis e inmunoglobulina intravenosa (IGIV) ⁷⁻⁸.

El embarazo y el puerperio normalmente se asocian con un mayor riesgo de trombosis, y este riesgo es particularmente alto en pacientes con SAF². La estrategia actual para la prevención de complicaciones del embarazo en pacientes con SAF obstétrico es el uso de AAS en dosis bajas y heparina no fraccionada o de bajo peso molecular (HBPM).

La terapia antitrombótica para pacientes embarazadas con SAF varía dependiendo de si presentan un SAF trombótico previo o presentan únicamente SAF obstétrico. De este modo, se tratará con heparina a dosis profilácticas o terapéuticas en función de la situación previa y con AAS y/o HBPM en función del riesgo de pérdida fetal en el caso de SAF puramente obstétrico.

La adición de hidroxiclороquina se ha considerado como complemento del tratamiento antitrombótico para el SAF refractario a los anticoagulantes y como adición en la terapia estándar para el SAF obstétrico refractario a la HPBM y AAS⁵. Además, se han estudiado otras opciones terapéuticas complementarias (estatina, rituximab, eculizumab) pero no existen evidencias para establecerlo como tratamiento de rutina.

El manejo del SAF es complejo y desafiante. La importancia del objetivo de tratamiento radica en las complicaciones potencialmente graves y mortales que pueden experimentar los pacientes con SAF, como resultado de manifestaciones trombóticas, obstétricas y las no incluidas como

criterio de clasificación. La falta de ensayos clínicos en pacientes con SAF requiere enfoques empíricos para tratar de manejar las múltiples manifestaciones de este trastorno. El trabajo continuo para mejorar la comprensión de la fisiopatología del SAF es un requisito previo esencial para proporcionar una base y una justificación para el desarrollo de enfoques terapéuticos óptimos⁵.

2.4 Factores celulares y moleculares implicados en la patogénesis de la trombosis en el SAF

Se han propuesto numerosos mecanismos para explicar los procesos protrombóticos/proinflamatorios asociados al SAF, aunque la patogénesis parece ser multifactorial. Un proceso esencial es la activación monocítica, inducida por los AAF y asociada a la inducción de la actividad procoagulante e inflamatoria en dichas células, mediante la expresión y activación del factor tisular, los receptores activados por proteasas y el factor de crecimiento vascular endotelial, entre otros.

2.4.1 Alteraciones pro-trombóticas y pro-aterogénicas inducidas por AAF en células inmunes y del sistema vascular en el SAF.

Los pacientes SAF positivos para AL y con altos títulos de anticuerpos aCL y anti-B2GPI (conocidos como 'triples positivos'), muestran el riesgo más elevado de trombosis²¹. Asimismo, varios estudios han demostrado que dichos pacientes AAF-triple positivos frecuentemente muestran altos títulos de anticuerpos dirigidos contra el principal epítipo del dominio I de la B2GPI, lo cual les confiere

actividad dependiente de AL, y de este modo un elevado riesgo de trombosis²².

Numerosas moléculas, esenciales en el sistema hemostático, y que actúan como mediadores clave en el desarrollo de trombosis y aterosclerosis, se hallan alteradas en células del sistema inmune y vascular de pacientes SAF por efecto de los AAF, tales como el factor tisular, el eje VEGF/Flt1, varios receptores tipo toll (TLRs), anexinas, etc. Hace algunos años Cuadrado et al, describieron que el desarrollo de trombosis en pacientes SAF se asocia a la inducción de la actividad procoagulante en monocitos sanguíneos, mediante la activación del factor tisular (TF, del inglés, *tissue factor*), el principal iniciador de la coagulación sanguínea²³. La señalización intracelular asociada a dicha activación está mediada por los receptores activados por proteasas (PAR, del inglés, *protease activated receptors*, mediadores de respuestas críticas para la trombosis, la hemostasia y procesos inflamatorios y participantes en el desarrollo de arteriosclerosis), cuya expresión se encuentra incrementada en los monocitos de los pacientes con SAF²⁴. Estudios complementarios han demostrado que dicha señalización intracelular, inducida por los AAF, implica la activación constitutiva de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés, *mitogen-activated protein kinases*) y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB, del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)²⁵, así como la promoción de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés, *vascular endothelial growth factor*) y su receptor 1 del VEGF (Flt1, del inglés, *Fms-related tyrosine kinase 1*) en monocitos de estos pacientes²⁶. De

modo adicional, estudios proteómicos posteriores han conducido a la identificación de nuevas proteínas (cuya expresión se encuentra alterada por efecto directo de los AAF) implicadas en el desarrollo de trombosis y la activación de la respuesta inmune (i.e., proteína disulfuro isomerasa, anexina I y II, catalasa, ubiquitina-Nedd8, proteínas RhoA y Hsp60)²⁷.

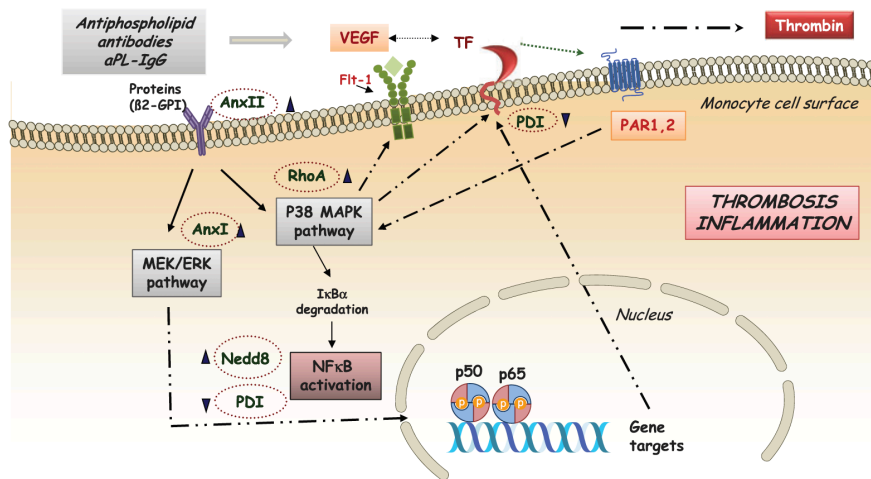


Figure 2. Activación del factor tisular y proteínas procoagulantes asociadas en el SAF. Los AAF inducen la expresión de TF, VEGF y su receptor Flt1, mediante la activación de la proteína MAPK/ERK y la translocación nuclear de NFκB dependiente de p38 MAPK en el monocito. Los receptores PAR1 y PAR2 están también implicados. ERK: extracellular-signal regulated kinase; MEK: mitogen activated protein kinase; MPAK: mitogen-activated protein kinase; PAR: protease-activated receptors; PDI: protein disulphide isomerase; TF: tissue factor. *Lopez-Pedreria et al., Rheumatology 2016.*

Los receptores tipo Toll (TLR)-2 y 4 son receptores de membrana conocidos por su papel en la activación de las células inmunitarias y endoteliales, el reconocimiento de patógenos y la producción de citoquinas. La vía de los TLR se ha observado también activada en los pacientes AAF con SAF, en los que las células mononucleares periféricas muestran un aumento significativo de la expresión génica de TLR2 y TLR4, asociado al desarrollo de anomalías vasculares inducidas por los AAF²⁸.

Estudios *in vivo* en ratones y experimentos *in vitro* en monocitos humanos y en una línea celular endotelial han demostrado que los TLR2 y TLR4 median la activación de los monocitos y las células endoteliales inducida por los AAF^{29,30}, lo que sugiere que estos receptores podrían considerarse un objetivo terapéutico para prevenir los efectos trombóticos de los AAF en el SAF.

Asimismo, los AAF también pueden activar las plaquetas, induciendo la expresión del receptor del fibrinógeno, la glicoproteína IIb/IIIa (GIIb/IIIa) y el tromboxano B2 (TXB2), promoviendo su agregación y, por tanto contribuyendo al desarrollo de la trombosis. Pierangeli y colaboradores describieron además otras dianas antigénicas potenciales para los AAF, que incluyen la protrombina, el activador tisular del plasminógeno (tPA), la fosfatidilserina (PS), la plasmina, la anexina II la proteína C activada (APC), la trombina, la antitrombina III (AT-III) y la anexina V³¹.

Por último, diversos estudios han demostrado que los AAF están asociados al desarrollo de aterosclerosis, de modo que *in vivo* se ha demostrado una correlación directa entre los niveles séricos de aCL y anticuerpos anti- β 2GPI y la aparición de síndrome coronario, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular³². Un estudio reciente desarrollado por nuestro grupo demostró una fuerte asociación entre títulos elevados de AAF-IgG y el desarrollo de eventos trombóticos, así como con la presencia de aterosclerosis precoz, demostrada por el aumento del grosor de la íntima-media (IMT)³³. *In vitro*, otros estudios confirmaron la participación de los AAF en la formación de la placa de ateroma, a través de la activación de células endoteliales y leucocitos y la inducción de la generación de células

espumosas, facilitando la adsorción de lipoproteínas de baja densidad oxidadas por los monocitos³⁴.

La imbricación de todas estas proteínas y mecanismos intracelulares resulta pues en la inducción de un estado procoagulante, proinflamatorio y proaterotrombótico en estos pacientes.

2.4.2 Aterotrombosis en el Síndrome Antifosfolípido.

La aterotrombosis (AT) es una respuesta inflamatoria crónica a nivel de la pared vascular, iniciada por la lesión del endotelio por efecto de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox, del inglés *Low density lipoprotein oxidized*) o por un proceso inflamatorio crónico y mantenida por la interacción entre lipoproteínas, macrófagos, linfocitos T y los componentes de la pared arterial (músculo liso y matriz extracelular).

En las enfermedades autoinmunes, como el SAF, se presentan eventos coronarios agudos sin que medien factores de riesgo tradicionales previos que los justifiquen como la hipertensión, la diabetes y la obesidad. El análisis de los mecanismos que llevan al desarrollo de una AT prematura y/o acelerada en el SAF permite establecer similitudes entre la aterogénesis y los procesos inflamatorios crónicos que caracterizan a esta enfermedad: incremento en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, aumento del reclutamiento de células proinflamatorias y activación de macrófagos, aumento en la expresión de citoquinas, factores de crecimiento y otros factores inflamatorios que interrelacionan los distintos tipos celulares. Así la presencia de una enfermedad autoinmune constituye un factor de

riesgo aterogénico de gran peso, ya que, aumenta la probabilidad de un evento trombótico en mayor grado y en menor tiempo que los factores de riesgo tradicionales.

Los AAF y otros autoanticuerpos presentes en SAF (como los anti-HDL -del inglés *anti-High density lipoprotein*- y anti-Apolipoproteína I) son también responsables del desarrollo de enfermedad cardiovascular y aterosclerosis a través de otros mecanismos complementarios que incluyen la formación de complejos anti-LDLox/anti- β 2GPI, lo que facilita o acelera la absorción de LDLox por los macrófagos³⁵, y su consecuente conversión en células espumosas. Además, tanto macrófagos como células endoteliales adhieren β 2GPI durante el proceso aterosclerótico, de modo que los AAF promueven la adhesión de los macrófagos al endotelio mediada por moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1, del *inglés Intracellular adhesion molecule-1*), VCAM-1, o E-Selectina. De hecho, se ha demostrado una correlación positiva entre los títulos de anticuerpos anti-cardiolipina y anti β 2GPI y la incidencia y severidad del síndrome coronario agudo, el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular ^{32,35-37}.

El desarrollo de una AT temprana podría verse igualmente facilitado por la existencia de un estatus inflamatorio en estos pacientes.

De modo resumido, la secuencia de inicio de formación de la placa aterosclerótica en estos pacientes implicaría la activación de las células endoteliales por efecto de los AAF, con la consecuente expresión de moléculas de adhesión que favorecería el reclutamiento de monocitos y linfocitos. Los monocitos activados migran hacia la íntima arterial, donde por acción de los complejos β 2GPI / LDLox se

vería incrementada la adsorción de LDLox, conduciendo a la formación de células espumosas. Estas células, junto a los linfocitos T producirían citoquinas, factores de crecimiento, TF, etc., promoviendo la proliferación de las células musculares lisas y la potenciación del proceso aterosclerótico (Figura 3).

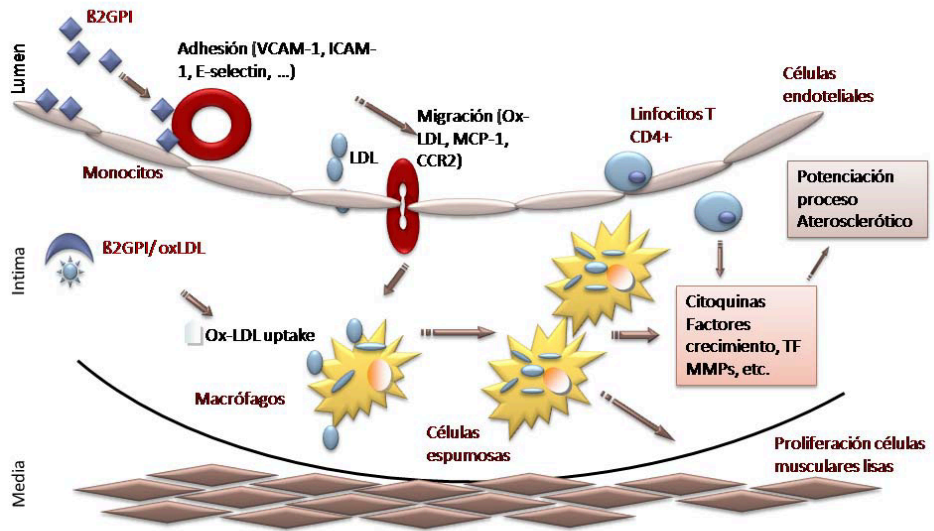


Figura 3. Implicación de los AAF en el desarrollo de la aterotrombosis en SAF. Abreviaturas: β2GPI, β2 glicoproteína I; CCR2, receptor de quimioquinas C-C tipo 2 (del inglés C-C chemokine receptor type 2); ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular-1 (del inglés Intracellular adhesion molecule-1); LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (del inglés Low density lipoprotein oxidized); MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos (del inglés Monocyte Chemoattractant protein 1); MMPs, metaloproteinasas (del inglés matrix metalloproteinases); TF, factor tisular (del inglés tissue factor); VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1 (del inglés Vascular cell adhesion molecule-1). Modificada de *Lopez-Pedreria et al., Rheumatology 2016*.

2.5 Factores genéticos de riesgo aterotrombótico en Síndrome Antifosfolípido

El desarrollo del SAF está fuertemente asociado a la presencia de diversas anomalías genéticas. Estudios familiares y poblacionales han indicado que los factores genéticos juegan un papel clave en la

etiopatogenia de este trastorno, lo que sugiere la existencia de una predisposición genética a esta enfermedad, ya sea cuando se presenta como un trastorno primario o en el contexto de LES³⁸. Esta predisposición puede explicarse por la influencia de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y fuera del MHC.

Así, ciertos genes del antígeno leucocitario humano (HLA) (HLA-DR y HLA-DQ) están fuertemente ligados a la presencia de autoanticuerpos AAF^{39,40,41}. Los alelos HLA más frecuentemente asociados al SAF son HLADRB1 04 (DR4), DRB1 07 (DR7), DRB1 1302 (DR6), DRw53, DQA1 0102, DQA1 0201, DQA1 0301, DQB1 0302 (DQ8), y DQB1 0604/5/6/7/9³⁸.

Varios de estos alelos HLA determinan la susceptibilidad para producir anticuerpos AAF (LA, aCL y anti-b2GPI) contra la protrombina, la anexina V y la fosfatidiletanolamina-fosfatidilserina, independientemente del contexto clínico, SAF primario o LES. De hecho, se han encontrado las mismas asociaciones entre los AAF y el sistema HLA en el SAF primario y en el SAF secundario al LES ^{39,40,41}. Además, el patrón de las asociaciones HLA también se ve influenciado por los diferentes grupos étnicos ⁴²⁻⁴⁴.

Otros genes, ajenos al MHC, contribuyen igualmente al desarrollo de la enfermedad. Así, las variaciones genéticas de diversos componentes del sistema hemostático, que favorecen la coagulación sanguínea, pueden modular la manifestación clínica de la trombosis⁴⁵:

1. Una variación de un solo nucleótido (SNV, del inglés, *single nucleotid variant*) del inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) se ha relacionado con niveles elevados de este

inhibidor en el plasma de los pacientes con SAF. Se trata de una variación común de inserción/delección de un solo nucleótido 4G/5G en la región promotora. Los individuos con alelo 4G tienen niveles plasmáticos de PAI-1 más altos que los individuos con el alelo 5G. Se han encontrado niveles elevados de PAI-1 asociados a títulos elevados de AAF en un tercio de los pacientes. A su vez, el genotipo 4G/5G se asoció con la aparición de ambos tipos de trombos, arteriales y venosos, especialmente con tromboembolismo venoso en pacientes SAF ⁴⁶⁻⁴⁸.

2. La vía de la proteína C es un modulador clave de la coagulación sanguínea, con actividad anticoagulante. En el SAF hay evidencia de una resistencia adquirida a la proteína C activada (PC), inducida por los AAF. El receptor endotelial de la proteína C (EPCR) podría tener una acción procoagulante al inhibir la activación de la PC. Se han encontrado niveles elevados de EPCR soluble en el LES, lo que sugiere su papel en el desarrollo de manifestaciones trombóticas. En este ámbito, se han descrito varios haplotipos del gen EPCR, PROCP, en función de los SNV (H1-H4). Así, T6333C, A6936G, G6147A, y todos en común se corresponden con H1, H3, H4 y H2, respectivamente. Las variantes del PROCP, T6333C y A6936G (H1 y H3), se han relacionado con los niveles de EPCR y la trombosis. Además, el haplotipo H1 se ha asociado a niveles reducidos de sEPCR y a un aumento de niveles de PC activada, lo que tendría un efecto protector contra la trombosis⁴⁹. En este sentido, un estudio reciente mostró menor prevalencia del haplotipo H1 de PROCR en pacientes con SAF y trombosis arterial⁴⁹.

3. La escisión proteolítica de la protrombina conduce a la trombina, el producto final de la cascada de la coagulación. Las alteraciones de la protrombina provocan múltiples desequilibrios en la hemostasia, ya que este factor tiene actividades procoagulantes, anticoagulantes y antifibrinolíticas. El SNV G20210A de la protrombina es una mutación genética común en la que la guanina se cambia por adenina en la posición 20210 y se ha asociado a un mayor riesgo de trombosis venosa en la población general⁵⁰. La frecuencia de la mutación G20210A del gen de la protrombina (F2) se ha observado significativamente aumentada en pacientes SAF con trombosis previa^{51,52}. Por lo tanto, esta mutación podría considerarse un importante factor de riesgo genético importante para las manifestaciones clínicas del SAF. Sin embargo, otros estudios realizados en pacientes con AAF positivo (LES) no encontraron asociación entre este SNV y la aparición de eventos trombóticos⁵³.

4. El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (el inhibidor natural del TF) puede regular la coagulación sanguínea mediante la inhibición del complejo factor VII activado por el factor tisular. La disminución de los niveles plasmáticos de TFPI se ha relacionado con la trombosis venosa profunda en el SAF^{54,55}. Se han estudiado varios SNV de TFPI en pacientes con SAF con o sin tromboembolismo venoso. Lincz et al., observaron una relación significativa entre las variaciones T33C y C399T (variaciones de un solo nucleótido en la región del intrón del gen TFPI) y la trombosis venosa en pacientes con SAF⁵⁶. Por lo tanto, la SNV del TFPI es otro factor de riesgo genético para el desarrollo de trombosis en el SAF.

5. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citoquina con un papel bien reconocido en la inflamación. Bertolaccini et al, informaron de altos niveles de esta molécula proinflamatoria en pacientes con SAF. Además, mostraron una mayor frecuencia del SNV G238A del gen TNF α , fuertemente relacionado con la trombosis arterial, lo que sugiere la importancia de este marcador genético para el desarrollo de trombosis⁵⁷.

6. La glicoproteína (GP) Ib y la GP Ia/IIa se unen al factor von Willebrand (vWF) y al colágeno, respectivamente, para mediar en la adhesión de las plaquetas a la pared vascular. La presencia de SNVs en estos genes podría aumentar la adhesión y agregación, predisponiendo al desarrollo de trombosis arterial y/o venosa. Por lo tanto, la frecuencia de los genes GPIa C807T SNV ha demostrado ser mayor en los pacientes con SAF que sufren trombosis en comparación con los que no tienen trombosis o los controles. Además, la frecuencia del polimorfismo T/C en la secuencia kozak de la GPIb-alfa se ha encontrado aumentada en los pacientes SAF con trombosis arterial en comparación con los pacientes con trombosis venosa, o pacientes SAF sin trombosis. Estos datos sugieren que estos dos polimorfismos pueden ser responsables de la aparición de trombosis en pacientes SAF^{58,59}.

7. La P-Selectina es una molécula de adhesión celular que media la adhesión y la rodadura de los leucocitos en las células endoteliales activadas, así como el reclutamiento de leucocitos a los trombos. Los niveles plasmáticos de p-selectina están aumentados en los pacientes con SAF⁶⁰. Un estudio de 40 pacientes con SAF mostró

un aumento de la prevalencia de una variación de un solo nucleótido asociada a la región de codificación de la p-selectina, G1902A, en comparación con los controles sanos. Entre los pacientes SAF, los que sufrieron eventos trombóticos presentaron una prevalencia significativa de este genotipo en comparación con los pacientes SAF sin trombosis⁶¹. Además, la interacción de la p-selectina en las plaquetas activadas o en las células endoteliales con la glicoproteína ligando de la p-selectina (PSGL-1) en los monocitos se considera relevante en procesos como la inflamación y la trombosis, ya que puede activar la expresión del FT. PSGL-1 presenta polimorfismos de varias repeticiones en tándem (VNTR). La frecuencia de este genotipo es elevada en los pacientes con SAF, especialmente en aquellos con trombosis⁶². Estos estudios apuntan a variaciones genéticas del sistema selectina-PSGL1 como determinantes de predisposición trombótica en pacientes con SAF.

8. Dos variaciones de un solo nucleótido en el gen de la glicoproteína b2 se han encontrado aumentadas en el SAF: G796T y G1004C, más conocidos por los cambios en la secuencia aminoácida; Val247Leu y Trp316Ser, respectivamente^{63,64}. La presencia de estos SNVs puede conducir a un cambio conformacional en b2GPI que afecta a la exposición de posibles epítomos, lo que a su vez puede favorecer la trombosis. Estudios previos sugirieron que la presencia del genotipo Val247Leu está relacionada con la producción de anticuerpos anti b2GPI. Sin embargo, la relación con la trombosis arterial o venosa no está clara⁶⁴. Del mismo modo, la presencia del SNV Trp316Ser puede aumentar el riesgo de SAF,

pero no hay relación con la trombosis ni con la producción de anticuerpos⁶³. Por lo tanto, podrían ser necesarios más estudios para evaluar la relación patogénica entre estos SNVs y la trombosis en el SAF.

9. Pierangeli et al. evaluaron la prevalencia de dos SNV en el gen del receptor Toll-like 4 (TLR4) en 100 pacientes con SAF: A896G y C1196T. Ambos SNV de TLR4 confieren una alteración en el dominio extracelular del receptor TLR4, que puede afectar a la unión de los ligandos. La frecuencia de estos dos SNVs se redujo significativamente en los pacientes SAF con trombosis en comparación con los donantes sanos²⁹. Estos dos SNV de TLR4 se supone que son protectores contra la trombosis. Por lo tanto la prevalencia reducida de estos polimorfismos en los pacientes con SAF podría sugerir una mayor susceptibilidad a la activación procoagulante del endotelio mediada por AAF²⁹.

Teniendo en cuenta todas estas alteraciones genéticas asociadas al SAF (en el locus MHC y fuera del MHC), cada vez está más claro que las interacciones entre más de una anomalía genética podrían determinar si un individuo desarrollará la enfermedad o sufrirá las diferentes manifestaciones clínicas.

2.6 Firmas de expresión génica asociada a aterotrombosis en pacientes con Síndrome Antifosfolípido

Como se ha descrito previamente, en los últimos años una serie de estudios han identificado varios genes implicados en la trombosis, la

inflamación y la disfunción endotelial en pacientes SAF (i.e., TF, PAR1, PAR2, VEGF, Flt1, IL8, TLR2 TLR4, etc.), la mayoría de los cuales muestran una mayor expresión en células que integran los sistemas inmunológico y vascular, incluyendo monocitos, plaquetas, neutrófilos y células endoteliales, todos los cuales favorecen la generación de trombina, y promueven una actividad procoagulante^{23,24,26,28-30}.

Patsouras et al.⁶⁵ informaron además de un aumento significativo de la expresión génica del factor plaquetario (CXCL4) y su variante, CXCL4L1, en las plaquetas de pacientes con SAF en comparación con el grupo de control y con los pacientes con LES.

CXCL4 y CXCL4L1 son quimiocinas producidas por las plaquetas durante la agregación. Están implicadas en una serie de procesos biológicos, tales como la inflamación, la coagulación sanguínea y la angiogénesis.

También muestran actividad antiangiogénica, induciendo la angiostasis al inhibir la proliferación de células endoteliales y la quimiotaxis. Ese estudio demostró que los pacientes con SAF que presentaban niveles elevados de CXCL4/CXCL4L1 en el plasma se caracterizaban más a menudo por tener IgG aCL, doble positividad o triple positividad, y presentaban más de 3 eventos trombóticos, lo que subraya la relevancia de la expresión aumentada de estas moléculas en la aparición de la trombosis.

Los recientes avances tecnológicos en el análisis de la expresión génica han permitido realizar amplios perfiles de expresión. Así, un estudio de Hamid C y colaboradores⁶⁶, utilizando matrices Affymetrix U133A-2.0, reveló una compleja red de genes modificados en respuesta al tratamiento in vitro con anticuerpos anti-b2GPI en HUVECs, incluyendo múltiples quimiocinas, citoquinas proinflamatorias, mediadores

protrombóticos y moléculas de adhesión. Además, el estudio demostró que algunos de estos genes regulados por anticuerpos anti-b2GPI podrían contribuir a la vasculopatía asociada a esta enfermedad.

Recientemente, Ripoll VM y cols analizaron los efectos in vitro de AAF procedentes de pacientes con SAF trombótico u obstétrico en monocitos, con el fin de identificar diferentes vías moleculares relacionadas con la patogénesis de estos subtipos clínicos de SAF⁶⁷. Así, los genes relacionados con la respuesta celular al estrés, la modulación de la señalización MAPK y las interacciones celulares fueron inducidos por las IgG aisladas de pacientes con trombosis vascular. Por el contrario, los genes asociados con la adhesión celular, la matriz extracelular y el desarrollo embrionario y esquelético fueron modulados por IgGs purificadas de pacientes con morbilidad obstétrica, lo que sugiere que las IgG de diferentes subtipos clínicos de SAF inducen perfiles genómicos específicos de la enfermedad en monocitos, asociados a diferentes mecanismos fisiológicos.

Utilizando la tecnología de microarrays, nuestro grupo identificó, in vivo, patrones genéticos compartidos y diferenciales relacionados con la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular en pacientes con SAF primario, SAF secundario a LES y LES. Así, el análisis de la expresión génica de los monocitos de estas tres cohortes de pacientes condujo a la segregación de dichos pacientes, que mostraron perfiles específicos asociados a las alteraciones pro-ateroscleróticas, pro-trombóticas y pro-inflamatorias.

Así, la firma genética específica en los monocitos de pacientes SAF incluyó principalmente genes implicados en la biogénesis y función mitocondrial, el estrés oxidativo y la defensa antioxidante, procesos directamente

relacionados con el desarrollo de la trombosis en esta patología⁶⁸. Además, esas alteraciones estaban relacionadas con los niveles de AAFs, hecho que se demostró mediante estudios in vitro, donde el tratamiento de monocitos sanos con AAF moduló la expresión de genes implicados en dichos procesos, tal como CCL2, IFIT1, PPAR gamma SLC25A27, ARHGEF5 e IL11RA⁶⁸.

Por último, una revisión sistemática reciente, mediante el uso de análisis bioinformáticos, identificó una serie de factores de riesgo genético en el SAF trombótico⁴⁵. Encontraron que dieciséis genes (CXCL4L1, P-Selectina, TLR2, TLR4, PAI-1, b2GPI, GP1a, GP1BA, PAR1, PAR2, TFPI, TF, VEGFA, FLT1, TNF y protrombina) contribuyen significativamente, mientras que seis (PLSCR1, PTPN22, ACAPMTS13, F13A1, ACE y F5) no estaban asociados con la trombosis en el SAF primario. Estos genes afectaban principalmente al sistema inmunitario y a las vías de coagulación sanguínea.

Además, los autores sugirieron que estos genes, expresados en 32 órganos diferentes, pueden suponer un mayor riesgo de desarrollar trombosis en cualquier parte del cuerpo de los pacientes con SAF primario.

Los datos globales sugieren que una compleja red de factores genéticos (que implican la alteración de la expresión génica, principalmente inducida por múltiples alelos y polimorfismos) que incluye mediadores inflamatorios, estrés oxidativo, moléculas protrombóticas, activadores de leucocitos y receptores de adhesión son responsables de la fisiopatología del SAF (Figura 1).

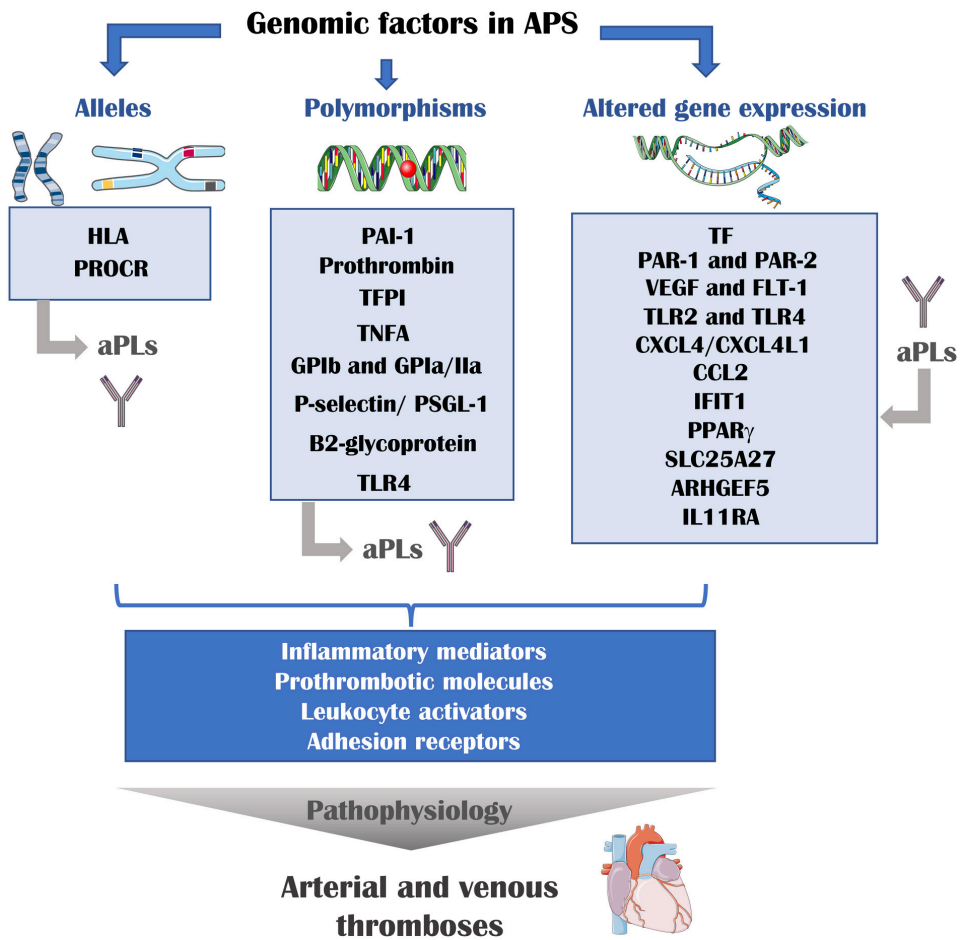


FIGURA 4.- Factores genéticos de riesgo de aterotrombosis en el SAF. Múltiples factores genéticos y de expresión a nivel transcripcional están implicados en la fisiopatología del SAF. La presencia de determinados alelos o polimorfismos se asocia con la presencia de AAFs y eventos trombóticos. Además, los AAFs pueden modular la expresión de varios genes. Estos genes codifican para mediadores inflamatorios, moléculas protrombóticas, activadores de leucocitos y receptores de adhesión, proteínas directamente implicadas en el desarrollo de la trombosis. HLA, human leukocyte antigen; PROCR, endothelial protein C receptor gene; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; TNFA, tumor necrosis factor A; GP, glycoprotein; TLR, toll-like receptor; TF, tissue factor; PAR, protease activator receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor; Flt-1, VEGF receptor 1; CXCL4, platelet factor 4; CXCL4L1, platelet factor variant 1; CCL2, C-C motif chemokine ligand 2; IFIT1, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1; PPAR gamma, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SLC25A27, Solute Carrier Family 25 Member 27; ARHGEF5, Rho guanine nucleotide exchange factor 5; IL11RA, interleukin 11 receptor subunit alpha. *Lopez-Pedreira et al., Front Immunol 2019.*

2.7 Mecanismos post-transcripcionales de regulación de la expresión génica en pacientes con Síndrome Antifosfolípido: microARNs

2.7.1 MicroARN celulares como biomarcadores de enfermedad en el Síndrome Antifosfolípido.

Estudios recientes han demostrado que el genoma humano produce miles de ARN no codificantes de proteínas (ARNnc) con función reguladora, tales como los microARNs (miRNA), pequeños ARN de interferencia y varias clases de ARNnc de larga cadena. Estos ARN cumplen funciones críticas como reguladores transcripcionales y postranscripcionales y como guías de complejos modificadores de la cromatina.

Entre ellos, los miRNAs son pequeños ARNnc que se expresan de forma ubicua, con una profunda influencia en la regulación de casi todos los procesos celulares investigados y cuyas alteraciones de expresión se observan en numerosas patologías humanas⁶⁹.

Los miRNAs controlan la expresión postranscripcional de genes mediante la desestabilización de los transcritos diana o la inhibición de la traducción de proteínas⁷⁰. En los seres humanos se han descrito hasta ahora más de 2.500 miRNAs, y su número sigue aumentando. Actúan como moduladores potenciales de la transcripción de más de 20.000 genes que codifican proteínas humanas.

El primer paso en la vía canónica de la biogénesis de miRNA es la transcripción de genes precursores de miRNA por la ARN polimerasa II/III. En el núcleo, el pri-miRNA generado es escindido por el complejo microprocesador Drosha y DGCR8 para generar un pre-miRNA. La proteína exportina 5 facilita el transporte del pre-miRNA al citoplasma, donde es nuevamente procesado por la RNasa Dicer. Esta enzima produce un

dúplex de miRNA de 5p y 3p de 22 pares de bases aproximadamente. Finalmente, una hebra se carga en la proteína Argonauta (AGO), generando el complejo miRISC (miRNA-induced silencing complex).

En los últimos años, están surgiendo vías no canónicas para la biogénesis de miRNA, incluyendo las que son independientes de Drosha o Dicer⁷¹.

Se ha demostrado que los miRNAs controlan una amplia gama de funciones fisiológicas como la embriogénesis, la diferenciación celular, la proliferación, la producción de citoquinas y la apoptosis.

Además, sus niveles alterados se han asociado a procesos fisiopatológicos como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, infecciones virales, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades relacionadas con la inmunidad, entre otras⁷².

El primer estudio que caracterizó el papel de los miRNAs en la patogénesis del SAF se publicó en 2011⁷³ (Tabla 2). Ese estudio identificó dos miRNAs como principales reguladores de la expresión del TF, receptor celular con actividad procoagulante implicada en el desarrollo de complicaciones trombóticas en el SAF como se ha mencionado anteriormente. Así, los niveles de expresión de miR-19b y miR-20a por RT-PCR en monocitos de pacientes con SAF y LES se hallaron significativamente reducidos en comparación con los donantes sanos y se correlacionaron negativamente con el aumento de la expresión de TF en la superficie celular de los monocitos de pacientes con SAF y LES. Este estudio sugirió por primera vez el papel potencial de los miRNAs en la patogénesis de la trombosis en pacientes SAF. Sin embargo, el mecanismo por el que tanto miR-19b como miR-20a se reducen en los monocitos de estos pacientes es aún desconocido.

En un estudio posterior, identificamos y caracterizamos varios miRNAs relacionados con la enfermedad cardiovascular presente en pacientes con SAF⁷⁴. Dichos miRNAs actúan como reguladores clave de genes dianas asociados a diversos perfiles clínicos del SAF, tales como la aterosclerosis, la trombosis, la respuesta inmunitaria y el estrés oxidativo: miR-124a-3p, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, y miR-222-3p.

Los niveles de estos miRNAs se hallaron reducidos en los neutrófilos purificados de pacientes SAF en relación con donantes sanos. En paralelo, la expresión de moléculas relacionadas con la biogénesis de miRNAs, como como Dicer, Drosha, Exportin-5, Argonaute-1 y Argonaute-2, se encontraron disminuidas en dichos pacientes.

En monocitos purificados de pacientes SAF, se observó una reducción significativa en los niveles de miR-124a y miR-125a, mientras que los niveles de miR-155 y miR-146a aparecieron aumentados. Además, los niveles alterados tanto de dichos miRNAs como de sus proteínas de biogénesis, correlacionaron con marcadores de trombosis, inflamación y estrés oxidativo, y se asociaron a la presencia de eventos trombóticos, así como con el aumento del grosor de la íntima media de la carótida (CIMT). El tratamiento in vitro de monocitos y neutrófilos aislados de donantes sanos, con AAF-IgG purificada a partir del suero de pacientes SAF promovió una alteración de los niveles de estos miRNAs, junto con los de sus proteínas de biogénesis. Adicionalmente, el papel patogénico de los AAF en la expresión de miRNAs se vio respaldada por el hecho de que los pacientes positivos para AAFs mostraron una desregulación específica de miRNAs en relación con los que no tenían dichos autoanticuerpos.

Por otra parte, el estudio en una cohorte paralela de 20 pacientes no autoinmunes (AAF negativos) con eventos trombóticos previos mostró una alteración de miRNAs diferente a la observada en los pacientes trombóticos con SAF (AAF positivo).

En conjunto, estos resultados establecieron que: (1) Varios miRNA específicos podrían considerarse potenciales biomarcadores de la activación inmunitaria y desarrollo aterotrombótico en el SAF. (2) Los anticuerpos antifosfolípidos están implicados en la expresión desregulada tanto de los miRNAs asociados a la enfermedad cardiovascular como de las proteínas de biogénesis de los mismos en los leucocitos de pacientes SAF.

En un estudio reciente⁷⁵, van den Hoogen L et al. analizaron los perfiles de expresión de miRNAs y mRNAs en células dendríticas plasmocitoides (pDC), principales productoras de IFN-gamma en el SAF y el LES. Observaron una reducción global de la expresión de miRNAs en todos los grupos de pacientes, relacionada con su estatus de actividad. No obstante, los perfiles de miRNAs entre los pacientes con LES, LES + SAF y SAF primario no mostraron diferencias significativas. Además, la disminución global de miRNAs parecía no debía deberse a alteraciones de la maquinaria de biosíntesis de miRNA, ya que las proteínas de biogénesis de miRNA no mostraron una expresión alterada.

Sin embargo, la expresión de miRNAs en los pDCs estaba relacionada con la firma de IFN de tipo I en los pDC, de modo que la expresión de miRNAs se redujo significativamente en los pacientes con una firma de IFN alta. En concreto, tres miRNAs (miR-361-5p, miR128-3p y miR-181-2-3p) se expresaron a niveles más bajos en los pacientes con alto nivel de IFN y se

encontraron regulados a la baja en pDC activadas por el agonista de TLR7 R837 (imiquimod). El análisis de enriquecimiento de rutas moleculares reveló que los genes regulados al alza y estos tres miRNAs estaban implicados en la activación y apoptosis de las pDCs. Estos resultados sugieren que las alteraciones en la expresión de miRNAs pueden tener un papel clave en la regulación de la actividad de las pDCs y la inmunopatología del SAF (Figura 2).

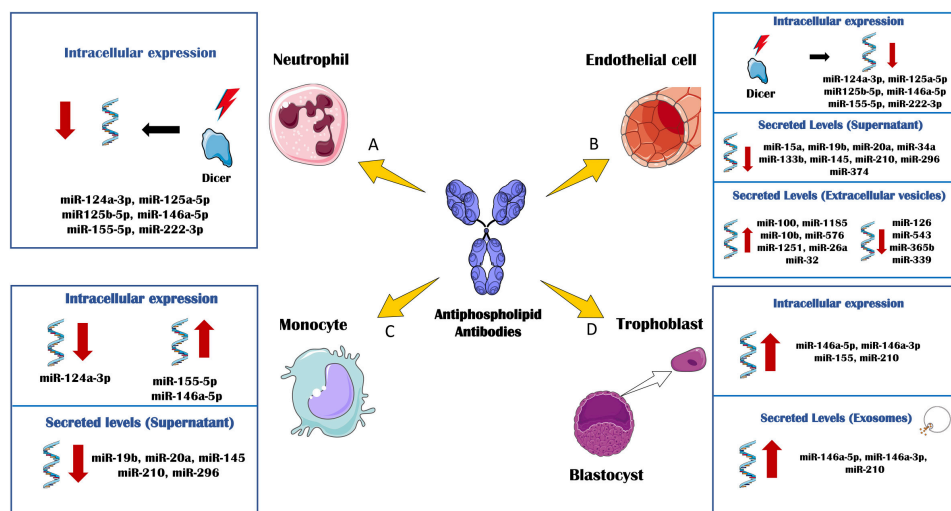


Figura 5. miRNA celulares y circulantes diferencialmente expresados en pacientes con SAF en respuesta al tratamiento in vitro con AAF.

El tratamiento in vitro de varias células inmunes y vasculares con AAF, ha permitido delinear la regulación de los niveles celulares y extracelulares de miRNAs asociados a la patología del SAF. (A) El tratamiento con AAF-IgG de neutrófilos purificados de donantes sanos promovió la regulación a la baja de DICER y otras proteínas de biogénesis de miRNAs relacionadas. En consecuencia, los niveles intracelulares de varios miRNAs, se redujeron. (B) Células endoteliales obtenidas de vena umbilical humana (HUVEC) cultivadas en presencia de AAF-IgGs, mostraron una regulación a la baja de las proteínas DICER y de biogénesis de miRNAs junto con los niveles intracelulares de diversos miRNAs. Los AAF también mostraron efectos reguladores del perfil de miRNAs circulantes. Los niveles de secreción de diversos miRNAs se redujeron en el sobrenadante de las HUVEC tratadas con AAF-IgGs en comparación con el control IgG. El tratamiento de HUVECs con anticuerpos β 2GPI promovió asimismo la secreción de vesículas extracelulares con un perfil específico de miRNAs, en relación con el tratamiento con IgG control. (C) El tratamiento con AAF-IgGs en monocitos aislados de donantes sanos, promovió la deregulación de los niveles intracelulares de varios miRNAs. Igualmente los niveles secretados de diversos miRNAs se redujeron en el sobrenadante de monocitos sanos

tratados con AAF-IgGs purificados de pacientes con SAF en comparación con el tratamiento con IgGs de control. (D) El cultivo de la línea celular del trofoblasto humano del primer trimestre HTR8, en presencia de anticuerpos β 2-GPI elevó los niveles intracelulares de cuatro miRNAs. Paralelamente, los exosomas secretados derivados del tratamiento con anticuerpos β 2GPI en estas células, mostraron niveles aumentados de tres miRNAs. *Lopez-Pedreira et al., Front Immunol 2019.*

2.7.2 MicroARN circulantes como biomarcadores de enfermedad en el Síndrome Antifosfolípido.

Los estudios realizados sobre el papel de los miRNAs circulantes como potenciales biomarcadores diagnóstico y pronóstico en muchas enfermedades han crecido exponencialmente en la última década.

Los miRNAs están presentes en casi todos los fluidos corporales humanos (incluyendo sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido seminal y pleural) como consecuencia de la muerte celular necrótica o apoptótica, o bien por una liberación activa. Cada vez hay más pruebas que ponen de manifiesto el papel de los miRNAs en la comunicación entre células, de modo que se ha demostrado su capacidad de regular la expresión génica fuera de la célula de origen.

Los miRNAs circulantes están encapsulados en exosomas y/o proteínas y lipoproteínas, por lo que están protegidos de los de las ARNasas endógenas, lo que los hace estables y adecuados para análisis no invasivo en muestras de pacientes⁷⁶.

Se ha demostrado que el perfil circulante de miRNAs podría tener potencial como biomarcador de diagnóstico, respuesta terapéutica y pronóstico en patologías cardiovasculares y enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis sistémica, la artritis reumatoide y el LES.

En este sentido, nuestro grupo ha analizado recientemente la firma de miRNAs circulantes en el SAF y su posible papel como biomarcadores de la enfermedad y su perfil aterotrombótico en una cohorte de 90 pacientes⁷⁷(Tabla 1). Dicho análisis identificó 39 miRNAs expresados de forma diferencial en el SAF, incluyendo 19 incrementados y 20 reducidos.

Las herramientas bioinformáticas permitieron identificar un conjunto de ellos que mostraban potenciales ARNm diana implicados en la fisiopatología del SAF. Once miRNAs fueron validados en la cohorte completa de pacientes, incluyendo los miRNAs 34a-5p, 15a-5p, 133b-3p, 145a-5p, 124-3p, 20a-5p, 19b-3p, 210-3p, 206, 296-5p y 374a-5p. La firma generada por estos miRNAs permitió identificar a los pacientes con SAF con una marcada precisión (AUC de 0,81), asociada a la presencia tanto de pérdidas fetales como de distintos tipo de trombosis (arterial o venosa), y correlacionó con parámetros relacionados con inflamación y trombosis (TF, PAI-1, VEGF-A, VEGF-R1 y MCP-1). En consonancia con estos hallazgos, el análisis de clustering permitió diferenciar 3 grupos de pacientes con SAF que representaban diferentes grupos de riesgo trombótico, con diferencias significativas entre los grupos para varias proporciones de miRNAs. Entre ellas, los ratios generados por miR-124, miR-19b y miR-296 se asociaron con un mayor CIMT, reconociendo así pacientes con SAF con aterosclerosis temprana. Estos resultados demostraron el papel potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores de aterotrombótico en el SAF.

También pudimos comprobar que la firma de miRNAs plasmáticos se mantuvo estable en el tiempo tras el análisis de muestras de los mismos pacientes 3 meses después de la primera toma de muestras. Además, la especificidad de la firma de miRNA en el SAF también se demostró en

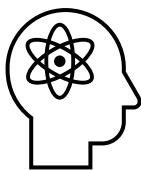
relación con los pacientes con LES negativos para AAF y con los pacientes trombóticos no autoinmunes.

Por otra parte, se observó una correlación significativa entre la firma de miRNA circulantes en SAF y los títulos de AAF. Asimismo, el tratamiento in vitro de monocitos y células endoteliales (CE) de donantes sanos con IgG-aCL purificada del suero de pacientes con SAF, promovió una desregulada de miRNAs y proteínas diana en el sobrenadante del cultivo. Estos resultados demostraron los efectos patológicos de estos autoanticuerpos, que también modulan el perfil de miRNAs circulantes encontrado en pacientes SAF relacionado con su estado aterotrombótico.

Igualmente, un estudio realizado por Wu et al.⁷⁸, reveló que el tratamiento de las CE con anticuerpos anti b2GPI aislados de pacientes con SAF promovía la secreción de vesículas extracelulares (EVs, del inglés extracellular vesicles), cuyo contenido de miRNAs era diferente del secretado tras el tratamiento con un IgG no inmune. En concreto, el tratamiento con anticuerpos anti-b2GPI indujo la expresión de miR-100, miR-1185-1, miR-10b, miR-576, miR-1251, miR-26a y miR-32, mientras que los niveles de miR-126, miR-543, miR-365b y miR-339 se redujeron. Las EVs secretadas tras la exposición a los AAF, se enriquecieron en IL1b y componentes del inflammasoma, los cuales, a su vez, fueron capaces de activar las células endoteliales no estimuladas. Así, ese estudio sugirió que las alteraciones en el perfil de miRNA puede contribuir a la capacidad de las microvesículas, derivadas de CE tratadas con AAF, para activar dichas células de forma autocrina o paracrina.

Curiosamente, los miRNAs circulantes también podrían tener un papel potencial como biomarcadores en el SAF obstétrico. Gysler et al.⁷⁹

identificaron que las pacientes con SAF y resultados adversos del embarazo expresaban niveles significativamente más altos de miR-146a-3p en comparación con las "embarazadas sanas". Además, el tratamiento *in vitro* de una línea celular de trofoblastos con AAF de pacientes con SAF aumentó significativamente la expresión celular y exosomal de miRNAs asociados a la señalización TLR, incluyendo miR-146a-5p, miR-146a-3p, miR-155 y miR-210. También se observó que la regulación al alza de miR-146a-3p contribuyó a la patogénesis del SAF obstétrico, promoviendo la secreción de interleucina 8 (IL-8) mediante la activación del sensor de ARN, TLR8.



HIPÓTESIS

3. Hipótesis

Estudios previos han demostrado que múltiples mecanismos pueden conducir al desarrollo de trombosis y aterosclerosis en pacientes con SAF, incluyendo el efecto sinérgico de autoanticuerpos y moléculas protrombóticas, receptores de adhesión, mediadores inflamatorios y diversas moléculas de señalización intracelular.

La patogénesis de la aterosclerosis y la trombosis en SAF involucran a diversos tipos de células del sistema inmunitario, entre las que los monocitos desempeñan un papel clave. Varios estudios han demostrado múltiples alteraciones en la activación y las funciones secretoras de los monocitos circulantes y tisulares, asociadas a la inducción de una mayor actividad procoagulante, principalmente relacionada con la sobreexpresión del factor tisular y la producción de autoanticuerpos. Asimismo, su capacidad fagocítica y su actividad como células presentadoras de antígenos están alteradas en estos pacientes. Consecuentemente, el análisis de los perfiles moleculares que tipifican los monocitos del SAF puede proporcionar una forma eficaz de identificar subconjuntos heterogéneos de pacientes para la identificación y caracterización de nuevas terapias dirigidas.

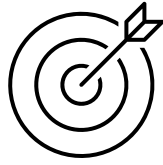
En los últimos años se han producido importantes avances en la comprensión de las bases moleculares de la aterotrombosis en el SAF.

No obstante, aún se desconoce la relación entre los cambios ocurridos en los perfiles transcriptómicos de los monocitos de pacientes SAF, la presencia/títulos de autoanticuerpos y las manifestaciones clínicas.

El desarrollo de nuevas tecnologías de alto rendimiento, unido al avance en la generación de nuevas herramientas computacionales para analizar grandes cantidades de datos, han permitido una mejor caracterización de la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes.

Así, análisis que combinen la información tanto a nivel clínico como molecular en un abordaje de carácter multidisciplinar donde se integren análisis moleculares, caracterización clínica y herramientas bioinformáticas, podría ser una aproximación innovadora para profundizar en el entendimiento del síndrome antifosfolípido.

Por lo tanto la hipótesis de esta tesis consiste en que el análisis integrado de diferentes componentes transcriptómicos relacionados como los ARNm y miRNAs en los monocitos y una extensa caracterización clínica de los pacientes con SAF utilizando herramientas bioinformáticas y validaciones *in vitro*, permitiría la identificación de nuevos biomarcadores y vías alteradas en la enfermedad, así como nuevos fenotipos clínicos relevantes distintivos.



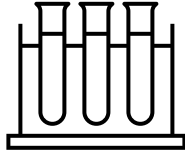
OBJETIVOS

4. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización clínica y molecular de los pacientes con SAF para la identificación de fenotipos clínicos distintivos que permitan un abordaje personalizado y el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el perfil de expresión génica y de miRNAs alterado en monocitos de pacientes con SAF.
2. Analizar el papel de los anticuerpos antifosfolípido en la alteración molecular presente en monocitos y células endoteliales.
3. Integrar los perfiles de genes y miRNAs alterados para identificar redes de interacción específicas asociadas a la fisiopatología del SAF.
4. Identificar fenotipos distintivos clínicamente relevantes utilizando los resultados derivados del análisis molecular integrado.



MÉTODOS

5. Métodos

5.1 Pacientes

En este estudio se reclutaron 40 pacientes diagnosticados con SAF primario y 40 donantes sanos (DS) durante un período de 24 meses. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital de Sofía de Córdoba (España) y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente. El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. La selección de los pacientes se realizó teniendo en cuenta una serie de criterios entre los que se encuentran la presencia de un estatus de la enfermedad estable durante los últimos 6 meses en ausencia de complicaciones relacionadas con infección, aborto espontáneo, trombosis o cambio en el régimen de tratamiento.

Para cada paciente se calculó el índice aGAPSS (del inglés, *Adjusted Global anti-Phospholipid Syndrome Score*). Como hemos comentado previamente, el cálculo de dicho índice se realiza sumando una serie de puntos asignados a factores de riesgo cardiovascular independientes y al perfil de anticuerpos antifosfolípido⁸⁰.

Entre los pacientes con SAF, 18 habían sufrido eventos trombóticos recurrentes, 16 habían presentado morbilidad durante el embarazo y 20 mostraban aterosclerosis precoz, tras analizar el grosor de la íntima media carotídea (CIMT, del inglés *carotid intima-media thickness*). Ninguno de los DS presentaba antecedentes de enfermedad autoinmune, trastornos hemorrágicos, trombosis o abortos.

Los perfiles clínicos y de laboratorio de los pacientes con SAF y DS se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 1**)

	DS (n=40)	SAF (n=40)	p
Parámetros clínicos			
Mujeres/Hombres, n	26/14	27/13	n.s.
Edad, años (media ± DS)	47 ± 10	52 ± 10	n.s.
Trombosis, n	0/40	30/40	
Trombosis Arterial, n	0/40	24/40	
Trombosis Venosa, n	0/40	7/40	
Recurrencias, n	0/40	18/40	
Morbilidad Obstétrica, n	1/40	16/40	
CIMT patológica, n	2/40	20/40	
Positividad para LA, n	0/40	37/40	
Positividad para aCL, n	0/40	16/40	
Positividad para Anti-β2GPI, n	0/40	13/40	
Hipertensión arterial, n	3/40	11/40	
Hiperlipidemia, n	18/40	18/40	
aGAPSS, (media ± DS)	NA	8.73 ± 3.82	
Disfunción endotelial			
Área de Hiperemia (AH)	3462,2 ± 412,4	2077,7 ± 288,5	*
PF-RF	58,70 ± 5,12	41,40 ± 4,30	*
Tratamientos			
Antiplaquetarios, n	0/40	18/40	
Anticoagulantes, n	0/40	13/40	
Prednisona, n	0/40	5/40	
Estatinas, n	0/40	18/40	
Hidroxicloroquina, n	0/40	3/40	
Parámetros de Laboratorio			
Colesterol total, mg/dL	197 ± 25	191 ± 32	n.s.
Colesterol HDL, mg/dL	52 ± 14	52 ± 14	n.s.
Colesterol LDL, mg/dL	126 ± 18	113 ± 32	*
Triglicéridos, mg/dL	91 ± 57	130 ± 88	*
PCR, mg/dL	0.9 ± 1.3	3.5 ± 4.7	*
VSG, mm/h	7.6 ± 4.8	12.4 ± 11.9	*

Tabla 1. DS= Donantes sanos; SAF= Síndrome Antifosfolípido; LA= Anticoagulante Lúpico; aCL= Anticuerpos anticardiolipina; Anti-β2GPI= Anticuerpos anti beta-2 glicoproteína; PF-RF= valor de perfusión máximo tras liberar la oclusión (PF, del inglés *peak flow*)-valor de perfusión basal (RF, del inglés *rest flow*); PCR= Proteína C Reactiva; VSG= Velocidad de Sedimentación Globular; n.s.= no diferencias significativas; *, diferencias significativas (p value<0.05).

De forma paralela, también se analizó una cohorte adicional de 20 sujetos que presentaban trombosis previas en ausencia de una enfermedad autoinmune asociada, para analizar la especificidad de las alteraciones presentes en los pacientes con SAF. Esta cohorte estaba constituida por 12 mujeres no embarazadas y 8 hombres de 48 años de edad media (rango: 25-72 años), de los cuales 10 presentaban episodios de trombosis venosa profunda y otros 10 de trombosis en vasos cerebrales.

5.2 Recogida de muestras sanguíneas, aislamiento celular y análisis de parámetros bioquímicos

La sangre periférica de cada participante se recogió mediante venopunción directa en tubos conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, así como en aquellos tubos específicamente destinados a la obtención del suero. El volumen de sangre extraído en total fue de 50 mL. Para evitar cambios en la composición de la sangre promovidas por la dieta y el ritmo circadiano, las muestras se recogieron siempre a primera hora de la mañana y después de al menos 8 horas de ayuno.

Para el aislamiento de plasma, las muestras de sangre se procesaron mediante centrifugación a 2000 × g durante 10 minutos a temperatura ambiente, mientras que para la obtención del suero la sangre se centrifugó a 3500 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente,

siempre dentro de las 4 horas posteriores a la recogida. A continuación, tanto el suero como el plasma se transfirieron a tubos *ependorf* libres de ARNasa y se almacenaron a -80 ° C hasta su análisis posterior.

Parte de los tubos de sangre en EDTA se destinaron para el aislamiento de monocitos donde se realizaron la mayor parte de las determinaciones moleculares. En primer lugar, se realizó un gradiente de densidad en Ficoll donde se purificó la fracción leucocitaria mononuclear. Posteriormente se realizó la separación de monocitos mediante depleción inmunomagnética negativa a través de un kit comercial (Monocyte Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Tras el aislamiento de los monocitos se procedió a confirmar la pureza de la muestra mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD14 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (96,8% ± 3,2 de monocitos vivos).

Los parámetros bioquímicos indicativos de inflamación como los reactantes de fase aguda (PCR y VSG), los parámetros clínicos (trombosis arterial o venosa, morbilidad del embarazo) y los factores de riesgo tradicionales de aterosclerosis (obesidad, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, apolipoproteínas A y B) se evaluaron como parte del seguimiento de rutina de los pacientes.

5.3 Determinación del grosor de la íntima media carotídea mediante ecografía Doppler

Para analizar la presencia de aterosclerosis temprana mediante el análisis de CIMT, se realizó un estudio ultrasonográfico con un ecógrafo Toshiba (Aplio).

Los pacientes fueron examinados en posición supino con la cabeza a 45 ° opuesta al lado de exploración. Se evaluaron tres segmentos de la arteria carótida: la arteria carótida común, el bulbo carotídeo y la arteria carótida interna. En cada segmento, se obtuvieron imágenes de las paredes cercanas y lejanas de la arteria carótida derecha e izquierda en 2 ángulos diferentes. Para cada imagen se calculó la distancia máxima del espesor íntima-media definido como "IMT máximo". La presencia de placas ateroscleróticas o un CIMT patológico se definió como una protrusión en el lumen mayor al 50% del CIMT adyacente o CIMT > 1,5 mm.

5.4 Estudio de la función endotelial: láser Doppler lineal Periflux 5010

El análisis de la función microvascular se realizó mediante flujometría láser Doppler, analizando la respuesta a la hiperemia reactiva, medida como el aumento del flujo sanguíneo que se produce después de la oclusión temporal del mismo mediante el uso de una sonda cutánea adherida a la parte interna del antebrazo.

La prueba de la hiperemia reactiva tras la oclusión (*PORH*) (del inglés, *Post Occlusive Reactive Hyperemia*) se realiza obteniendo en primer lugar una medida basal de flujo sanguíneo de referencia durante 2 minutos seguida de un período de oclusión de 4 minutos. A continuación, se retira el manguito y se analiza la respuesta de *PORH* durante otros 3 minutos. Con esta técnica se obtienen los siguientes parámetros: perfusión basal (RF) (del inglés, *rest flow*), valor de perfusión máximo tras de la liberación de la oclusión (PF) (del inglés, *peak flow*) y área de hiperemia (AH) (del inglés, *hyperemia area*).

5.5 Array de proteínas de señalización intracelular (*PathScan Array*)

El array de proteínas *PathScan* (*Cell Signaling Technology, USA*) permitió la detección simultánea del estado de activación (fosforilación o escisión) de 18 moléculas de señalización intracelular como ERK1/2, STAT1, STAT3, AKT, AMPKa, proteína ribosómica S6, mTOR, HSP27, Bad, quinasa P70 S6, PRAS40, p53, p38, SAPK/JNK, PARP, Caspase-3 y GSK-3b. Este array se llevó a cabo a partir de 10 µg de proteína total (75 µl) procedentes de monocitos purificados de pacientes con SAF y DS. Una vez que el lisado fue incubado en los cristales que contienen anticuerpos específicos para cada proteína, se le añadió una mezcla de anticuerpos biotinilados que fueron reconocidos por estreptavidina conjugada con actividad peroxidasa (HRP). Finalmente, la adición del reactivo LumiGLO permitió la visualización del ensayo mediante quimioluminiscencia en un sistema de imagen digital (*ImageQuant LAS4000*). La intensidad de la señal de cada proteína se cuantificó mediante el software *ImageJ* y se normalizó respecto a los controles positivos de cada cristal o array.

5.6 Análisis del perfil inflamatorio en plasma de pacientes con SAF mediante *Bio-Plex*

Los niveles circulantes en plasma de 27 moléculas inflamatorias como citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, se determinaron mediante un ensayo luminex de Bio-Rad (*California, USA*).

Brevemente, las muestras de plasma se incubaron con esferas magnéticas que llevan adheridos anticuerpos específicos frente a las proteínas circulantes a detectar. A continuación, se le añadieron anticuerpos biotinilados frente a cada proteína, para ser finalmente incubados con estreptavidina, la cual lleva conjugada un indicador fluorescente como la

ficoeritrina. La señal fluorescente proporcional a la cantidad de proteína en el suero se detectó mediante el instrumento *Bio-plex 200* de Bio-Rad. La concentración de cada proteína se calculó utilizando curvas estándares para cada proteína incluida en el ensayo y expresada como pg/ml utilizando el software *Bio-Plex Manager*.

5.7 Análisis de expresión génica mediante *Microarrays*

En primer lugar, el ARN fue extraído a partir de monocitos purificados de pacientes SAF y DS utilizando el kit “RNA/DNA/protein purification” (*Norgen Biotek, Canada*) el cual se basa en el aislamiento simultáneo y secuencial de ARN, ADN y proteínas utilizando columnas de purificación. Como control de calidad se evaluó el RIN (del inglés, *RNA Integrity Number*) en un Bioanalizador de Agilent y solo se utilizaron aquellas muestras que presentaron un RIN mayor de 7.

El estudio de Microarray se llevó a cabo en una cohorte exploratoria de 3 pacientes SAF y 3 DS utilizando la tecnología de Agilent: *Whole Human Genome Microarray 44k, One-Color*, la cual cuenta con más de 42 mil sondas frente a todos los genes conocidos anotados.

Brevemente, el ARN purificado fue procesado e incubado con el colorante fluorescente Cy3 para ser posteriormente hibridado durante 17 horas a 65 grados con las sondas específicas frente a cada gen de interés contenido en el cristal o array. Tras una serie de lavados el array fue escaneado y los datos fueron extraídos mediante el software *feature extraction version 10.7*. Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el software *GeneSpring GX version 10.0*. Los genes diferencialmente expresados entre pacientes SAF y DS fueron seleccionados teniendo en

cuenta un FDR (del inglés, *False Discovery Rate*) menor de 0.05 (*p value* ajustado por múltiples comparaciones) y un cambio de expresión de más de 2 veces entre ambos grupos (*Fold change* mayor de 2).

Los datos originales del análisis de microarray fueron depositados en la base de datos pública GEO del NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*) con el número de acceso GSE50395.

5.8 Análisis de expresión de microRNAs mediante *NanoString*

A partir del ARN total purificado de los monocitos de los mismos pacientes SAF y DS que se utilizaron para el estudio de la expresión génica se realizaron dos respectivos “*pools*” de RNA, donde se analizaron la expresión de miRNAs mediante la tecnología *Nanonstring nCounter human v2 miRNA assay*, el cual permitía la detección de más de 800 miRNAs.

Esta tecnología permitió el análisis de miRNAs mediante detección molecular digital directa en una sola reacción en ausencia de enzimas o reacciones de retrotranscripción o amplificación. Cada miRNA diana a detectar venía identificado por una sonda o “código de barras” molecular formado por una combinación única de distintos fluorocromos. Los miRNAs fueron hibridados con estas sondas, las cuales permitieron detectarlos y cuantificarlos digitalmente mediante el *nCounter digital analyzer*. Los datos obtenidos fueron finalmente analizados mediante el software nSolver, donde se normalizaron teniendo en cuenta la media geométrica del total de miRNAs en cada muestra. miRNAs diferencialmente expresados fueron seleccionados atendiendo a un

cambio en su expresión de al menos 2 veces entre pacientes SAF y DS (*fold change* mayor de 2).

5.9 Caracterización funcional del perfil de genes y miRNAs alterados

Los genes diferencialmente expresados entre pacientes SAF y DS se analizaron en su conjunto para identificar funciones biológicas, rutas y redes enriquecidas mediante dos herramientas bioinformáticas complementarias como las herramientas *Ingenuity Pathway analysis* (IPA) (<http://www.INGENUITY.com>) y *Gene Ontology* (GO) (<http://www.geneontology.org/>). La prueba exacta de Fisher se utilizó para determinar estadísticamente si una función biológica en concreto estaba enriquecida para el conjunto de genes diferencialmente expresados.

Paralelamente, se realizó el análisis funcional de los miRNAs diferencialmente expresados mediante la herramienta bioinformática TAM 2 (<http://www.lirmed.com/tam2/>), la cual identificó funciones biológicas y enfermedades enriquecidas de forma estadísticamente significativas para el perfil de miRNAs alterados.

5.10 Análisis Integrado miRNA-mRNA

La identificación de potenciales interacciones entre los mRNAs y los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes SAF respecto a DS se realizó mediante la herramienta *microRNA Target Tool* del software IPA. Esta herramienta cuenta con dos bases de datos como son *Tarbase* y *TargetScan* los cuales identifican aquellos pares miRNA-mRNA que han

sido validados experimentalmente o que tienen una predicción de alta confianza basada en homologías de secuencias respectivamente.

Una vez identificadas las interacciones entre miRNAs y mRNAs, y teniendo en cuenta que los miRNAs son principalmente reguladores negativos de la expresión génica, se aplicó un filtro para obtener solo aquellas interacciones que mostraran una relación inversa en cuanto a su patrón de alteración entre pacientes SAF y DS, es decir interacciones entre genes sobreexpresados y miRNAs con expresión reducida y viceversa.

Posteriormente y a partir de la compleja red de interacción obtenida, se seleccionó una red de interacción miRNA-ARNm específica para estudiar su relevancia clínica en profundidad. Para esta selección en primer lugar se tuvo en cuenta todos aquellos ARNm identificados como potenciales targets inversos de los miRNAs alterados en los monocitos de los pacientes SAF. A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con la herramienta STRING (<https://string-db.org/>) para identificar una firma de aquellos genes que por un lado presentaran una relación directa entre ellos previamente demostrada y por otro lado que estuviesen involucrados en funciones y rutas biológicas asociadas a la fisiopatología del SAF. Finalmente se generó una red de interacción específica conformada por dichos genes y sus potenciales miRNAs reguladores.

5.11 PCR cuantitativa a tiempo real

El ARN total, el cual contenía a la fracción de miRNAs, fue purificado mediante el kit de Norgen “RNA/DNA/protein purification” previamente descrito.

Para analizar los niveles de expresión génica de los genes seleccionados en la cohorte completa, se realizó en primer lugar una retrotranscripción mediante el kit *PrimeScript RT Master Mix (Takara, Japan)* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de PCR a tiempo real utilizando el *kit SYBR Green qPCR Master Mix* de Promega (USA).

Las secuencias de los cebadores de los genes utilizados, así como se muestran a continuación en la **Tabla 2**:

Gen	Secuencia	
	Forward	Reverse
GAPDH	5'-TG TAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3'
OXR1	5'-CTGATGGTGATTAAGACAGTG-3'	5'-CACTTAAAGACCTCAAACCTCC-3'
ALOX15 β	5'-GATACAGAGGAACATGAAGC-3'	5'-CCGATGATTCAGAGACAAAG-3'
PXDNL	5'-AGACTGTAGGAGTAGAGGAC-3'	5'-GATAGCTGTATTGAGCTGAG-3'
GPX8	5'-AAGGATGCAAAAGGAAGAAC-3'	5'-CCCTAAGTAATTTCTGTCTGTG-3'
ITGA2	5'-GGTGGGGTTAATTCAGTATG-3'	5'-ATATTGGGATGTCTGGGATG-3'
SELE	5'-GAGAATTCACCTACAAGTCC-3'	5'-AGGCTTGAACATTTTACCAC-3'
VCAM-1	5'-ACTTTATGTCAATGTTGCC-3'	5'-CATATTCACAGAAGTGCCTTC-3'
SERPIN β 2	5'-TGCTGGAAAGTGAAATAACC-3'	5'-GGATCTGAGTTCATAATCTC-3'
VEGF	5'-GACCAAAGAAAGATAGAGCAAG-3'	5'-ATACGCTCCAGGACTTATAC-3'
TNFRSF1A	5'-CCCCTGGTCATTTTCTTTG-3'	5'-ATTTCCACAAACAATGGAG-3'
MCP-1	5'-GGGGAAAGCTAGGGGAAAATAAGT-3'	5'-CAGCAGCAAGTGCCCAAAGAAG-3'
IFN γ	5'-GGTAACTGACTTGAATGTCC-3'	5'-TTTTTCGCTTCCTGTTTTAG-3'
IL-1 α	5'-AGTTCTTAGTGCCGTGAGTTCC-3'	5'-GTGACTGCCCAAGATGAAG-3'
TFG β	5'-AACCCACAACGAAATCTATG-3'	5'-CTTTAACTTGAGCCTCAGC-3'
STAT-1	5'-ACCCAATCCAGATGTCTATG-3'	5'-GAGCCTGATTAATCTCTGG-3'
MAP2K6	5'-CATCTTGATTCCTGAAAGTC-3'	5'-CCTTTCGACTGAGACATTTTC-3'
MAP3K4	5'-CCTTCATCTGAGGAGAAATG-3'	5'-GCTGCTTAATACTCAAGAGAG-3'

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para determinar expresión génica mediante RT-PCR.

Para el análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados en la cohorte completa se utilizó la tecnología de Exiqon siguiendo sus recomendaciones, la cual emplea una retrotranscripción universal de todos los miRNAs mediante el reactivo *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR system* y parejas de cebadores específicos para la reacción de PCR de cada miRNA (*miRCURY LNA miRNA PCR Assays*).

Las secuencias de los miRNAs analizados se detallan a continuación en la

Tabla 3:

miRNA	Secuencia
miR-17-5p	5'-CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG-3'
miR-26a-5p	5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'
miR-30b-5p	5'-UGUAAACAUCCUACACUCAGCU-3'
miR-145-5p	5'-GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU-3'
miR-150-5p	5'-UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG-3'
miR-199a-5p	5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC-3'
miR-376c-3p	5'-AACAUAGAGGAAAUUCCACGU-3'
miR-494-3p	5'-UGAAACAUACACGGGAAACCUC-3'
miR-146b-5p	5'-UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU-3'

Tabla 3. Secuencias de los miRNAs analizados mediante RT-PCR.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) con el siguiente protocolo: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C, y 1 min de fase de hibridación y extensión a 60°C. Para cada curva de amplificación generada se obtuvo el ciclo umbral (Ct), de tal forma que los valores de expresión se calcularon como expresión relativa de cada gen o miRNA diana frente a los genes de referencia GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) o RNU6 respectivamente, utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las muestras se analizaron por duplicado y los controles negativos se incluyeron en todas las reacciones^{26,81-83}.

5.12 Transfecciones con miRNA mimic y ensayos de Luciferasa

Monocitos purificados de cuatro pacientes con SAF, seleccionados entre aquellos que habían sufrido trombosis y eran positivos para anticuerpos antifosfolípido, fueron sembrados en placas de 12 pocillos con medio completo sin antibióticos (Opti-MEM, Life Technologies, Madrid, Spain) y transfectados con 100nM de los miRNA mimics: hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-145-5p, miR146b-5p, o hsa-miR-199a-5p (Life Technologies, Madrid, Spain); o con la misma concentración de la secuencia nucleotídica no específica utilizada como control de transfección (*negative scrambled control*). Como agente de transfección se utilizó el reactivo *siPORT NeoFX* (Life Technologies, Madrid, Spain) basado en liposomas siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras 48 horas de transfección, los niveles de ARNm y proteína de sus potenciales diana (STAT-1, IL1A, TGF-beta y VCAM-1) fueron evaluados mediante PCR, wetern blot y citometría de flujo.

La interacción directa entre las potenciales dianas y sus miRNA reguladores fue analizada utilizando la tecnología *LightSwiith Luciferase Assay reporter system* (*SwiithGear Genomics*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. De forma resumida, 250000 células HEK293 fueron sembradas en placas de 96 pocillos blancas 24 horas antes de la transfección. Posteriormente, las células fueron co-transfectadas con vectores que contenían la región 3'UTR de cada uno de los genes diana unido al gen de la luciferasa (RenSP) así como con 100nM de cada miRNA mimic o del control negativo de los miRNA mimics (*negative scrambled control*).

Paralelamente se incluyeron otros controles negativos como un vector que solo contenía el gen de la luciferasa sin la región 3'UTR de ningún gen

(*empty 3'UTR vector*) y un vector con la región 3'UTR de un gen *housekeeping* como el GAPDH, el cual no contenía ningún sitio de unión para los miRNAs estudiados. Tras 24 horas de transfección la actividad luciferasa fue determinada en un luminómetro siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.13 Análisis de la actividad procoagulante y adhesión celular

Los efectos de las transfecciones con miRNA mimic sobre la actividad procoagulante de los monocitos de los pacientes con SAF fue evaluado en los lisados celulares utilizando las recomendaciones del fabricante del *kit Tissue factor human chromogenic activity assay* (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Este kit mide la capacidad del complejo formado por el Factor tisular y el Factor VIIa de activar el Factor X hacia el Factor Xa. La cantidad de Factor Xa generada es detectada mediante absorbancia, la cual es proporcional a la actividad enzimática del factor tisular.

La adhesión celular fue analizada siguiendo las recomendaciones del fabricante del *kit Vybrant cell adhesion assay* (Molecular Probes Inc, Leiden, Netherlands), el cual utiliza un reactivo fluorescente que es incorporado a las células (*Calcein acetoxymethyl ester*), para facilitar la detección de las células adheridas a la placa mediante un lector de fluorescencia tras realizar los lavados correspondientes.

5.14 Tratamientos *in vitro* con anticuerpos antifosfolípidos purificados

En primer lugar, se purificó la fracción total de IgG procedente de un pool de suero de 7 pacientes con SAF, los cuales se caracterizaban por presentar altos títulos de anticuerpos anticardiolipina y anti- β 2GPI de

isotipo IgG, mediante cromatografía de afinidad mediante el kit de columnas *MABTrap kit* (Amershan Biosciences, United Kingdom). Posteriormente la actividad autoinmune de las IgG purificadas se validó mediante kits de ELISA (*QUANTALite® β 2GPI-IgG and QUANTALite® ACA IgG III kit*, Inova Diagnostics; San Diego, California, USA). Como control también se purificó la fracción total de IgG procedente de un pool de suero de 7 donantes sanos.

Monocitos aislados a partir de la sangre periférica de donantes sanos fueron cultivados en placas de 12 pocillos en medio RPMI completo sin FBS que pudiese contener miRNAs exógenos. A continuación, fueron tratados con 500 μ g/mL de la fracción de IgG purificadas a partir del suero de pacientes SAF o donantes sanos durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

De forma paralela, células endoteliales HUVEC (*Primary human umbilical vein endothelial cells*) procedentes de *Lonza Group LTD* (Basel, Switzerland) se cultivaron 24 horas a 37°C y 5% CO₂ en medio EBM (*Endothelial Basal Medium; Lonza, Walkersville, MD USA*) suplementado con 10% de FBS, 0.1% de hEGF (*human epidermal growth factor; Lonza*), 0.1% de hidrocortisona (*Lonza*), 0.1% de gentamicina-anfotericina B *GA-1000, 4 Lonza*), 0.4% de BBE (*bovine brain extract; Lonza*), y 1% del reactivo ZellShield para prevenir la contaminación del cultivo (*Minerva Biolabs, GmbH, Berlin, Germany*). Tras alcanzar la confluencia, las células endoteliales fueron tratadas durante 24 horas a 37°C con el sobrenadante de los monocitos tratados con la fracción IgG purificada de los pacientes SAF y donantes sanos en ausencia de FBS.

Para caracterizar de forma específica los efectos de las moléculas secretadas al sobrenadante por los monocitos activados con la fracción IgG de los pacientes SAF, sobre las células endoteliales, y evitar efectos

confundentes promovidos por la propia fracción IgG, tras 6 horas de tratamiento, el medio de cultivo de los monocitos fue renovado con nuevo medio para incubarse otras 18 horas más.

Este último sobrenadante fue aquel empleado para los tratamientos de las células endoteliales. Se realizaron 4 experimentos independientes por triplicado con las células en pase 4.

5.15 Análisis estadísticos

Todos los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SSPS 25.0 (SPSS Inc., *Chicago, Illinois, USA*). Tras comprobar la normalidad y la igualdad de varianzas, las características clínicas se compararon mediante el test paramétrico *T-Student* o el test no paramétrico U de *Mann-Whitney*. Se compararon muestras apareadas de los mismos sujetos mediante el test de *Wilcoxon*. Las correlaciones se evaluaron mediante la correlación de *Spearman*. Las diferencias se consideraron significativas con un *P-value* $<0,05$. Para los estudios de correlación con múltiples comparaciones se aplicó una corrección de *Bonferroni*.

Por otra parte, con el fin de estratificar a los pacientes con SAF según su perfil molecular de forma no supervisada se utilizó el algoritmo de clusterización *k-means* mediante la plataforma *Metaboanalyst*⁸¹.

El diseño global del estudio se resume en el siguiente gráfico (**Figura 1**).

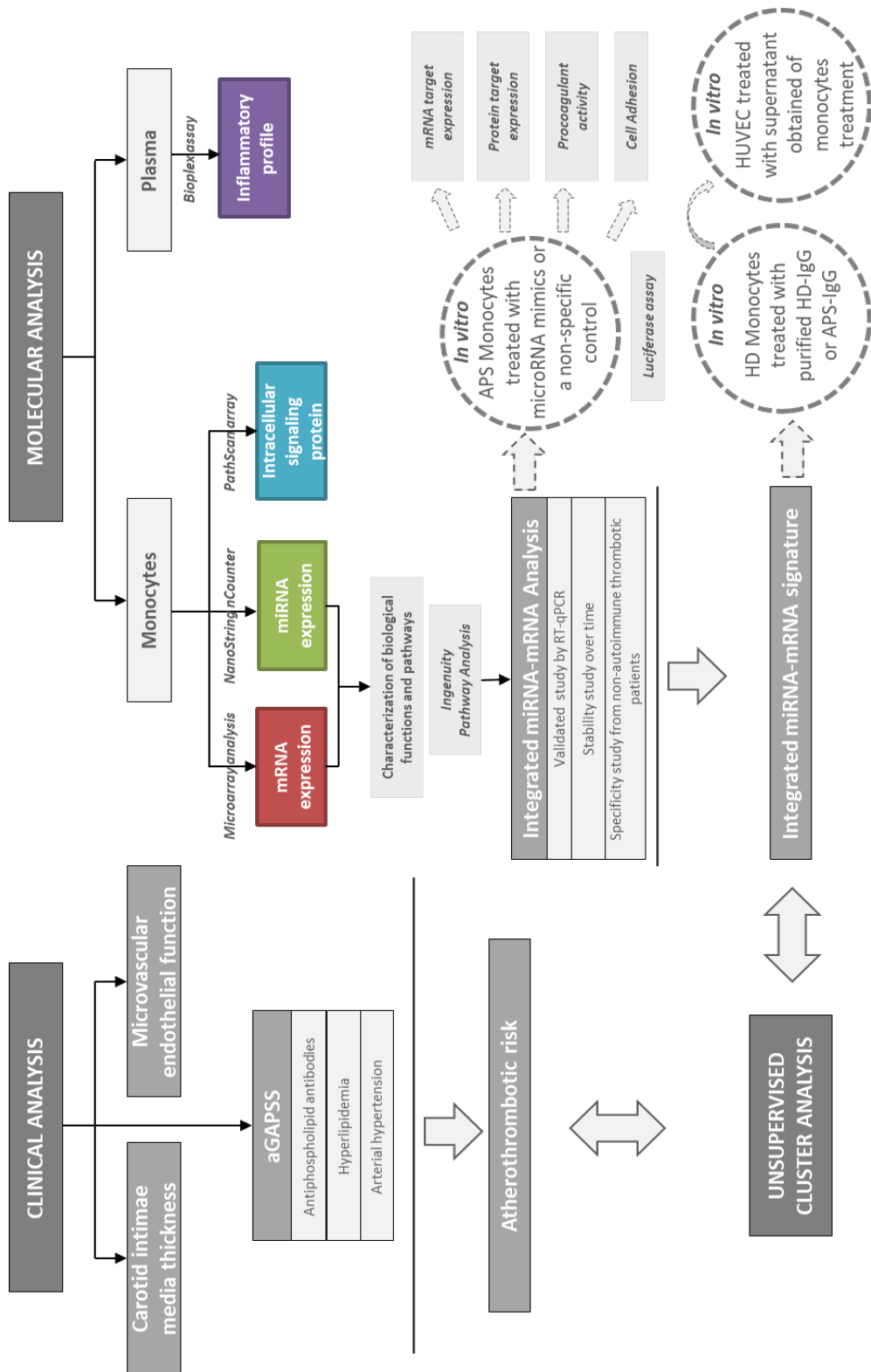
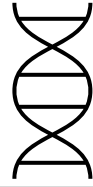


Figura 1. Diseño del estudio



RESULTADOS

6. Resultados

6.1 Los monocitos de pacientes con SAF primario muestran perfiles de expresión de genes y miRNAs relacionados con enfermedades cardiovasculares e inflamatorias

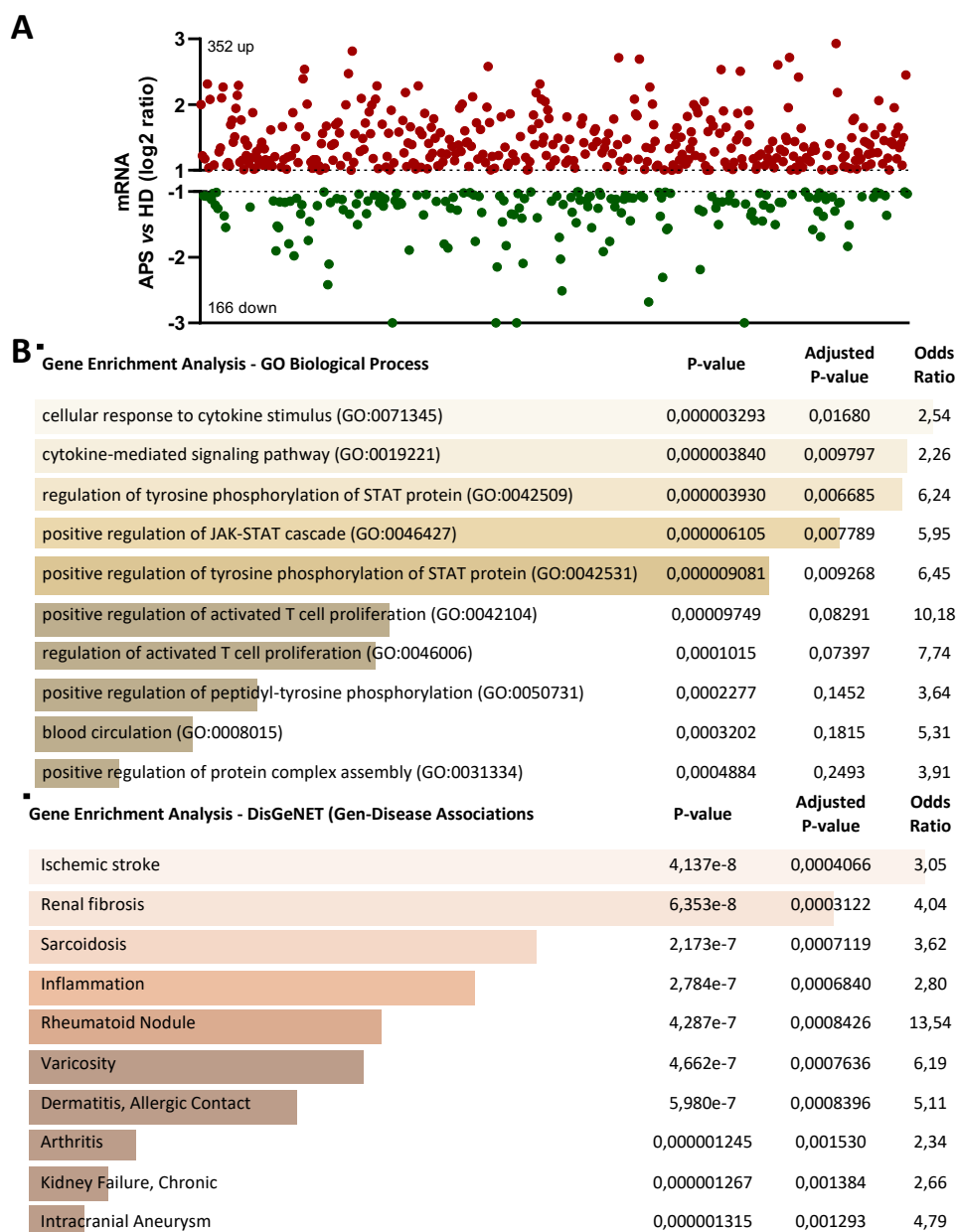
El array de expresión génica identificó 547 genes alterados en monocitos de pacientes con SAF primario en comparación con los donantes sanos, incluyendo 374 ARNm sobreexpresados y 173 reducidos (**Figura 1A y Tabla suplementaria I**), los cuales presentaban un cambio en su expresión de al menos dos veces (*fold change*>2).

El análisis de enriquecimiento funcional de estos genes mostró que las enfermedades más relevantes asociadas con estos cambios transcripcionales eran las enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, renales y dermatológicas. Igualmente, los principales procesos biológicos asociados a los genes alterados fueron la señalización de citoquinas y quimioquinas, vías de señalización intracelular -como TLR, JAK, p38, Erk, STAT y NFkappaB-, adhesión celular y angiogénesis, entre otras (**Figura 1B**).

En cuanto al análisis del perfil miRNAs, los monocitos de pacientes con SAF presentaron 22 miRNA diferencialmente expresados, de los cuales 3 se encontraban sobreexpresados y el resto reducidos (*fold change*>2) (**Figura 1C y Tabla suplementaria II**).

La clasificación funcional de estos miRNA mostró su asociación con diferentes procesos relevantes en la fisiopatología de la enfermedad como respuesta inflamatoria, proliferación celular, apoptosis y

angiogénesis entre otras, ligadas al desarrollo de trastornos cardiovasculares y enfermedades del tejido conectivo (**Figura 1D**).



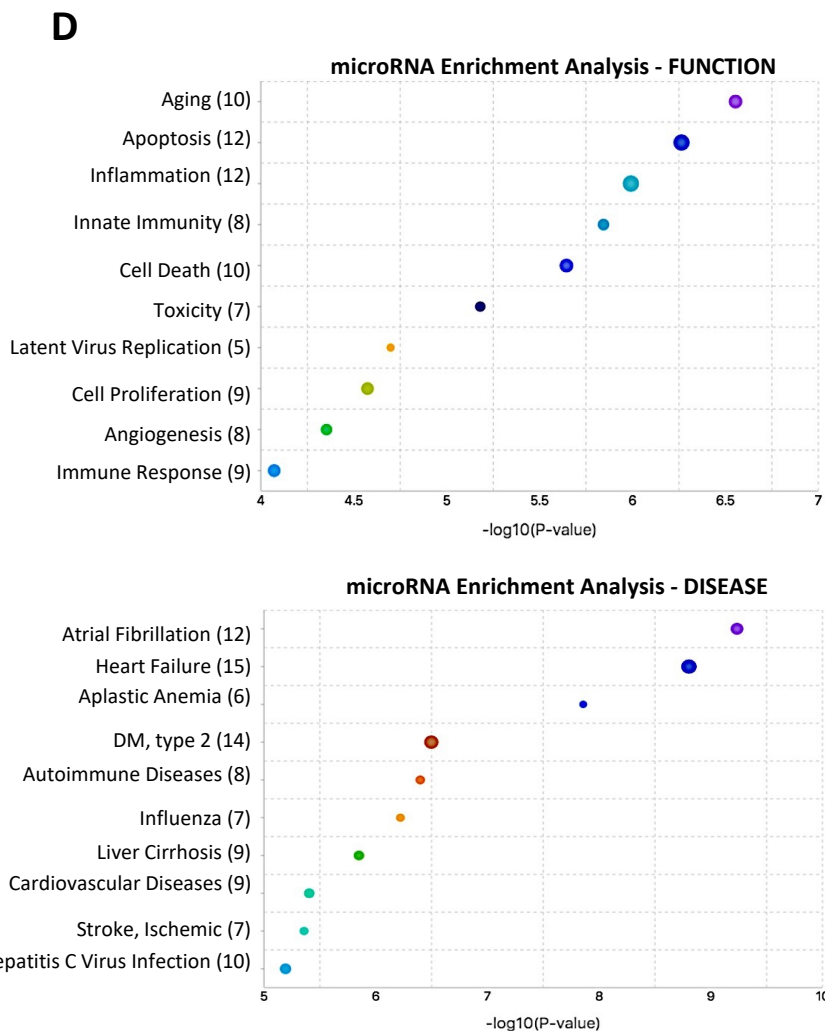
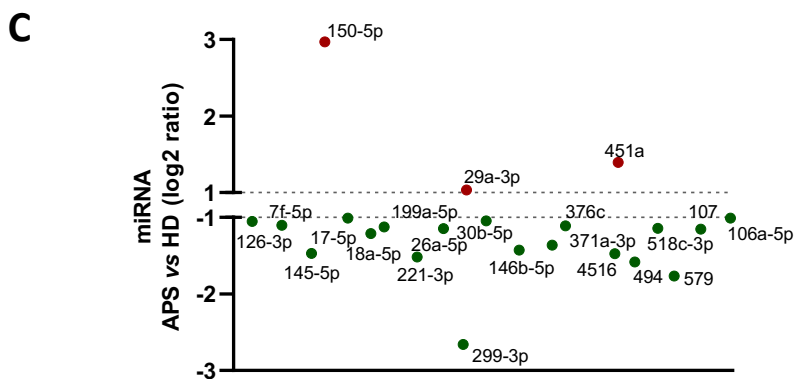


Figura 1. Perfiles de expresión exploratorio de genes y miRNAs en monocitos de pacientes con SAF primario y categorización funcional. A) *Scatter plot* representando el perfil de expresión de genes procedentes de un pool de ARN de monocitos de 3 pacientes con SAF y de 3 donantes sanos. B) Caracterización funcional mediante la plataforma GEO (*gene expression omnibus*) de la firma de

genes cuya expresión se encontró alterada, mostrando los 10 procesos biológicos y enfermedades más relacionadas. C) *Scatter plot* representando el perfil de expresión de miRNAs procedentes de un pool de ARN de monocitos de 3 pacientes con SAF y de 3 donantes sanos. D) Caracterización funcional mediante la plataforma TAM 2.0 de la firma de miRNAs cuya expresión se encontró alterada, mostrando los 10 procesos biológicos y enfermedades más relacionadas. *APS*, síndrome antifosfolípido (del inglés *antiphospholipid syndrome*); *HD*, donantes sanos (del inglés *healthy donors*).

6.2 Las rutas de señalización intracelular asociadas a procesos cardiovasculares y al estado inflamatorio crónico mediado por el sistema inmune se encuentran activadas en los monocitos de pacientes con SAF

Con el fin de evaluar la activación de las vías de señalización intracelular que podrían regular la expresión de una serie de genes alterados e implicados en la fisiopatología del síndrome, se analizó el estado de fosforilación de proteínas de señalización intracelular mediante un array.

Este análisis mostró una activación significativa de 18 quinasas intracelulares entre las que destacan Akt, AMPK, ERK, GSK, mTOR, JNK y STAT1 y 3 entre otras. Estas proteínas se caracterizan por estar involucradas en el mantenimiento del estado inflamatorio crónico y protrombótico presente en pacientes con SAF primario (**Figura 2**).

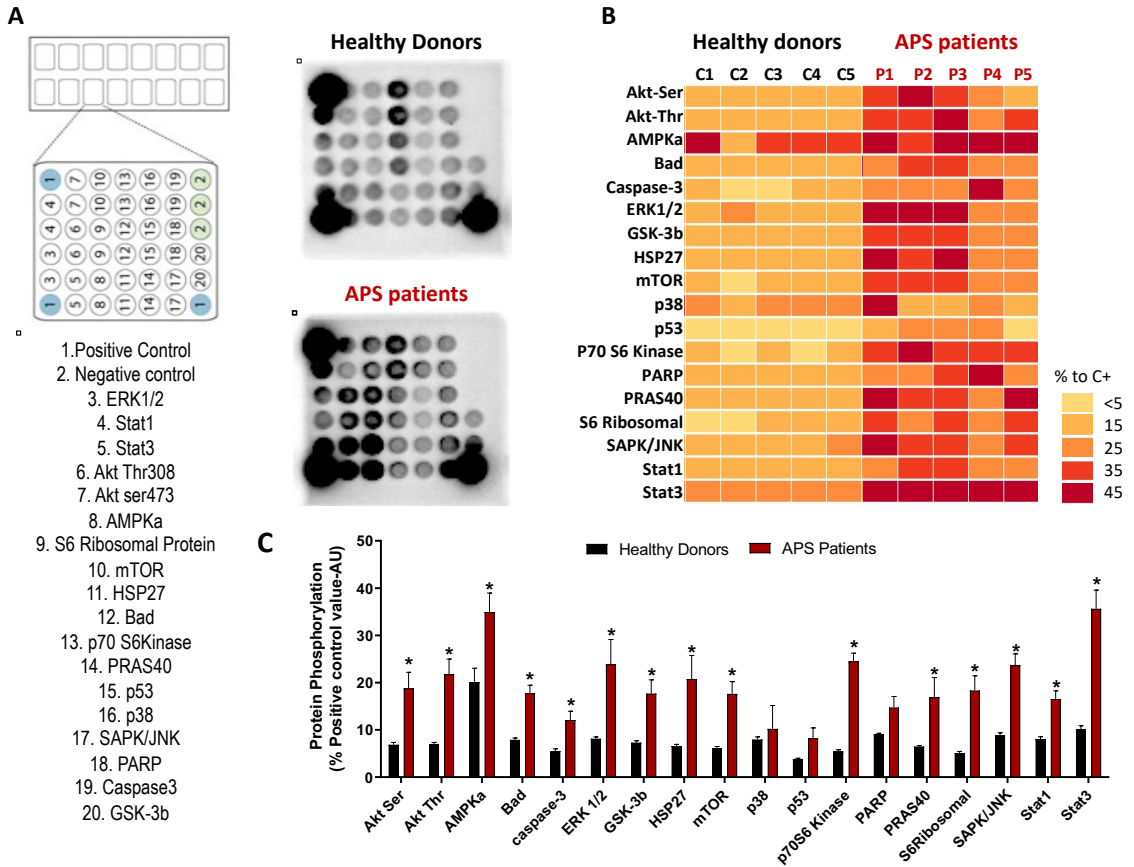


Figura 2: Estado de activación de rutas intracelulares implicadas en trombosis e inflamación en monocitos de pacientes con SAF primario. A) Diagramas representativos de distribución de proteínas y estado de fosforilación de las proteínas analizadas utilizando el array *PathScan (Cell Signaling)* en lisados proteicos de monocitos procedentes de 5 pacientes con SAF primario y 5 donantes sanos. B) *Heatmap* mostrando los niveles de fosforilación de las proteínas intracelulares en monocitos entre SAF primario y donantes sanos. * $p < 0.05$. APS, síndrome antifosfolípido (del inglés *antiphospholipid syndrome*).

6.3 El análisis integrado de ARNm-miRNA ha permitido identificar una firma de genes alterados en SAF, interconectados entre sí y asociados a enfermedad cardiovascular, y potencialmente modulados por un conjunto específico de miRNA alterados

Con el fin de identificar todas aquellas relaciones entre los genes y los miRNAs alterados en SAF, se utilizó la herramienta *miRNA Target Filter* de la plataforma *Ingenuity Pathway* (IPA), la cual identifica pares ARNm-miRNA en función de su predicción teórica a nivel de secuencia (con alta confianza) y de su validación experimental previa. Este análisis identificó una red de interacción compuesta por 147 genes diana que podían ser potencialmente regulados por 20 miRNA (**Figura 3**).

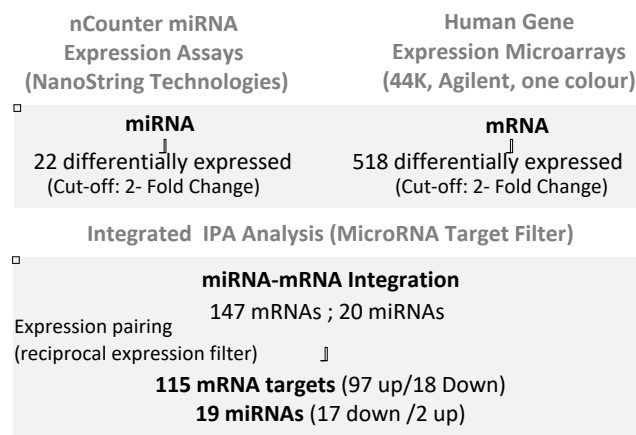
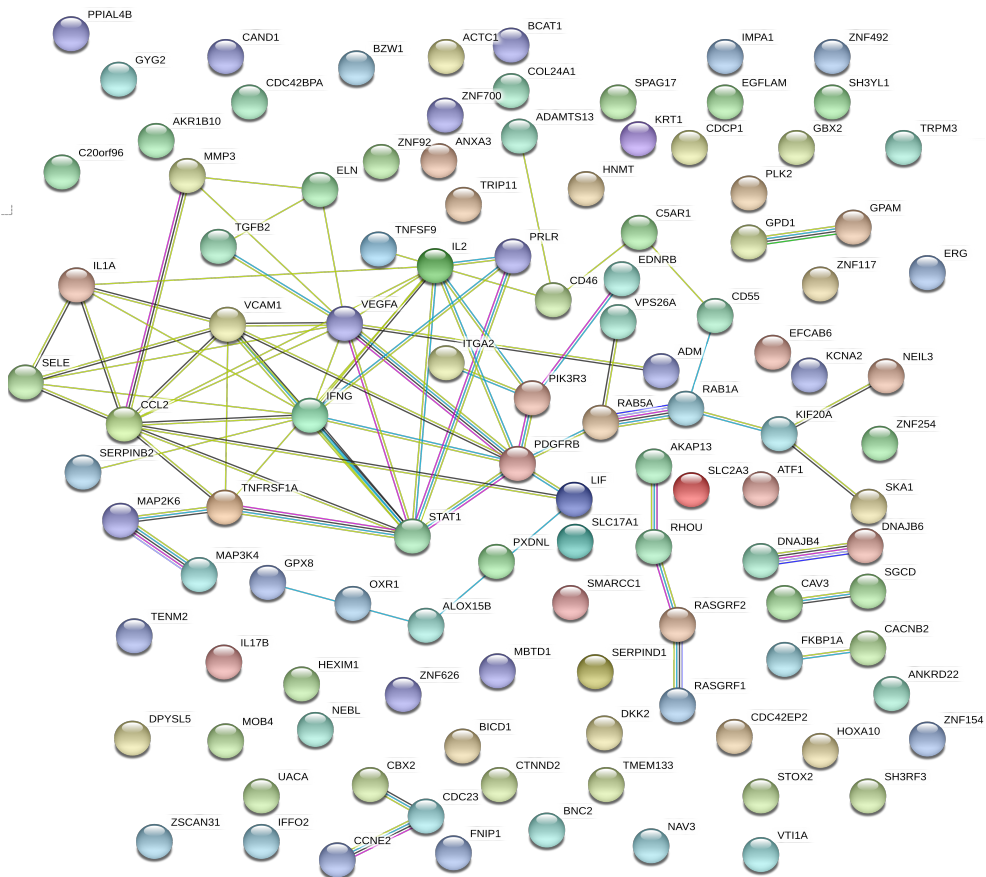


Figura 3: Análisis integrado ARNm-miRNA mediante *Ingenuity Pathway platform*. Diagrama representativo del análisis llevado a cabo por el programa bioinformático IPA mostrando el origen, los pasos y el resultado final del mismo.

A continuación, se aplicó un filtro para identificar de entre todas, únicamente aquellas interacciones ARNm-miRNA con relación recíproca o inversa dado que los miRNAs son principalmente reguladores negativos

fisiopatología de la enfermedad. Dicho análisis identificó una firma de genes altamente interconectados entre sí, los cuales estaban asociados a vías moleculares estrechamente relacionadas con inflamación y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales en línea con la patología del SAF. En esta firma destacaban genes individuales anteriormente relacionados con el desarrollo de enfermedades inflamatorias y cardiovasculares como IL1A, VEGFA, CCL2, IFNG, STAT1, TGFB, SERPINB2, SELE, ITGA2 o MAPKs entre otros (**Figura 5**).



Gene Enrichment Analysis - GO Biological Process				
Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio
1	blood circulation (GO:0008015)	0.00001095	0.05589	17.05
2	cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	0.00001673	0.04268	3.84
3	positive regulation of JAK-STAT cascade (GO:0046427)	0.00003613	0.06145	13.38
4	cardiac myofibril assembly (GO:0055003)	0.0001187	0.1515	30.69
5	positive regulation of protein complex assembly (GO:0031334)	0.0001627	0.1661	9.77
6	regulation of regulatory T cell differentiation (GO:0045589)	0.0001966	0.1672	26.09
7	heart morphogenesis (GO:0003007)	0.0002104	0.1534	13.64
8	positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein (GO:0042531)	0.0002628	0.1676	12.88
9	regulation of calcium ion import (GO:0090279)	0.0002633	0.1493	23.72
10	positive regulation of MAPK cascade (GO:0043410)	0.0002747	0.1402	4.80

Gene Enrichment Analysis - DisGeNET (Gen-Disease Associations)				
Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio
1	Thromboangiitis Obliterans	2.908e-10	0.000001429	28.99
2	Glomerulonephritis	2.336e-10	0.000002296	10.82
3	Mucocutaneous Lymph Node Syndrome	1.509e-9	0.000004943	12.34
4	Ovarian Carcinoma	3.295e-9	0.000008097	2.84
5	Cardiomyopathy, Familial Idiopathic	6.298e-9	0.00001032	6.74
6	Malignant neoplasm of ovary	5.388e-9	0.00001059	2.92
7	Lupus Nephritis	3.434e-8	0.00003750	9.15
8	Myocardial Infarction	2.679e-8	0.00003761	3.96
9	Malaria, Cerebral	3.110e-8	0.00003821	16.37
10	Chronic Obstructive Airway Disease	4.916e-8	0.00004831	4.69

Figura 5. Red de interacción entre los genes potencialmente modulados por miRNAs en monocitos de pacientes SAF. Red de interacción mostrando la relación entre los genes diferencialmente expresados en los monocitos de pacientes SAF potencialmente modulados por miRNAs. Se muestran también en tablas los resultados del análisis de enriquecimiento funcional de procesos biológicos y enfermedades asociadas procedentes de las plataformas Gene Ontology y DisGeNET respectivamente.

Finalmente, caracterizamos la red específica conformada por esta firma de genes identificados como interconectados y teóricamente relevantes en la patología del SAF junto con sus potenciales miRNAs reguladores entre los que se encuentran miR-26a-5p, miR-376c-3p, miR-199a-5p, miR-17-5p, miR-494-3p, miR-145-5p, miR-150-5p, miR-146b-5p y miR-30b-5. Esta red incluía varios ARNm controlados al mismo tiempo por diferentes miRNAs, así como varios miRNAs controlando los mismos ARNm de forma simultánea, de tal forma que la alteración de este conjunto de genes y miRNAs podría tener un impacto global en el desarrollo de la patología cardiovascular de los pacientes con SAF (**Figura 6**).

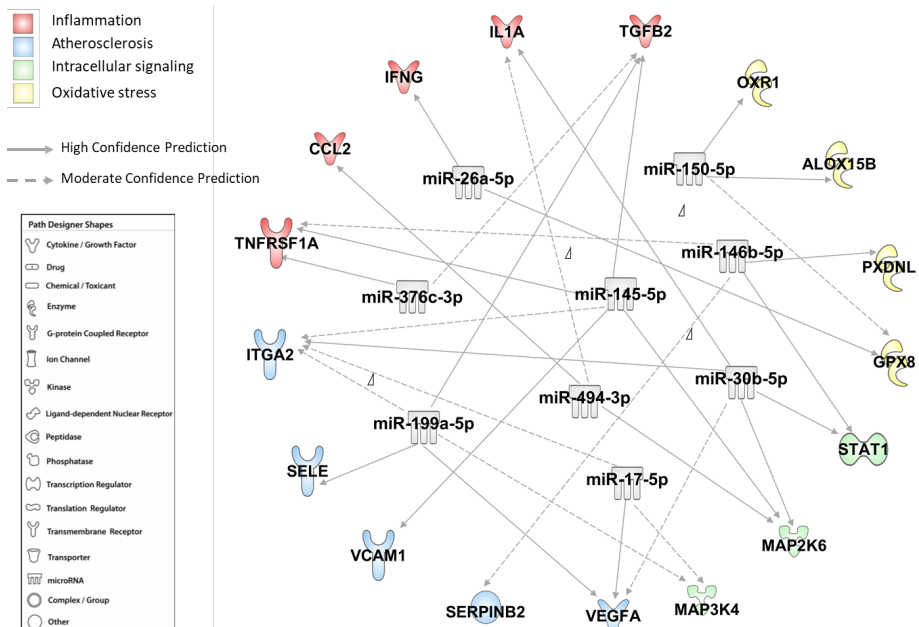


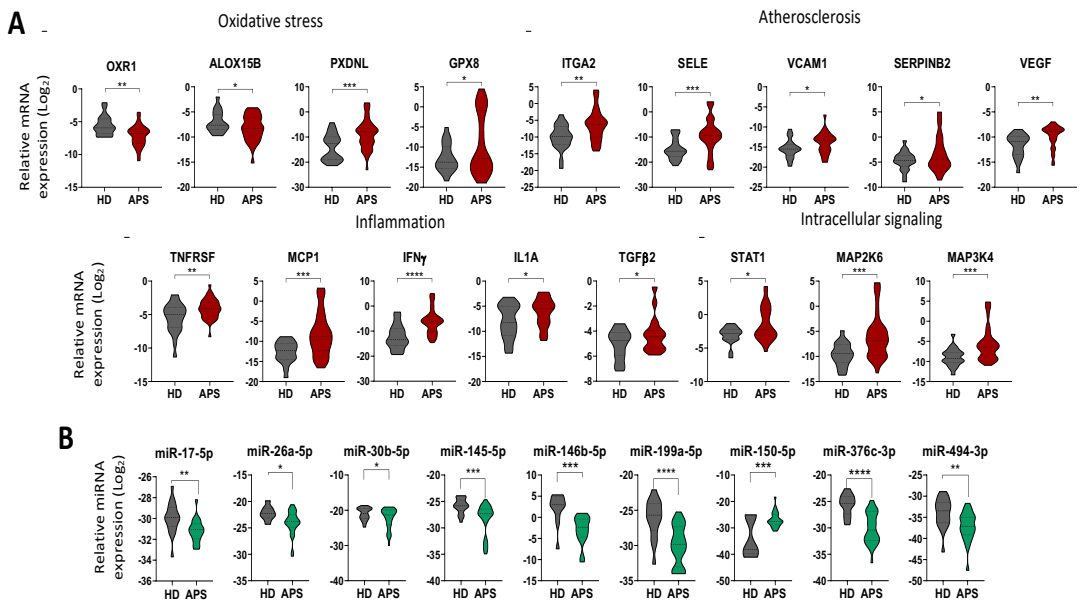
Figura 6. Red de interacción específica entre genes claves asociados a la patogénesis del SAF y sus potenciales miRNAs reguladores. Se muestra el tipo de relación directa entre los genes y los miRNAs identificadas mediante TargetScan, así como las funciones biológicas en las que están involucradas cada gen. En círculos se destacan aquellos miRNAs cuya relación directa con sus ARNm diana será analizada experimentalmente en profundidad más adelante en esta tesis.

6.4 La alteración de la firma específica formada por los genes y sus miRNAs reguladores se validó en la cohorte completa

Para validar los datos obtenidos en el array exploratorio de genes y miRNAs, se analizó la expresión de esta firma específica de genes interconectados y modulados por miRNAs en la cohorte completa de pacientes con SAF y DS mediante RT-PCR. Estos análisis confirmaron la expresión alterada de los ARNm (**Figura 7A**) y los miRNAs (**Figura 7B**) previamente identificados en los arrays exploratorios.

Además, se identificó una fuerte correlación positiva entre los niveles de ARNm validados, lo que confirma la interconexión teórica entre ellos detectada en los análisis anteriores. En consecuencia, las correlaciones positivas presentes entre todos los miRNA apoyaron la potencial relación sinérgica en cuanto al control de sus dianas y vías moleculares concretas.

Igualmente, se pudo observar una correlación inversa entre los genes y algunos de los miRNA validados avalando la relación recíproca identificada en el análisis de integración ARNm-miRNA (**Figura 7C**).



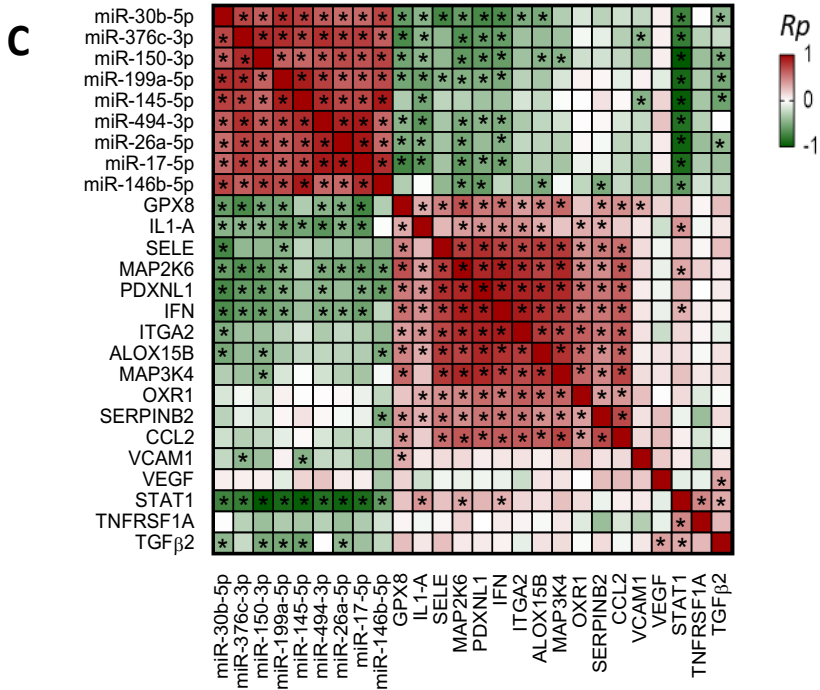


Figura 7. Análisis de validación de la alteración de la firma específica de genes y miRNAs y estudios de correlación. A) Análisis de validación mediante RT-PCR de los genes seleccionados, en monocitos de todos los pacientes con SAF (n = 40) y DS (n = 40) incluidos en el estudio. B) Análisis de validación mediante RT-PCR de los miRNA reguladores en los monocitos de todos los pacientes con SAF y DS incluidos en el estudio. En ambos análisis se muestra la expresión individual en gráficos de violines. (*), $p < 0,05$; (**), $p < 0,01$; (***), $p < 0,001$ frente a donantes sanos. El valor de p se obtuvo mediante la prueba t de Student. C) *Heatmap* de correlación entre los niveles de expresión de los genes y los miRNAs validados en monocitos de pacientes con SAF. Los colores rojo o verde en cada cuadrado representan los coeficientes de correlación de Spearman positivos o negativos, respectivamente. El símbolo (*) en cada cuadro representa correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$). APS, síndrome antifosfolípido (del inglés *antiphospholipid syndrome*); HD, donantes sanos (del inglés *healthy donors*).

6.5 Los ensayos de transfección en monocitos de pacientes con SAF validaron experimentalmente la relación directa entre los miRNAs y sus ARNm diana e identificaron su influencia sobre su actividad celular

Para profundizar en la relevancia funcional de las interacciones teóricas (*in silico*) identificadas entre varios miRNAs y sus genes diana, desarrollamos diferentes aproximaciones experimentales.

En primer lugar, se llevaron a cabo transfecciones con mimic de varios miRNAs en monocitos de pacientes con SAF seleccionados en función de su alto número de genes dianas asociados a las principales características fisiopatológicas del SAF (**Figura 7**). La transfección con los mimic de miR-30b-5p, miR-145-5p, miR-146b-5p and miR-199a-5p promovió la sobreexpresión de los niveles intracelulares de estos miRNAs en los monocitos de los pacientes SAF (**Figura 7 A**).

A continuación, evaluamos la influencia de dicha sobreexpresión sobre los niveles de ARNm y proteína de sus dianas moleculares. La sobreexpresión con miR-30b promovió un descenso significativo a nivel de ARNm y proteína de STAT-1, mientras que también redujo los niveles proteicos de IL1A. Igualmente, la transfección con el mimic del miR-146b-5p disminuyó la expresión de STAT-1. Por su parte, la sobreexpresión de miR-145-5p promovió el descenso a nivel de ARNm y proteína de TGFbeta2 y VCAM1. Por último, el mimic del miR-199a disminuyó los niveles de ARNm y proteína de TGFbeta2 (**Figura 7 B-C**).

Por otro lado, para evaluar el impacto de la expresión alterada de los miRNAs sobre la actividad del monocito, se analizó la actividad procoagulante y la adhesión celular en los experimentos de transfección

con miRNA mimic. Por un lado, la sobreexpresión de los miR-30b-5p, 145-5p y miR-199a-5p promovió una reducción significativa de la actividad procoagulante dependiente de factor tisular en los monocitos de pacientes con SAF (**Figura 7 D**). Por otro lado, la sobreexpresión del miR-146b-5p disminuyó la capacidad de adhesión de los monocitos de los pacientes con SAF (**Figura 7 E**), mientras que otros miRNAs no influenciaron dicha actividad.

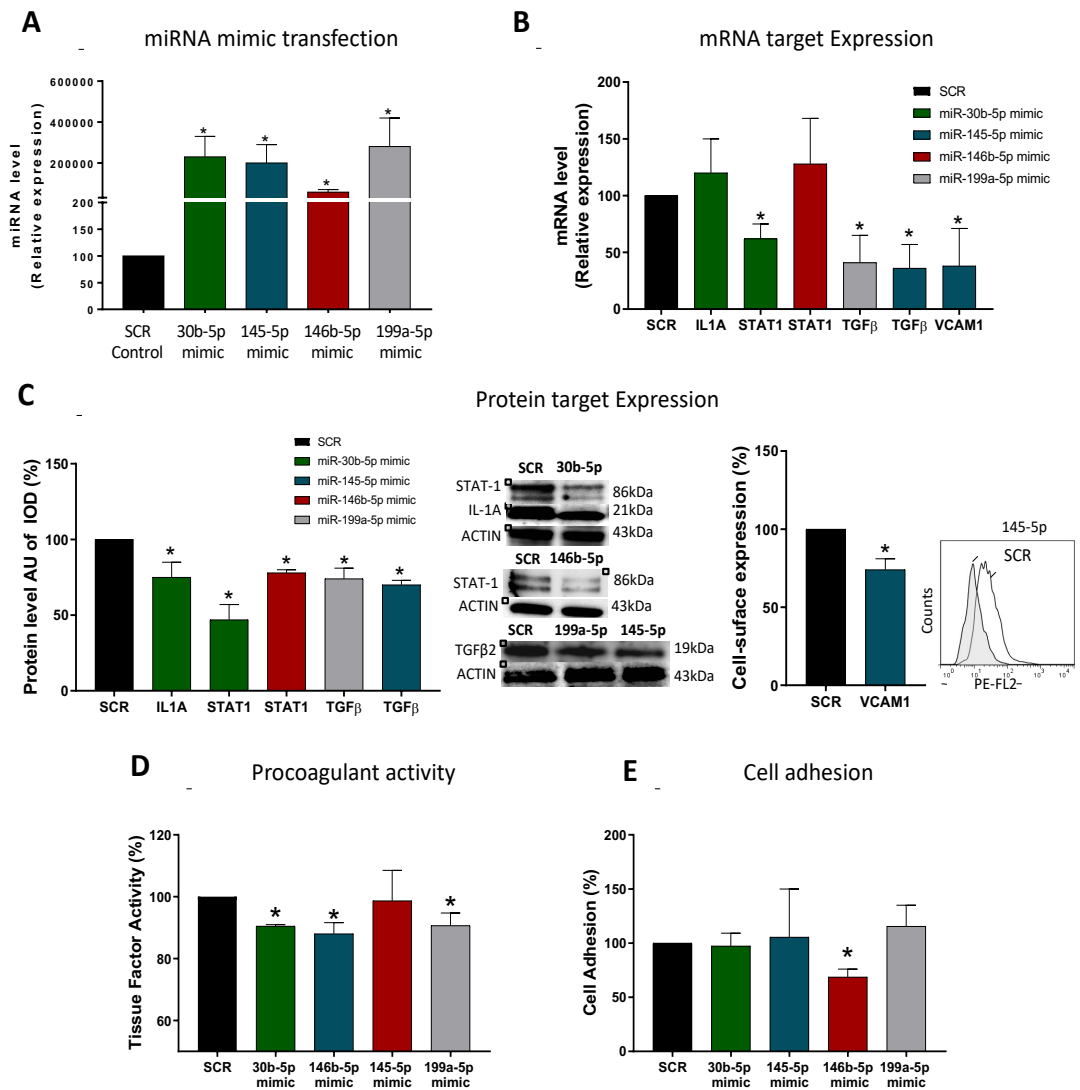


Figura 7. Análisis de transfección entre los miRNAs y genes diana y ensayos funcionales. A) Monocitos aislados de 4 pacientes con SAF que fueron transfectados con 100 nmol/L de mimic de miR-30b-5p, miR-145, miR-199a-5p y miR-146b-5p, así como con una secuencia oligonucleotídica no específica como control (*scrambled*) utilizando el agente de transfección siPORT. Tras 48 horas de transfección la sobreexpresión de los miRNAs fue verificada mediante RT-PCR. B) Análisis de los niveles de expresión génica de las dianas moleculares de los miRNAs transfectados mediante RT-PCR. C) Análisis de los niveles de expresión proteica de las dianas moleculares de los miRNAs transfectados mediante western blot y citometría de flujo. D) Actividad del factor tisular en los monocitos de SAF transfectados con los miRNAs. E) Capacidad de adhesión celular de los monocitos de SAF transfectados con los miRNAs. * $p < 0.05$.

Además, para evaluar la interacción directa entre la secuencia semilla (*seed sequence*) de los miRNAs seleccionados y la región 3'UTR de los genes identificados como potenciales dianas, se llevaron a cabo ensayos de luciferasa. Estos ensayos confirmaron la interacción directa entre varios pares ARNm-miRNA como STAT1 con miR-30b y miR-146b, TGF β 2 con miR-145 y miR-199a y VCAM1 con el miR-145. La regulación de IL1A por el miR-30b identificada previamente, pareció estar mediada por una interacción indirecta, ya que la actividad luciferasa no cambió. No se observaron diferencias en la actividad luciferasa de los vectores utilizados como controles negativos (**Figura 8**).

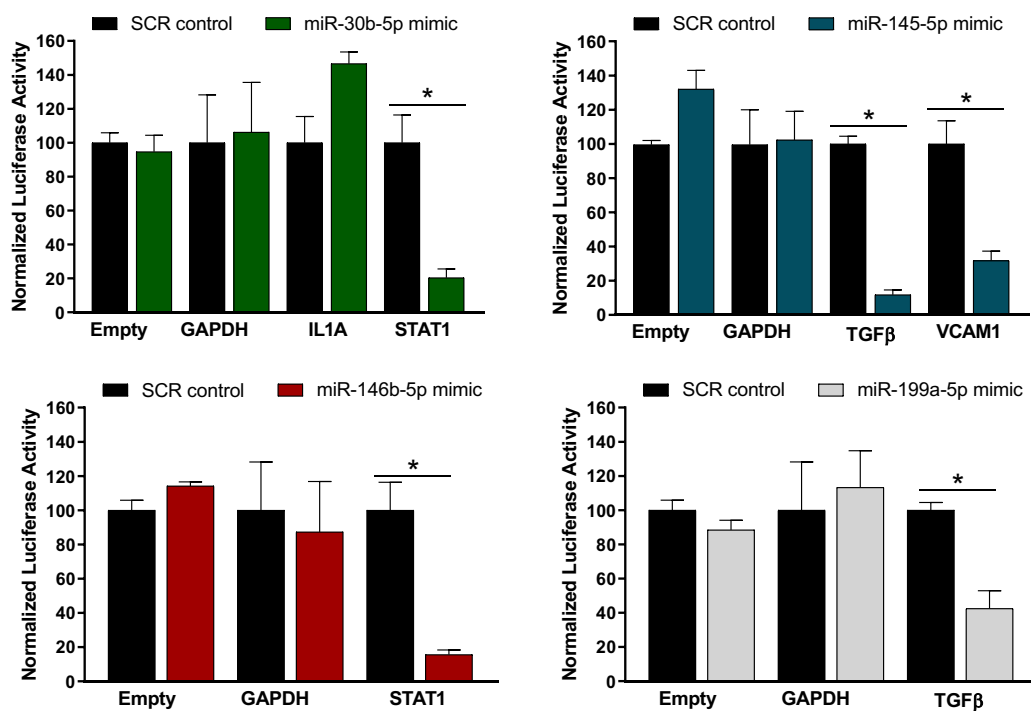


Figura 8. Ensayos de luciferasa. La actividad luciferasa se analizó en células HEK293 tras 24 horas de co-transfección con vectores de luciferasa conteniendo la región 3'UTR de los genes diana y con los mimic de los miRNAs o el control *negativo scrambled*. Los datos obtenidos de 4 experimentos independientes de transfección se expresaron como cambios relativos al valor de las células transfectadas con el control negativo *scrambled*, normalizado al 100%. * $p < 0.05$.

6.6 La alteración de la firma integrada por ARNm y miRNA fue estable en el tiempo y específica respecto a pacientes trombóticos sin enfermedad autoinmune

Tres meses después de la recolección de la primera muestra de sangre se evaluaron nuevamente los monocitos de varios pacientes con SAF incluidos en el estudio (n=21) con el fin de analizar la estabilidad de la firma compuestas por los genes interconectados. Los resultados demostraron que la expresión génica se mantuvo estable en la segunda muestra. Además, los niveles de expresión de esta firma evaluados en dos tiempos se encontraron significativamente correlacionados entre sí. Por lo tanto, nuestros datos apoyan la teoría de que los monocitos SAF muestran una firma protrombótica específica que permanece estable en el tiempo (**Figura 9 A**).

A continuación, para evaluar la especificidad de la alteración de la firma de ARNm encontrada en los monocitos de pacientes con SAF, y analizar si los cambios en la expresión de génica estaban influenciados por su estado protrombótico, se analizó otro grupo de enfermedad, que incluía 20 sujetos con trombosis, pero sin evidencia de enfermedad autoinmune relacionada. En estos pacientes trombóticos, los niveles de expresión de los ARNm seleccionados fueron significativamente diferentes de los niveles de expresión descritos en pacientes con SAF (**Figura 9 B**).

Paralelamente, se evaluó la expresión alterada de los miRNA validados en nuestra cohorte de SAF, en los monocitos de la cohorte de pacientes con trombosis, pero sin enfermedad autoinmune asociada. De nuevo, el perfil de miRNA de monocitos mostrado por esos pacientes eran distintos de los encontrados en pacientes con SAF primario (**Figura 9 C**).

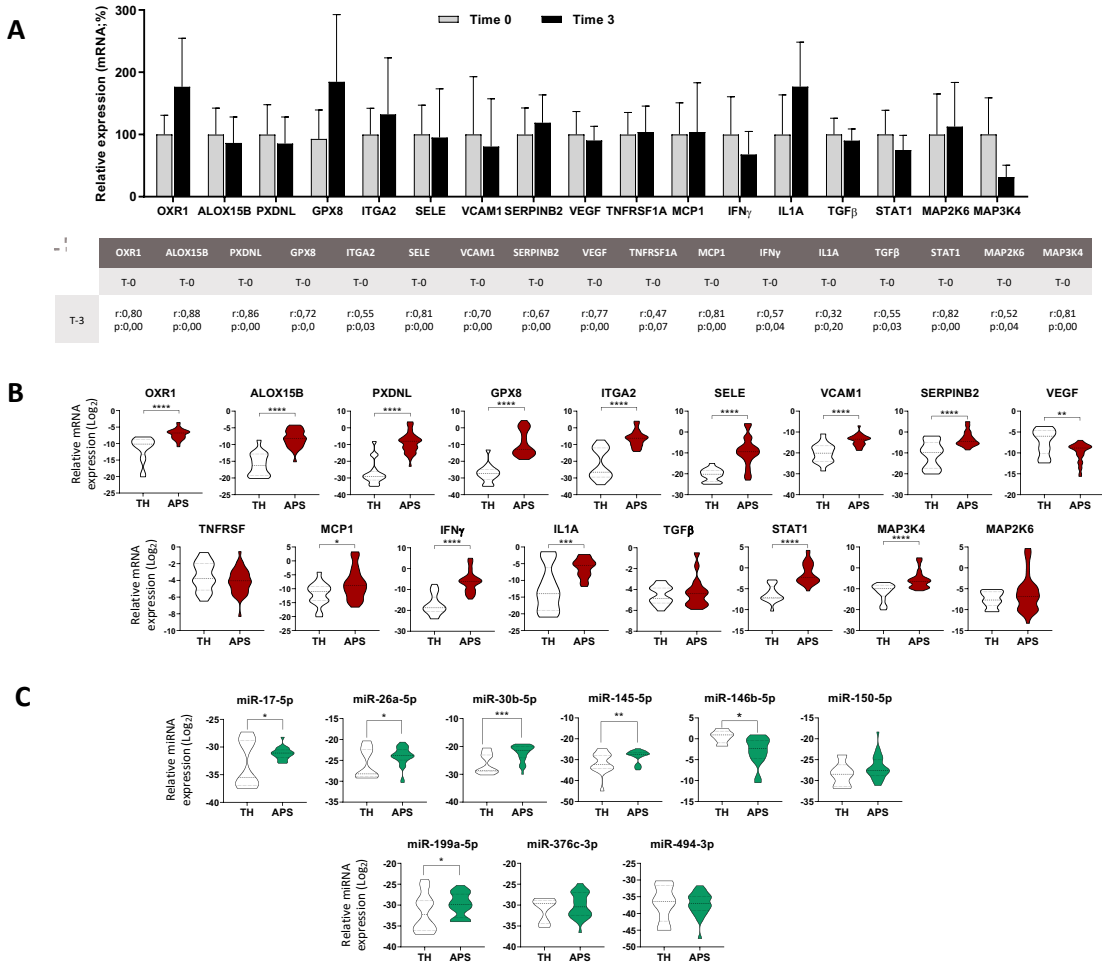


Figura 9. Análisis de la estabilidad y especificidad de la firma integrada por ARNm y miRNA en monocitos SAF. A) Gráfico de barras que muestra los niveles de expresión relativa de los genes alterados en los monocitos de pacientes SAF tres meses después de la primera toma de muestra de sangre. En la parte inferior se muestra una tabla con el coeficiente de correlación de Pearson y los valores p entre los niveles de expresión génica a nivel basal y tres meses después. B) Gráficos de violín representando la expresión de los genes alterados en los monocitos de pacientes SAF genes respecto a los pacientes trombóticos no autoinmunes. C) Gráficos de violín representando la expresión de miRNAs alterados en los monocitos de pacientes SAF genes respecto a los pacientes trombóticos no autoinmunes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. APS, síndrome antifosfolípido (del inglés *antiphospholipid syndrome*); TH, pacientes trombóticos no autoinmunes.

6.7 Potencial influencia del tratamiento estándar en SAF sobre la firma alterada de ARNm-miRNA en los monocitos de pacientes SAF.

Atendiendo al tratamiento principal recibido, se diferenciaron dos grupos de pacientes con SAF, de tal manera que un grupo estaba formado por 14 pacientes en tratamiento con antiagregantes plaquetarios (APL) y otro grupo por 20 pacientes con anticoagulantes orales (AC).

La comparación estadística entre dichos grupos de pacientes no mostró diferencias estadísticamente significativas en la firma de genes y miRNAs a excepción de los genes VEGF, TGFβ2, STAT-1 y del miR-17-5p, todos ellos altamente interrelacionados entre sí, jugando un papel importante en la regulación de la pared vascular^{77,84,85} (**Figura 10**).

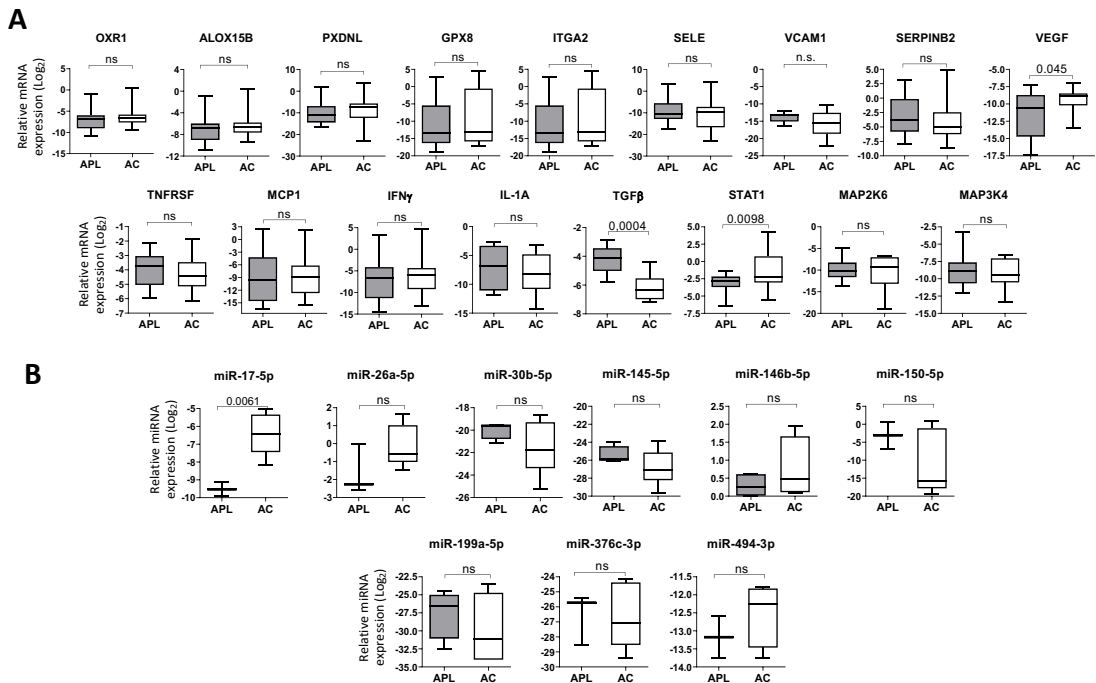


Figura 10. Análisis de la influencia de los tratamientos en la alteración de la firma integrada por ARNm y miRNA en monocitos de pacientes con SAF. Gráficos de cajas y bigotes representando la expresión de genes (A) y miRNAs (B) en los monocitos procedentes de los pacientes SAF que toma anticoagulantes (AC) o agentes antiplaquetarios (APL).

6.8 Los anticuerpos antifosfolípidos modularon el perfil molecular de los monocitos y promovieron disfunción endotelial

Los estudios de correlación demostraron una relación significativa entre la alteración en la regulación de varios genes y miRNAs con los niveles de anticuerpos antifosfolípido. Por tanto, títulos elevados de aCL o anti- β 2GPI de isotipo IgG, se correlacionaron positivamente con altos niveles de expresión de varios genes implicados en estrés oxidativo, señalización intracelular, trombosis e inflamación, y negativamente con niveles de expresión bajos de miR-26a-5p y miR-17- 5p (**Figura 11 A**).

Además, varios parámetros relacionados con la disfunción endotelial microvascular derivados del análisis de hiperemia oclusiva, como la reducción del área hiperémica (HA) y el flujo sanguíneo máximo tras oclusión temporal menos el flujo basal (Pf-Rf), se relacionaron negativamente con una mayor expresión de algunos genes involucrados en inflamación y aterosclerosis, y se asociaron positivamente a niveles reducidos de varios miRNAs (**Figura 11 B**).

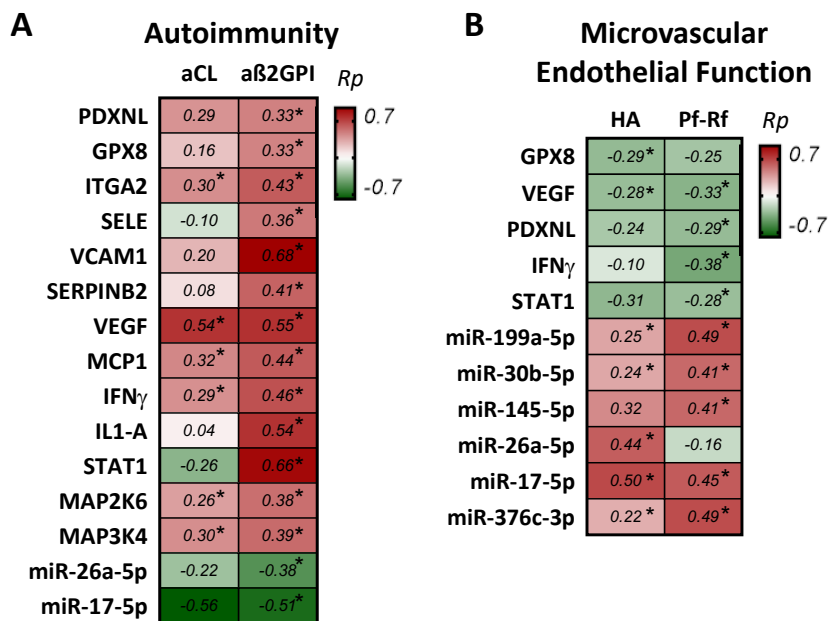


Figura 11. Análisis de correlación entre parámetros de autoinmunidad y función endotelial y la firma integrada de ARNm y miRNA en monocitos de pacientes con SAF. *Heatmap* que muestra el análisis de correlación entre genes/miRNA alterados en SAF y parámetros relacionados con autoinmunidad (A) o disfunción endotelial microvascular (B). Cada cuadrado representa el coeficiente de correlación de Spearman. Los colores rojo o verde representan los coeficientes de correlación de Spearman positivos o negativos, respectivamente. aCL, anticuerpos anti-cardiolipina; aβ2GPI, anti-B2glicoproteína I-; HA, área hiperémica; Pf-Rf, flujo sanguíneo máximo tras oclusión (*peak flow*) menos flujo basal (*rest flow*). * $p < 0.05$.

En base a estos resultados *in vivo* realizamos una serie de experimentos *in vitro* para analizar el papel específico de estos anticuerpos en la alteración molecular producida en monocitos y secundariamente en la disfunción endotelial derivada de esta.

Los anticuerpos antifosfolípidos de isotipo IgG purificados a partir del suero de pacientes con SAF (IgG-APS) promovieron la sobreexpresión de varios de los genes integrantes de la firma alterada en SAF, a través de la

reducción en los niveles de sus miRNA reguladores en los monocitos de donantes sanos asociaron positivamente a niveles reducidos de varios miRNAs (**Figura 12 A-C**).

Asimismo, la adición de sobrenadantes obtenidos de monocitos tratados con dichos autoanticuerpos (IgG-APS) a células endoteliales cultivadas promovió un aumento sustancial en los niveles de varios genes relacionados con la activación endotelial como eNOS, CCL2, VCAM1, ICAM1, SELE, TF, VEGFA, IL6 e IL8 (**Figura 12 D**).

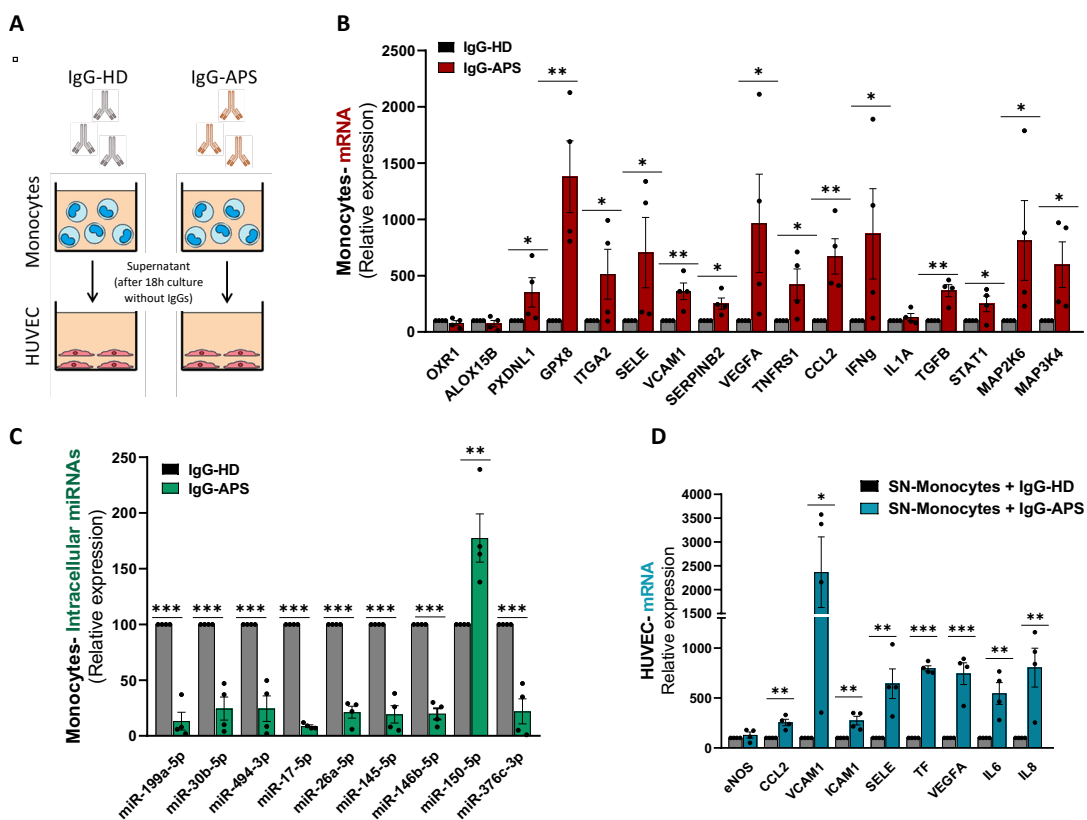


Figura 12. Efectos *in vitro* de los anticuerpos antifosfolípido sobre el perfil molecular monocítico y su impacto derivado en la función endotelial. A) Diagrama que resume el procedimiento experimental seguido en los ensayos *in vitro*. B) Análisis de expresión génica y de miRNAs (C) por RT-PCR de la firma molecular alterada en SAF, en los experimentos de monocitos sanos tratados con anticuerpos antifosfolípidos. D) Análisis de expresión génica por RT-PCR de una

serie de genes asociados a la función endotelial en células HUVEC tratadas con el sobrenadante de los experimentos de monocitos con anticuerpos antifosfolípidos. APS, síndrome antifosfolípido (del inglés *antiphospholipid syndrome*); HD, donantes sanos (del inglés *healthy donors*). * $p < 0.05$

6.9 El análisis de cluster no supervisado de la firma integrada por ARNm y miRNAs en SAF, estratificó a los pacientes según su riesgo trombótico

El análisis de cluster no supervisado mediante la metodología *k-means* en la cohorte completa de pacientes SAF utilizando los datos moleculares derivados del análisis de la firma de genes y miRNAs alterados en los monocitos de pacientes con SAF, permitió subdividir a los pacientes en 3 claros clusters o grupos con un perfil molecular distintivo (**Figura 13 A-B**). Destacaba la mayor alteración presente en los pacientes del cluster 1, los cuales mostraban los niveles más bajos de expresión de los miRNAs y los niveles de expresión más altos de los genes analizados.

Paralelamente, mediante otra herramienta bioinformática complementaria como el análisis de componentes principales (*PLS-DA*, *Partial Least-Squares Discriminant Analysis*), se pudo confirmar la clara estratificación de los pacientes en esos 3 grupos basados en su perfil molecular conjunto (**Figura 13 C**).

Posteriormente, determinamos los genes y miRNAs que más contribuían a la estratificación de los pacientes mediante otro análisis computacional (*VIP*, *variable importance in projection*) destacando e-selectina, miR-494-3p, PXDNL y GPX8 con una puntuación VIP superior a 1,5 (**Figura 13 D**).

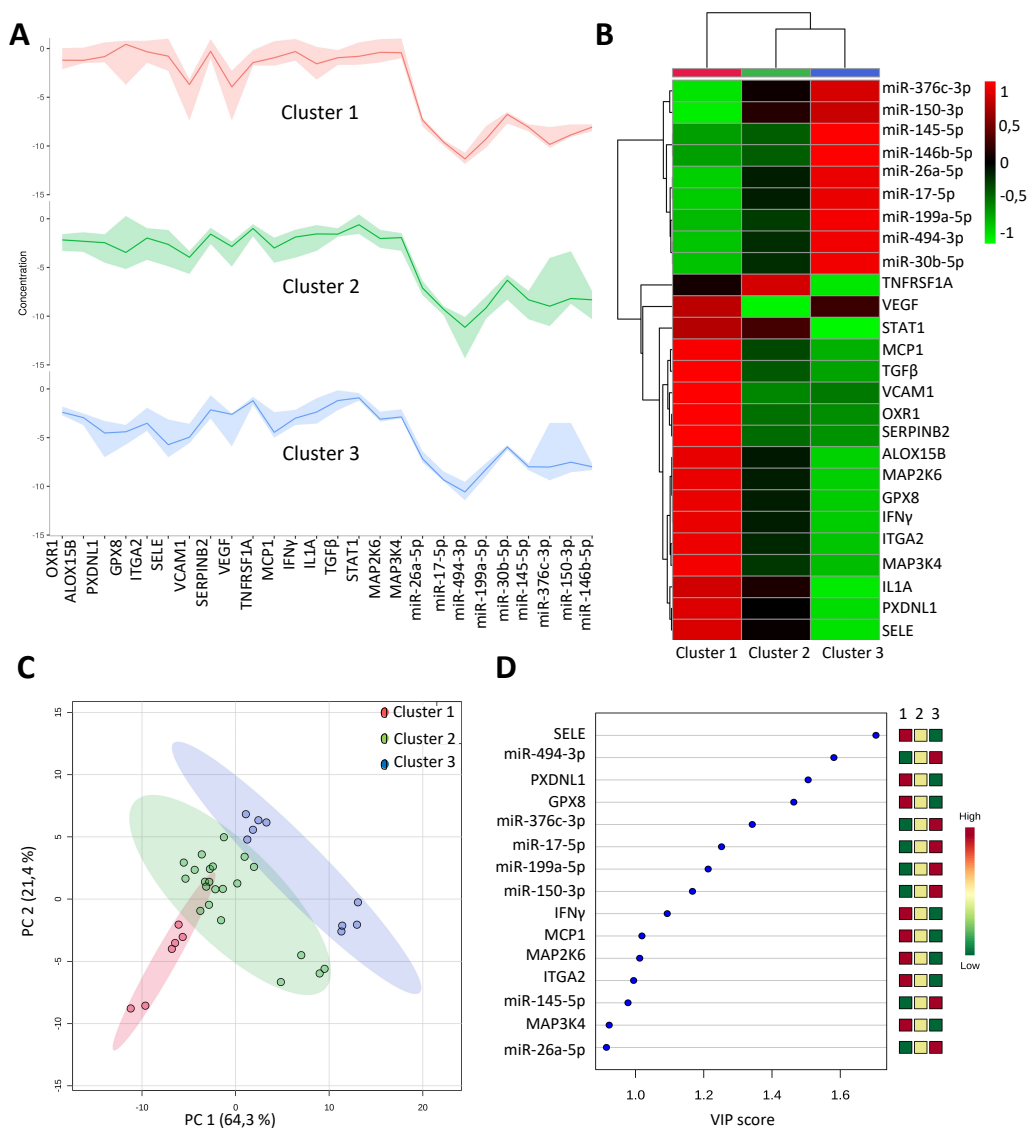


Figura 13. Análisis de cluster no supervisado en pacientes con SAF. A) Firmas moleculares identificadas partiendo de los genes y miRNAs alterados en monocitos de 40 pacientes con SAF mediante la plataforma MetaboAnalyst 4.0. Las líneas de colores gruesas representan los niveles medios de expresión de la firma molecular en cada subconjunto de pacientes. B) *Heatmap* representando los niveles medios de cada gen y miRNA presente en cada uno de los 3 clusters de pacientes con SAF. Los colores rojo y verde representan alta y baja expresión respectivamente. C) Análisis PLS-DA (*Partial Least-Squares Discriminant Analysis*) para estratificar a los pacientes SAF en diferentes subgrupos utilizando la firma de genes y miRNA en monocitos. La falta de superposición entre los tres grupos indica una separación molecular bien definida de los pacientes con SAF.

D) VIP análisis (*VIP, variable importance in projection*) de la importancia de cada variable molecular en la estratificación de los pacientes con SAF en los 3 clusters. El gráfico representa la contribución relativa de los genes y miRNA a la variación entre los tres grupos. Los recuadros verdes y rojos de la derecha indican si la expresión del gen y del miRNA aumenta o disminuye respectivamente en cada cluster.

A continuación, se evaluaron los perfiles clínicos y analíticos de cada cluster. Los pacientes pertenecientes al cluster 1 (16%) se caracterizaban por presentar trombosis previas (arteriales o venosas), con baja incidencia de morbilidad obstétrica (20%), alta positividad para anticuerpos antifosfolípido y alta prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares (hipertensión arterial, dislipidemia y tabaco).

Por el contrario, el cluster 3 (24%) se caracterizaba por pacientes más jóvenes, con una alta incidencia de trombosis y complicaciones obstétricas, pero baja positividad para anticuerpos antifosfolípido y con la menor prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares.

El cluster 2 (60%), representó un fenotipo clínico intermedio con presencia de eventos trombóticos previos y morbilidad obstétrica, una positividad intermedia de anticuerpos antifosfolípido y una prevalencia intermedia de factores de riesgo cardiovascular (**Figura 14 A-B**).

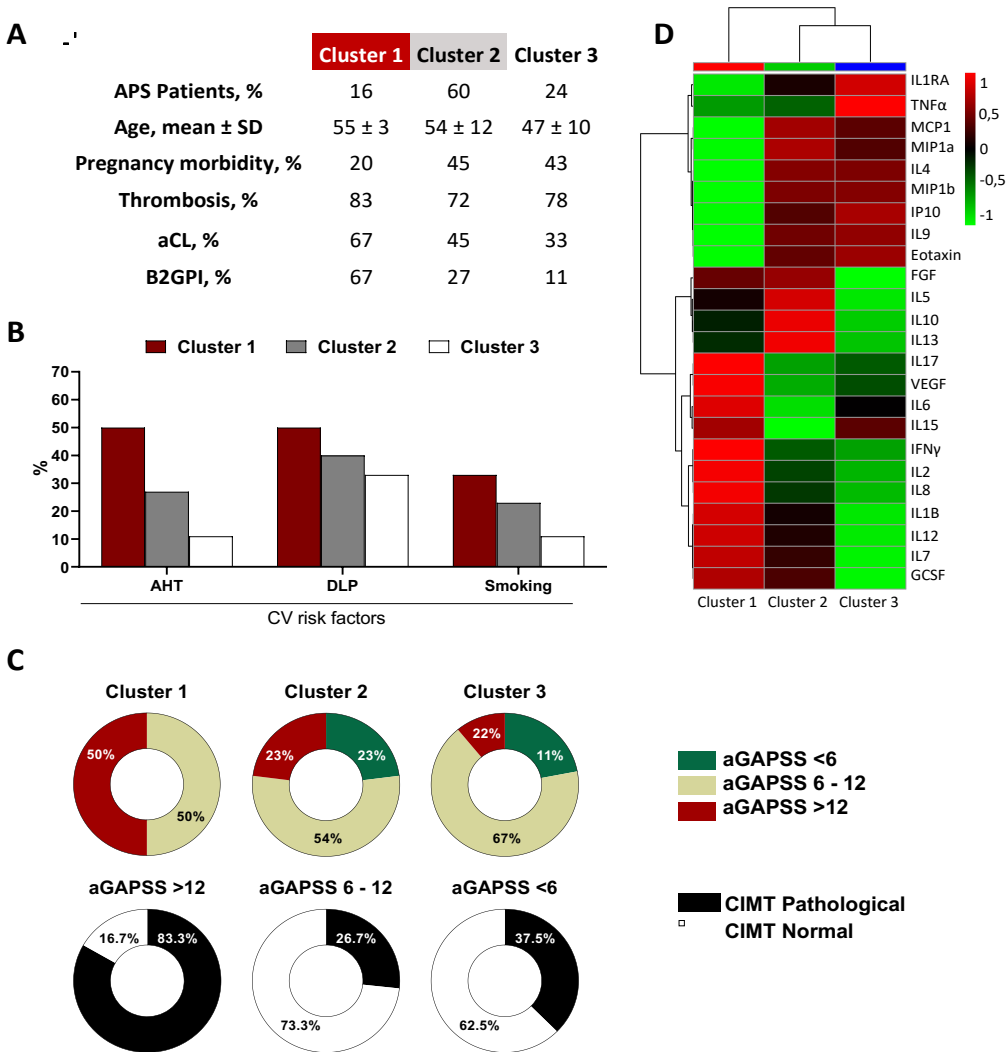


Figura 14. Evaluación clínica de los cluster moleculares identificados en pacientes SAF. A) Parámetros clínicos y de laboratorio de los pacientes con SAF pertenecientes a los 3 clusters de pacientes. B) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de factores de riesgo CV en pacientes con SAF pertenecientes a los 3 grupos. C) Diagramas circulares que muestran la distribución de los pacientes con diferentes puntuaciones de aGAPSS entre los tres clusters, así como la distribución de pacientes con el grosor de la íntimamedia carotídea (CIMT) patológico entre dichos grupos. D) *Heatmap* representando los valores medios de expresión de 27 citocinas, quimioquinas y moléculas de adhesión en el plasma de los pacientes SAF pertenecientes a los 3 clusters utilizando MetaboAnalyst 4.0. APS, síndrome antifosfolípido (del inglés *antiphospholipid syndrome*); aCL, anticuerpos anticardiolipina; B2GPI, beta 2 glicoproteína I; AHT, hipertensión arterial; DLP, dislipidemia; aGAPSS (*adjusted Global Anti-Phospholipid Syndrome Score*). * $p < 0.05$

Además, al comparar el score que estima el riesgo de trombosis en estos pacientes, aGAPSS (Adjusted Global Anti-Phospholipid Syndrome Score), entre los diferentes grupos, identificamos que el cluster 1 se caracterizaba por presentar una mayor prevalencia de pacientes con una puntuación de aGAPSS alta o moderada, mientras que en los clusters 2 y 3, más del 70% de los pacientes presentaban una puntuación de aGAPSS intermedia o baja. Igualmente, aquellos pacientes con el aGAPSS más alto mostraron la mayor incidencia en la presencia de placas de ateroma en el estudio ecográfico realizado (**Figura 14 A-C**).

Por último, el análisis del perfil inflamatorio circulante también resultó ser distintivo entre los cluster identificados presentando cada grupo patrones de expresión específicos y distintivos de interleucinas, quimioquinas y factores de crecimiento implicados en el daño vascular y la hematopoyesis (**Figura 14 D**).

Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria I. Perfiles de expresión de genes en monocitos de pacientes con SAF y donantes sanos procedentes del array exploratorio.

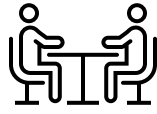
Genes	FC	Genes	FC	Genes	FC	Genes	FC	Genes	FC	Genes	FC
IL2	19,73	CBX2	3,16	MED8	2,52	STAT1	2,18	ZNF589	-2,01	KIAA0485	-2,38
COL3A1	16,82	FCRL4	3,16	OOEP	2,52	SERPIND1	2,18	PER1	-2,01	STAG3L1	-2,38
IFNG	12,83	SERPIND1	3,15	LOC440356	2,52	C11orf86	2,18	OXR1	-2,02	MALAT1	-2,39
VCAM1	10,50	FRMD8	3,15	CAND1	2,51	CD2AP	2,18	MAMDC4	-2,02	GLIPR1L2	-2,39
NPY	10,28	ZNF772	3,14	PLK2	2,51	ARL4A	2,18	AKAP13	-2,02	AKNA	-2,39
NAV3	8,45	ZNF323	3,14	RAB1A	2,51	SH3YL1	2,18	HKR1	-2,02	RASSF4	-2,42
WNT7B	7,63	ZNF675	3,13	C15orf27	2,50	CXCR7	2,17	GSDMB	-2,03	COL24A1	-2,42
CTNND2	7,03	PPP1R14D	3,13	SRP9	2,50	IGFBP2	2,17	UGGT2	-2,03	GPR125	-2,43
THOC4	6,57	TNFRSF1A	3,12	DEPDC1B	2,49	CAV3	2,17	PNPLA6	-2,04	VTI1A	-2,46
MMP3	6,55	LYZL6	3,10	TCAG7.873	2,49	ANKRD22	2,17	EXOSC6	-2,04	UACA	-2,46
NOS3	6,46	IBSP	3,08	TTC33	2,47	ERG	2,16	SPDYE5	-2,04	RCN3	-2,47
SYCP2L	6,08	KRT1	3,07	TRPM3	2,44	FGF2	2,16	ZNF644	-2,04	SMG6	-2,47
IL12B	5,98	C18orf16	3,06	DEC1	2,44	LOC441016	2,16	KIAA0319L	-2,04	LOC642826	-2,49
CCL23	5,80	GXYLT2	3,03	GPRIN3	2,44	KCNA2	2,16	ADHFE1	-2,04	IFFO2	-2,49
SELE	5,78	FLJ31813	3,02	BZW1	2,43	FGL1	2,15	ZXDC	-2,05	MRE11A	-2,50
SLC2A2	5,68	LRTM2	3,01	TF	2,43	BET1	2,15	DDX25	-2,05	DGCR8	-2,53
CSF2	5,55	RP11-631M21.2	3,01	AKR1B10	2,43	ZNF681	2,14	SFRS18	-2,06	KCNJ1	-2,53
ZSWIM5	5,46	RAB3IL1	3,00	S100P	2,43	PTGES3	2,14	TIMP2	-2,06	CBX5	-2,53
TMEM54	5,34	FABP3	2,99	ZNF254	2,42	PTGER4	2,14	FOSL1	-2,06	CSPP1	-2,54
CCL2	5,25	GBP7	2,97	ZNF595	2,41	ZNF493	2,14	HOXA10	-2,07	KCNQ1DN	-2,55
LAX1	4,98	CLDN16	2,97	MAP3K4	2,41	ANKRD12	2,12	SRGAP2	-2,07	FLT3	-2,55
ADAD2	4,97	EFCAB6	2,96	ZNF493	2,40	ADM	2,12	MAP2K6	-2,08	ZNF700	-2,57
ARID5B	4,89	SCG3	2,95	FAM69A	2,40	PPIC	2,11	DNAJB14	-2,08	SMARCC1	-2,58
DNAJB4	4,87	CDHR1	2,95	GBX2	2,40	ZNF92	2,11	FLJ25006	-2,08	ALOX15B	-2,59
FLJ30430	4,87	MGAM	2,95	FZD1	2,39	C14orf129	2,11	MTR	-2,09	UNQ1887	-2,59
AKR1C1	4,82	ZNF730	2,95	GPD1	2,39	OSTalpha	2,11	ZNF692	-2,09	PADI2	-2,60
ODZ2	4,81	DKK2	2,95	MIG7	2,39	C17orf71	2,11	ACPL2	-2,09	LAMA4	-2,64
YIPF7	4,54	CYBB	2,93	SPINK6	2,38	SPTLC1	2,11	NPIPL3	-2,09	KIAA1407	-2,65
FAM83A	4,54	ZNF56	2,91	LOXHD1	2,37	CLN5	2,10	ING5	-2,09	SNTB1	-2,71
L1TD1	4,53	FLJ40448	2,91	GGT7	2,37	SPAG17	2,10	UNQ1887	-2,10	NAA16	-2,72
ARID5B	4,41	SLC26A10	2,90	KCNK17	2,37	RHOA	2,10	ACTR5	-2,10	SPP1	-2,73
HNMT	4,34	PPIH	2,89	ZNF430	2,37	CDC42BPG	2,10	LRRC37A4	-2,10	CD200R1	-2,74
AKR1C1	4,29	CCL26	2,86	IFNAR1	2,37	KBTBD4	2,10	LOC284837	-2,10	ITSN1	-2,76
DEFA1	4,27	KIAA1244	2,86	PSMD5	2,37	SLC2A5	2,09	DOCK8	-2,10	LOC728153	-2,78
DNAJB4	4,24	ARID5B	2,85	LOC100130176	2,34	GATAD2A	2,09	HSPA4	-2,11	SCAI	-2,83
LIF	4,23	LIG4	2,84	AZGP1	2,34	GBP5	2,09	RUNDC2B	-2,11	SUN1	-2,83
NDUFA4L2	4,23	TGFB2	2,83	RAD51AP1	2,34	ANXA3	2,09	ZNF318	-2,11	DCAF4	-2,84
ADAMTS4	4,22	PRNT	2,83	IMPA1	2,34	C18orf18	2,09	LRRC37A2	-2,11	ZMYND8	-2,85
ZNF626	4,17	ZNF99	2,82	ZFR2	2,34	HIST2H3A	2,09	VPS13A	-2,12	C20orf94	-2,88
RGS11	4,14	ZNF107	2,82	USP38	2,34	LOC100133319	2,09	TRIM2	-2,12	ANKRD11	-2,92

LIG4	4,14	LOC349408	2,81	CACNB2	2,33	ZDHHC13	2,08	LOC595101	-2,12	C20orf96	-2,93
CCNE2	4,02	FZD7	2,81	ABHD13	2,33	ZNF429	2,08	GPAM	-2,13	LRRFIP1	-2,93
OR11H12	4,02	DEFB105B	2,80	SPATA19	2,33	MFSD5	2,08	ZNF558	-2,13	PLGLB1	-2,95
GPX8	4,02	MUCL1	2,78	TMCC3	2,32	FAM8A1	2,08	MYO15B	-2,13	TSKS	-2,99
1P2	4,00	GJC3	2,77	IL1A	2,32	ORAI2	2,07	NRIP2	-2,13	PIK3R3	-2,99
RABL3	4,00	LOC55908	2,77	EDNRB	2,31	E2F8	2,07	PBOV1	-2,14	UNC5B	-3,22
COL5A2	3,99	SKA1	2,76	CREM	2,31	C22orf45	2,07	NCRNA00105	-2,14	LOC374491	-3,24
DMD	3,98	ATG9B	2,75	C19orf21	2,31	ZFX	2,07	U2AF1	-2,15	CD200R1	-3,35
IGFBPL1	3,89	TGM2	2,74	C6orf52	2,30	SETMAR	2,07	CAPS	-2,15	HOXA7	-3,38
THNSL2	3,87	ZNF681	2,74	FRMD7	2,29	TNFSF9	2,07	KIDINS220	-2,15	MGC16384	-3,39
ZNF728	3,87	OR6N1	2,71	RBPJ	2,29	TMEM165	2,06	CKAP5	-2,15	C7orf54	-3,47
RASGRF1	3,85	STEAP1	2,71	KIF14	2,29	FLJ36848	2,06	DZIP3	-2,16	GFRA2	-3,48
GPR18	3,85	ZNF396	2,71	TRAPPC2P1	2,29	CD55	2,06	MGC21881	-2,16	JMJD1C	-3,54
ARID5B	3,84	TMEM133	2,71	ZCCHC5	2,28	STOX2	2,06	MST1P2	-2,17	ZMYND8	-3,57
LOC100133019	3,77	RAB5A	2,71	SUV420H1	2,28	ADAMTS13	2,05	MLLT10	-2,17	GIGYF1	-3,63
EGR1	3,76	MAL2	2,71	BNC1	2,28	LOC646470	2,05	ADCK1	-2,17	FBXW8	-3,71
SLFN5	3,75	SLFN13	2,70	MYL4	2,28	CENPBD1	2,05	CLN8	-2,17	C1orf173	-3,74
SERPINB2	3,74	MFAP3	2,70	SRP9	2,27	IL22RA2	2,04	USP36	-2,18	MBTD1	-3,77
DIO3OS	3,70	ZNF714	2,70	PTCD2	2,27	CD46	2,04	LOC729978	-2,19	CAMSAP1	-3,94
CALCA	3,68	HEXIM1	2,70	ZNF708	2,27	BUB1B	2,04	LPA	-2,20	LOC388796	-4,08
BNC2	3,67	C14orf119	2,69	ZNF277	2,26	ZNF100	2,04	ETV3	-2,20	KIAA1652	-4,27
RASGRF2	3,67	ARC	2,69	DMRTB1	2,26	DNAJB6	2,04	SFRS12	-2,20	CEP290	-4,30
SLC17A1	3,65	ZNF714	2,69	SLC2A3	2,26	FPR1	2,03	ITSN2	-2,20	IL5	-4,43
FNIP1	3,65	LOH12CR2	2,68	C10orf18	2,26	ZNF254	2,03	C18orf50	-2,21	RAX2	-4,56
KCNH6	3,63	GYG2	2,67	ZNF732	2,26	FKBP1A	2,03	DHODH	-2,21	PDGFRB	-4,95
NEBL	3,62	LIG4	2,67	SMTNL2	2,26	C5AR1	2,02	LOC100190986	-2,21	CEP290	-5,34
KRTAP3-2	3,58	ZNF43	2,67	ACTC1	2,25	BTN2A2	2,02	C7orf58	-2,22	LOC389634	-5,70
NEIL3	3,55	FAT3	2,67	HSD17B12	2,25	SPAG1	2,02	GALNT10	-2,22	OCLN	-6,42
PXDNL	3,53	FPR2	2,65	NFATC1	2,25	PRLR	2,02	GFRA2	-2,22	IL3	-8,04
ITGA2	3,51	VCX2	2,65	RAB1A	2,24	NT5C1A	2,02	SEMA6A	-2,23	ELN	-9,90
LOC441666	3,51	ZNF85	2,65	C3orf38	2,24	VPS26A	2,02	C21orf96	-2,23	KDR	-10,54
LOH12CR1	3,47	CISH	2,65	TREML3	2,24	KLHDC7B	2,02	SAMD1	-2,23	SLC7A10	-11,99
ZNF141	3,46	CDCP1	2,65	CD46	2,23	SH3RF3	2,02	TARDBP	-2,24		
LOC100133315	3,45	PPP1CB	2,63	C15orf37	2,23	ATG3	2,01	C5	-2,24		
FZD10	3,45	FGF13	2,62	CDC23	2,23	UNC93A	2,01	ZBTB43	-2,24		
MKI67	3,43	KRTDAP	2,62	ZNF273	2,23	MS4A4A	2,01	FAM106A	-2,25		
RPL23	3,40	MME	2,62	LOC441722	2,23	TMEM167A	2,01	CHAD	-2,25		
ASXL3	3,40	LOC100288077	2,62	LOC284242	2,23	TIFA	2,01	TCOF1	-2,25		
APOE	3,39	ZNF492	2,62	PRLR	2,23	ZNF714	2,01	ZBTB20	-2,25		
ZNF117	3,38	ZNF716	2,62	CHST2	2,23	KIF20A	2,01	DNAJC24	-2,25		
FAM190A	3,38	GPR174	2,61	ATF1	2,23	RPE65	2,01	SIRPB2	-2,26		
CLDN12	3,31	CHIC2	2,60	ZNF154	2,22	PDZD3	2,01	CYP2C19	-2,28		
IL17B	3,31	BCAT1	2,60	GPC3	2,22	EGFLAM	2,01	SLC9A1	-2,28		
HS6ST2	3,30	HLA-DRB3	2,58	C18orf1	2,21	IL18	2,01	FAM183B	-2,28		
DGCR5	3,29	TTC30A	2,58	KDELRL2	2,21	VEGFA	2,00	LOC399491	-2,29		
LAX1	3,27	GMFB	2,58	LOC643037	2,21	PPIAL4A	2,00	CCDC41	-2,30		

LOH12CR1	3,26	LRRN4	2,57	LOC158381	2,21	RNASE8	2,00	AKAP13	-2,30
DPYSL5	3,25	TOLLIP	2,56	TNC	2,21	CDC42EP2	2,00	SPTBN1	-2,30
OR6K2	3,24	J1	2,55	MOBK13	2,20	CTAG1A	2,00	EZH1	-2,31
CKAP2	3,24	C12orf48	2,55	C15orf57	2,19	KLHL9	-2,01	CDC42BPA	-2,32
APOB	3,23	NUB1	2,54	TRIP11	2,19	LOC728392	-2,01	DUOX1	-2,33
SMAD6	3,22	ZCCHC4	2,54	TCP1	2,19	CDK11A	-2,01	LRRC37A2	-2,34
RYR2	3,20	ZNF826	2,54	KLHDC7B	2,19	ZSCAN18	-2,01	MLLT10	-2,35
CENPM	3,18	AKR1B10	2,53	OBFC2A	2,19	LOC728640	-2,01	BICD1	-2,36
C3orf24	3,17	SGCD	2,53	GEMIN8P4	2,19	TPST1	-2,01	SAMD1	-2,38

Tabla Suplementaria II. Perfiles de expresión de miRNA en monocitos de pacientes con SAF y donantes sanos procedentes del array exploratorio.

Monocytes from APS patients vs HD	
miRNA	Fold change
hsa-miR-299-3p	-4,34
hsa-miR-579	-2,93
hsa-miR-494	-2,70
hsa-miR-221-3p	-2,63
hsa-miR-4516	-2,58
hsa-miR-145-5p	-2,57
hsa-miR-146b-5p	-2,52
hsa-miR-371a-3p	-2,45
hsa-miR-18a-5p	-2,29
hsa-miR-107	-2,24
hsa-miR-26a-5p	-2,23
hsa-miR-518c-3p	-2,23
hsa-miR-199a-5p	-2,21
hsa-miR-376c	-2,19
hsa-miR-126-3p	-2,19
hsa-let-7f-5p	-2,14
hsa-miR-30b-5p	-2,13
hsa-miR-106a-5p	-2,10
hsa-miR-17-5p	-2,10
hsa-miR-29a-3p	2,12
hsa-miR-451a	2,49
hsa-miR-150-5p	5,19



DISCUSIÓN

7. Discusión

El presente estudio ha desarrollado un análisis integrado que combina datos clínicos y conjuntos de datos moleculares procedentes de tecnologías de alto rendimiento mediante herramientas computacionales avanzadas con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores y vías de regulación alteradas asociadas al desarrollo del Síndrome Antifosfolípido. Este análisis permitió la identificación de una firma de ARNm y miRNAs alterados que estratificaba a los pacientes según su riesgo trombótico.

En primer lugar, el análisis del perfil de expresión génica en monocitos identificó redes específicas de genes involucradas en respuesta inflamatoria, adhesión celular o angiogénesis, entre otras. La alteración de todas estas funciones biológicas se ha asociado previamente al desarrollo de aterosclerosis y trombosis⁸⁶⁻⁸⁷. Además, se identificó de forma específica una alteración en una serie de genes implicados en señalización intracelular asociada a procesos como diferenciación celular, inflamación y reacciones inmunes, evidenciando un papel relevante en la patogénia del SAF. En línea con estos resultados, un array de activación de señalización celular demostró que varios de esos mediadores intracelulares, los cuales ya se ha demostrado que controlan la expresión de la mayor parte de las moléculas pro-trombóticas e inflamatorias que se encuentran desreguladas en pacientes con SAF²⁵, e incluso activadas por anticuerpos antifosfolípido^{33,88-89}, mostraron un estado fosforilado, reflejando su papel clave como vías moleculares involucradas en la actividad de la enfermedad de esta patología.

De forma paralela, el análisis del perfil de miRNAs en monocitos, identificó numerosos miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con SAF. El

análisis funcional de estos miRNAs reveló la asociación de muchos de ellos a vías moleculares involucradas en la regulación del sistema inmunológico, inflamación y enfermedad cardiovascular, de forma similar a lo anteriormente evidenciado en el caso del análisis de expresión génica en estas células.

Las aproximaciones computacionales llevadas a cabo para integrar ambos sets de datos transcriptómicos como una estrategia experimental novedosa para abordar el estudio de enfermedades complejas como esta, permitió caracterizar una red de interacción entre genes íntimamente conectados entre sí y sus miRNAs reguladores, los cuales estaban alterados y asociados tanto al perfil autoinmune de los pacientes con SAF como al desarrollo de aterosclerosis, trombosis y enfermedad renal. Además, pudimos demostrar la relación directa entre los miRNAs alterados y sus genes diana en los monocitos de pacientes con SAF mediante la observación de una expresión alterada *in vivo* simultánea y con sentido inverso, así como aquella relacionada con la validación experimental *in vitro* mediada por la inhibición específica de varios genes diana después de inducir la sobreexpresión de sus miRNA reguladores en monocitos purificados de pacientes con SAF.

De entre los miRNA desregulados, aquellos seleccionados para los ensayos de transfección, los cuales mostraban el mayor número de genes diana en los análisis *in silico*, estaban estrechamente asociados con el desarrollo de trombosis, aterosclerosis y complicaciones obstétricas. Así, por ejemplo, se ha demostrado que miR-145 participa en la estabilización de la placa ateromatosa⁹⁰. Además, un estudio reciente ha demostrado que este miRNA es una molécula clave en la regulación de la formación de trombos a nivel venoso, siendo el Factor Tisular su principal diana. Asimismo, miR-

30b se ha implicado en diversos mecanismos asociados al remodelado cardíaco⁹¹ y a la cardiopatía isquémica⁹². Del mismo modo, miR146b-5p es un regulador clave de inflamación, activación endotelial y aterosclerosis⁹³, y ha estado involucrado en varios trastornos cardiovasculares como la diabetes tipo 2⁹⁴ y el infarto de miocardio⁹⁵. Por último, se ha encontrado que miR199a-5p está sobreexpresado en el tejido placentario de pacientes con preeclampsia⁹⁶ y que su expresión se encuentra reducida en pacientes con tromboembolismo venoso⁹⁷.

En el presente estudio, la sobreexpresión inducida de tres de estos miRNAs (miR30b-5p, miR145-5p y miR199a-5p) promovió la inhibición de la actividad procoagulante de los monocitos de pacientes con SAF, evidenciada por una reducción de la actividad del Factor Tisular. Este factor está implicado en la activación de la cascada de la coagulación, de tal forma que los elementos que regulan positivamente su expresión podrían promover eventos trombóticos. Además, el SAF se caracteriza por una alta expresión de Factor Tisular en monocitos, íntimamente asociada al desarrollo de trombosis²⁵. Por lo tanto, el presente estudio sugiere que los niveles endógenos de estos miRNA pueden ser críticos para la actividad alterada de los monocitos en SAF y, por lo tanto, involucrados en el desarrollo de trombosis.

Para evaluar la especificidad de las firmas de ARNm y miRNAs alterados en SAF, analizamos la expresión de estas moléculas en una nueva cohorte de pacientes, caracterizada por presentar eventos trombóticos previos sin enfermedades autoinmunes asociadas. Estos análisis mostraron patrones de expresión diferencial entre estas dos cohortes. Nuestros resultados confirman aquellos encontrados en estudios previos donde se demostró la presencia de perfiles alterados específicos tanto de ARNm como de

mRNAs en monocitos y neutrófilos en pacientes trombóticos no autoinmunes⁷⁴. En comparación con los pacientes con SAF, esto puede reflejar el patrón diferencial de regulación y actividad de genes y miRNA en pacientes con trombosis y respaldar la idea de que el papel de los autoanticuerpos en el SAF puede ser crucial. Los efectos *in vitro* de los anticuerpos antifosfolípido de isotipo IgG purificados a partir del suero de pacientes con SAF sobre la desregulación de la expresión de ARNm y miRNAs en monocitos demostrada en nuestro estudio respaldaron aún más esta hipótesis.

En el SAF primario, los anticuerpos antifosfolípidos constituyen un predictor independiente tanto de trombosis como de un grosor de la íntima-media carotídea elevado, lo que a su vez define el principal marcador de enfermedad vascular aterosclerótica^{33,98}. En este estudio, proporcionamos más evidencias de que estos autoanticuerpos pueden ser un factor de riesgo adicional de trombosis en SAF. Por un lado, demostramos *in vivo*, la relación entre los títulos de anticuerpos antifosfolípidos y los niveles de varios miRNA y ARNm de monocitos que codifican proteínas asociadas al desarrollo de inflamación y trombosis. Por otro lado, *in vitro*, identificamos la modulación de varias de esas moléculas clave en monocitos sanos tras el tratamiento con anticuerpos antifosfolípidos.

La inflamación vascular es un proceso temprano en el desarrollo de aterosclerosis, y muchos genes y miRNAs inducen dicha alteración en las células endoteliales⁹⁹. En el presente estudio, pudimos demostrar, *in vivo*, una relación directa entre una serie de genes y miRNA alterados en monocitos y la presencia de una disfunción endotelial microvascular en pacientes con SAF. Además, demostramos que los monocitos activados

por los anticuerpos antifosfolípidos secretan una serie de factores que indirectamente promueven la activación anormal de las células endoteliales. Además, los estudios de transfección mostraron que la sobreexpresión inducida por miR-146b-5p redujo la capacidad de adhesión celular de los monocitos. Esta adhesión se considera un paso inicial en el desarrollo de la placa aterosclerótica, la cual está influenciada por una serie de moléculas señalizadoras y por el estado de las células endoteliales¹⁰⁰. Por lo tanto, nuestro estudio añade información relevante a este proceso aún desconocido, al mostrar la posible participación de la expresión reducida de miR146b-5p de monocitos en el desarrollo de aterosclerosis en el contexto de SAF.

Por otro lado, el análisis de clusters permitió identificar subgrupos de pacientes con SAF que mostraban patrones moleculares distintivos asociados a su vez con diferentes perfiles clínicos. Así, las pacientes del cluster 1, con mayor incidencia de trombosis, prevalencia de autoanticuerpos, factores de riesgo CV, y presencia de placas de ateroma y escasas complicaciones obstétricas, demostraron tener en sus monocitos una mayor alteración en la expresión de genes y miRNAs implicados en el inicio de la cascada de coagulación, así como en la proliferación, adhesión y migración de células a focos inflamatorios. Por el contrario, los pacientes del cluster 3, los cuales eran más jóvenes, con alta incidencia de trombosis y complicaciones obstétricas, pero baja positividad para anticuerpos antifosfolípido y menor prevalencia de factores de riesgo CV, no mostraron alteraciones significativas en la expresión de estos genes y miRNA. Además, se identificó un perfil inflamatorio específico en el plasma de los pacientes con SAF, en el que los pacientes pertenecientes a cada grupo mostraban patrones de

expresión específicos y distintivos de interleuquinas, quimioquinas y factores de crecimiento implicados en el daño vascular y la hematopoyesis. Esos resultados permitieron identificar firmas específicas de genes, miRNA y proteínas que podrían constituir potenciales biomarcadores susceptibles de ser modificados terapéuticamente para controlar la patología cardiovascular de los pacientes con SAF, así como emplearse en el manejo clínico de estos pacientes si se validara en estudios independientes.

De forma global, nuestros datos coinciden fundamentalmente con los obtenidos recientemente por Ripoll y colaboradores⁶⁷ en relación a los genes que son clave en el SAF trombótico y obstétrico, los cuales se identificaron en un estudio de expresión diferencial y variabilidad genética en monocitos expuestos, *in vitro*, a IgG de pacientes con SAF con trombosis o morbilidad obstétrica. Sin embargo, como también afirman estos autores, los pacientes con SAF son muy complejos y heterogéneos.

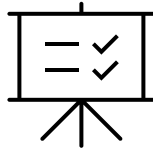
En nuestro estudio hemos realizado un análisis más complejo donde se estratificaron molecularmente los pacientes en primer lugar y se contrastó con sus perfiles clínicos en segundo lugar, y donde se integraron diferentes aspectos, como la influencia de la autoinmunidad, la ocurrencia simultánea de complicaciones obstétricas y eventos trombóticos, la concomitancia de factores de riesgo cardiovascular y la presencia de placas de ateroma. En su conjunto, todos estos factores heterogéneos conforman una red compleja que probablemente promuevan la alteración del perfil molecular que muestran los monocitos de estos pacientes, más que un único factor como los autoanticuerpos que señalaban los autores anteriormente mencionados. En relación con este aspecto, en nuestro estudio, el perfil molecular se mostró más alterado en aquellos pacientes

que presentaban diferentes características de la enfermedad de forma simultánea. Este perfil podría incluso contribuir de forma paralela a la identificación de sujetos con mayor riesgo de padecer este tipo de patología.

La principal limitación de este estudio sería el número relativamente pequeño de pacientes reclutados, de forma que el análisis de clusters por ejemplo derivó en la identificación de grupos de pacientes relevantes, pero con un número reducido de sujetos. Sin embargo, los grupos identificados fueron homogéneos en sus perfiles clínicos, en cuanto a incidencia y recurrencia de eventos trombóticos, tratamientos recibidos o tiempo de evolución de la enfermedad, entre otros. Además, el perfil molecular de cada grupo también demostró homogeneidad en parámetros como el perfil protrombótico / proinflamatorio o alteraciones de los perfiles de ARNm o miRNA. En relación con ello, un estudio reciente, desarrollado en una amplia cohorte de pacientes con positividad para anticuerpos antifosfolípido procedentes de un registro internacional (*APS Action*), realizó un análisis de agrupamiento que también permitió identificar fenotipos clínicos bien definidos entre estos pacientes¹⁰¹. Aunque en ese estudio también se incluyeron otras enfermedades autoinmunes como el Lupus y se restringió a la evaluación de los perfiles clínicos, sus resultados demostraron la idoneidad de este enfoque para estratificar a los pacientes con SAF, lo que respalda que los análisis clínicos y moleculares integrados podrían permitir una comprensión más profunda de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el SAF.

Aunque la relevancia del papel de los monocitos en el desarrollo de trombosis en SAF se ha demostrado en varios estudios anteriores, más recientemente, se ha establecido la importancia de otras células inmunes

innatas y adaptativas en la patología de SAF. Así, se ha demostrado que los anticuerpos antifosfolípido tienen el potencial de activar monocitos, neutrófilos y células dendríticas plasmocitoides. Las alteraciones en la homeostasis de las células T en pacientes con SAF contribuyen aún más a la inmunopatología de esta enfermedad¹⁰². Por lo tanto, para delinear el papel de la respuesta inmune en la fisiopatología del SAF, y para revelar buenos biomarcadores pronósticos y diagnósticos, sería necesario desarrollar un enfoque integrado de perfiles de células inmunes. Nuevos análisis transcriptómicos en pacientes utilizando nuevas tecnologías como la secuenciación de célula única (Single-Cell RNAseq) añadiría información nueva e interesante en este sentido.

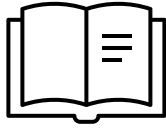


CONCLUSIONES

8. Conclusiones

1. Los monocitos de pacientes con SAF presentan una alteración en la expresión de genes y miRNAs asociados con la regulación de procesos biológicos directamente relacionados con la fisiopatología de esta enfermedad autoinmune.
2. Los anticuerpos antifosfolípidos promueven la alteración de la expresión de genes y miRNAs específicos, con un papel clave en la activación de los monocitos y las células endoteliales.
3. El análisis integrado de genes y miRNAs alterados en los monocitos de pacientes con SAF, ha permitido la caracterización de una firma molecular específica con capacidad de estratificar a los pacientes en base a su riesgo cardiovascular.
4. La red de interacción identificada, conformada por genes y miRNAs alterados en los monocitos de pacientes con SAF, podrían constituir nuevos biomarcadores que permitieran un mejor manejo de la enfermedad, así como el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

En su conjunto, nuestro estudio demuestra que el análisis del perfil molecular obtenido con tecnologías de alto rendimiento y herramientas bioinformáticas avanzadas, en combinación con una caracterización clínica exhaustiva, constituye una aproximación experimental que permite identificar fenotipos clínicos relevantes distintivos, lo que podría favorecer en el futuro un manejo más personalizado de estos pacientes.



BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía

1. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2002 Mar 07;346(10):752-63
2. Amengual, O.; Fujita, D.; Ota, E.; Carmona, L.; Oku, K.; Sugiura-Ogasawara, M et al. Primary prophylaxis to prevent obstetric complications in asymptomatic women with antiphospholipid antibodies: A systematic review. *Lupus* 2015, 24, 1135–1142.
3. 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 Haemostat*. 2006; 4:295-306
4. X. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med*. 2018 May 24;378(21):2010-2021.
5. Hannah Cohen, Maria J Cuadrado, Doruk Erkan, Ali Duarte-Garcia, David A Isenberg , Jason S Knight et al. 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Treatment Trends. *Lupus* 2020, Vol. 29(12) 1571–1593.
6. Dafer, R.M.; Biller, J. Antiphospholipid syndrome: Role of antiphospholipid antibodies in neurology. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2008, 22, 95–105.
7. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC et al. Catastrophic Antiphospholipid Syndrome Registry Project Group. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus*. 2003;12(7):530-4.
8. Cervera R, Font J, Gómez-Puerta JA, Espinosa G, Cucho M, Bucciarelli S, et al. Catastrophic Antiphospholipid Syndrome Registry Project Group. Validation of the preliminary criteria for the classification of catastrophic antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2005 Aug;64(8):1205-9.
9. Connors JM. Thrombophilia Testing and Venous Thrombosis. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 21 de septiembre de 2017;377(12):1177-87).
10. Ahluwalia J, Sreedharanunni S. The Laboratory Diagnosis of the Antiphospholipid Syndrome. *Indian J Hematol Blood Transfus*. Marzo de 2017;33(1):8-14.2).

11. Simanek R, Panzer S, Lechner K, Pabinger I. Late spontaneous remissions in severe adult autoimmune thrombocytopenia. *Ann Hematol.* 2007 Oct;86(10):705-10.
12. Hell L, Ay C, Posch F, Gebhart J, Koder S, Mackman N, et al. Low extracellular vesicle-associated tissue factor activity in patients with persistent lupus anticoagulant and a history of thrombosis. *Ann Hematol.* 2019 Feb;98(2):313-319.
13. Zoaib S.Rasool, Vivekanand Tiwari. Biochemistry, Lupus Anticoagulant. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. 2021 Jul 22.
14. Giannakopoulos, B. & Krilis, S.A. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N. engl. J. Med.* 368, 1033-1044 (2013);
15. Savino Sciascia, Mary-Carmen Amigo, Dario Roccatello and Munther Khamashta. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Rheumatol.* 2017 Sep;13(9):548-560.
16. Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, Puurunen M. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: a nationwide study. *Lupus* 2014;23:1468.
17. Pengo V, Testa S, Martinelli I, Ghirarduzzi A, Legnani C, Gresele P, Passamonti SM, Bison E, Denas G, Jose SP, Banzato A, Ruffatti A. Incidence of a first thromboembolic event in carriers of isolated lupus anticoagulant. *Thromb Res.* 2015 Jan;135(1):46-9
18. Sciascia S, Radin M, Sanna G, Cecchi I, Roccatello D, Bertolaccini ML. Clinical utility of the global anti-phospholipid syndrome score for risk stratification: a pooled analysis. *Rheumatology* 2018;57:661-665.
19. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology (Oxford).* 2013 Aug;52(8):1397-403
20. Bertolaccini ML, Sanna G. The Clinical Relevance of Noncriteria Antiphospholipid Antibodies. *Semin Thromb Hemost.* 2018 Jul;44(5):453-457.
21. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Gresele P, Barcellona D, Erba N et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* (2010) 8:237-42.
22. Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost.* (2009) 7:1767-73.

23. Cuadrado MJ, Lopez-Pedrerera C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: A pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum.* 1997;40:834–41)
24. Lopez-Pedrerera C, Aguirre MA, Buendia P, Barbarroja N, Ruiz-Limón P, Collantes-Estevez E et al. Differential expression of protease-activated receptors in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome. *ArthritisRheum.* 2010;62:869–77)
25. Lopez-Pedrerera C, Buendia P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, BarbarrojaN, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipidsyndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activatedprotein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum.*2006;54:301–11.
26. Cuadrado MJ, Buendia P, Velasco F, Aguirre MA, Barbarroja N, Torres LA, et al. Vascular endothelial growth factor expression in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2461–9)
27. Lopez-Pedrerera C, Cuadrado MJ, Hernandez V, Buendía P, Aguirre MA, Barbarroja N, et al. Proteomic analysis in monocytes of antiphospholipid syndrome patients: Deregulation of proteins related to the development of thrombosis. *ArthritisRheum.* 2008;58:2835–44.
28. Benhamou Y, Bellien J, Armengol G, Brakenhielm E, Adriouch S, Iacob M, et al. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in mediating endothelial dysfunction and arterial remodeling in primary arterial antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* (2014) 66:3210–20.
29. Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, Liu X, Romay-Penabad Z, De Micheli V, et al. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis.* (2007) 66:1327–33.
30. Satta N, Kruihof EK, Fickentscher C, Dunoyer-Geindre S, Boehlen F, Reber G, et al. Toll- like receptor 2 mediates the activation of human monocytes and endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Blood.* (2011) 117:5523–31.
31. Willis R, Pierangeli SS. Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Auto Immun Highlights.* (2011) 2:35–52.
32. Veres K, Lakos G, Kerenyi A, Szekanecz Z, Szegedi G, Shoenfeld Y, et al. Antiphospholipid antibodies in acute coronary syndrome. *Lupus.* (2004) 13:423–7.

33. Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limón P, Aguirre MA, Bertolaccini ML, Khamashta MA, Rodríguez- Ariza A, et al. Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q(10) treatment. *Blood*. (2012) 119:5859–70.
34. Ames PR, Antinolfi I, Scenna G, Gaeta G, Margaglione M, Margarita A. Atherosclerosis in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. (2009) 7:537–42.
35. Hasunuma Y1, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages *Clin Exp Immunol*. 1997 Mar;107(3):569-73.
36. Vaarala O. Antiphospholipid Antibodies and Atherosclerosis. *Lupus*. 1996;5(5):442-447
37. Cugno M, Borghi MO, Lonati LM, Ghiadoni L, Gerosa M, Grossi C et al. Patients with antiphospholipid syndrome display endothelial perturbation. *J Autoimmun*. 2010 Mar;34(2):105-10.
38. Sebastiani GD, Iuliano A, Cantarini L, Galeazzi M. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: An update. *Autoimmun Rev*. (2016) 15:433–9.).
39. Rouget JP, Goudemand J, Montreuil G, Cosson A, Jaillard J. Lupus anticoagulant: a familial observation. *Lancet*. (1982) 2:105.
40. Mackie IJ, Colaco CB, Machin SJ. Familial lupus anticoagulants. *Br J Haematol*. (1987) 67:359–63.
41. May KP, West SG, Moulds J, Kotzin BL. Different manifestations of the antiphospholipid antibody syndrome in a family with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. (1993) 36:528–33.
42. Al Attia HM, Santosh A, Al Farhan MM. Observations on class II antigens and genetic susceptibility to primary antiphospholipid (Hughes) síndrome in Arab patients. *Clin Exp Rheumatol*. (2008) 26:506.,
43. Vargas-Alarcon G, Granados J, Bekker C, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. Association of HLA-DR5 (possibly DRB1*1201) with the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients. *Arthritis Rheum*. (1995) 38:1340–1.,
44. Sanchez ML, Katsumata K, Atsumi T, Romero FI, Bertolaccini ML, Funke A, et al. Association of HLA-DM polymorphism with the production of antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis*. (2004) 63:1645–8.
45. Islam MA, Khandker SS, Alam F, Kamal MA, Gan SH. Genetic risk factors in thrombotic primary antiphospholipid syndrome: a

- systematic review with bioinformatic analyses. *Autoimmun Rev.* (2018) 17:226–43.
46. Aisina RB, Mukhametova LI, Ostriakova EV, Seredavkina NV, Patrushev LI, Patrusheva NL, et al. [Polymorphism of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene, plasminogen level and thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome]. *Biomed Khim.* (2014) 60:72–93.
 47. Tassies D, Espinosa G, Munoz-Rodriguez FJ, Freire C, Cervera R, Monteagudo J, et al. The 4G/5G polymorphism of the type 1 plasminogen activator inhibitor gene and thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* (2000) 43:2349–58.
 48. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Rapti E, Mantzios G, Kapsimali V, et al. Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and venous thrombosis. A meta-analysis. *Thromb Haemost.* (2007) 97:907–13.
 49. Plasín-Rodríguez MA, Rodríguez-Pinto I, Patricio P, Monteagudo J, Cervera R, Reverter JC, et al. The H1 haplotype of the endothelial protein C receptor protects against arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* (2018) 169:128–34.
 50. Gonzalez JV, Barboza AG, Vazquez FJ, Gandara E. Prevalence and geographical variation of prothrombin G20210A mutation in patients with cerebral vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0151607.
 51. Torresan M, Machado TF, Siqueira LH, Ozelo MC, Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM. The impact of the search for thrombophilia risk factors among antiphospholipid syndrome patients with thrombosis. *Blood Coagul Fibrinol.* (2000) 11:679–82.
 52. Forastiero R, Martinuzzo M, Adamczuk Y, Varela ML, Pombo G, Carreras LO. The combination of thrombophilic genotypes is associated with definite antiphospholipid syndrome. *Haematologica.* (2001) 86:735–41.
 53. Sallai KK, Nagy E, Bodo I, Mohl A, Gergely P. Thrombosis risk in systemic lupus erythematosus: the role of thrombophilic risk factors. *Scand J Rheumatol.* (2007) 36:198–205.
 54. Adams MJ, Donohoe S, Mackie IJ, Machin SJ. Anti-tissue factor pathway inhibitor activity in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* (2001) 114:375–9.
 55. Lopez-Pedreira C, Barbarroja N, Patiño-Trives AM, Collantes E, Aguirre MA, Perez-Sanchez C. New Biomarkers for

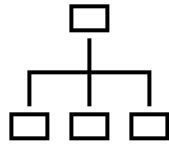
- Atherothrombosis in Antiphospholipid Syndrome: Genomics and Epigenetics Approaches. *Front Immunol.* 2019 Apr 16;10:764.
56. Lincz LF, Adams MJ, Scorgie FE, Thom J, Baker RI, Seldon M. Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor gene are associated with venous thromboembolism in the antiphospholipid syndrome and carriers of factor V Leiden. *Blood Coagul Fibrinol.* (2007) 18:559–64.
 57. Bertolaccini ML, Atsumi T, Lanchbury JS, Caliz AR, Katsumata K, Vaughan RW, et al. Plasma tumor necrosis factor alpha levels and the-238*A promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* (2001) 85:198–203.
 58. Jimenez S, Tassies D, Espinosa G, Garcia-Criado A, Plaza J, Monteagudo J, et al. Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* (2008) 67:835–40.
 59. Yonal I, Hindilerden F, Hancer VS, Artim-Esen B, Daglar A, Akadam B, et al. The impact of platelet membrane glycoprotein Ib alpha and Ia/IIa polymorphisms on the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* (2012) 129:486–91.
 60. Devreese K, Peerlinck K, Hoylaerts MF. Thrombotic risk assessment in the antiphospholipid syndrome requires more than the quantification of lupus anticoagulants. *Blood.* (2010) 115:870–8.
 61. Alpay N, Hancer VS, Erer B, Inanc M, Diz-Kucukkaya R. The Relationship between P- selectin polymorphisms and thrombosis in antiphospholipid syndrome: a pilot case-control study. *Turk J Haematol.* (2014) 31:357–62.
 62. Diz-Kucukkaya R, Inanc M, Afshar-Kharghan V, Zhang QE, Lopez JA, Pekcelen Y. P-selectin glycoprotein ligand-1 VNTR polymorphisms and risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* (2007) 66:1378–80.
 63. Pardos-Gea J, Castro-Marrero J, Cortes-Hernandez J, Balada E, Pedrosa A, Vilardell- Tarres M, et al. Beta2-glycoprotein I gene polymorphisms Val247Leu and Trp316Ser in Spanish patients with primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int.* (2012) 32:927–32.
 64. Chamorro AJ, Marcos M, Miron-Canelo JA, Cervera R, Espinosa G. Val247Leu beta2- glycoprotein-I allelic variant is associated with antiphospholipid syndrome: systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* (2012) 11:705–12.

65. Patsouras MD, Sikara MP, Grika EP, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, Vlachoyiannopoulos PG. Elevated expression of platelet-derived chemokines in patients with antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* (2015) 65:30–7.
66. Hamid C, Norgate K, D’Cruz DP, Khamashta MA, Arno M, Pearson JD, et al. Anti- beta2GPI-antibody-induced endothelial cell gene expression profiling reveals induction of novel pro-inflammatory genes potentially involved in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* (2007) 66:1000–7.
67. Ripoll VM, Pregnolato F, Mazza S, Bodio C, Grossi C, McDonnell T, et al. Gene expression profiling identifies distinct molecular signatures in thrombotic and obstetric antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* (2018) 93:114–23.
68. Pérez-Sánchez C, Barbarroja N, Messineo S, Ruiz-Limón P, Rodríguez-Ariza A, Jiménez- Gómez Y, et al. Gene profiling reveals specific molecular pathways in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular disease in antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome with lupus. *Ann Rheum Dis.* (2015) 74:1441–9.
69. Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* (2010) 6:391–8.
70. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expresión and cell differentiation. *Blood.* (2006) 108:3646–53.
71. O’Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol.* (2018) 9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402, Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15:509–24.
72. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chem Rev.* (2013) 113:6207–33.
73. Teruel R, Pérez-Sánchez C, Corral J, Herranz MT, Perez-Andreu V, Saiz E, et al. Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* (2011) 9:1985–92.
74. Pérez-Sánchez C, Aguirre MA, Ruiz-Limón P, Barbarroja N, Jiménez-Gómez Y, de la Rosa IA, et al. Atherothrombosis-associated microRNAs in Antiphospholipid syndrome and Systemic Lupus Erythematosus patients. *Sci Rep.* (2016) 6:31375.
75. Van den Hoogen LL, Rossato M, Lopes AP, Pandit A, Bekker CPJ, Fritsch-Stork RDE, et al. microRNA downregulation in plasmacytoid dendritic cells in interferon-positive systemic lupus erythematosus

- and antiphospholipid syndrome. *Rheumatology*. (2018) 57:1669–74.
76. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol*. (2018) 15:541–63.
 77. Perez-Sanchez C, Arias-de la Rosa I, Aguirre MA, Luque-Tevar M, Ruiz-Limon P, Barbarroja N, et al. Circulating microRNAs as biomarkers of disease and typification of the atherothrombotic status in antiphospholipid syndrome. *Haematologica*. (2018) 103:908–18.
 78. Wu M, Barnard J, Kundu S, McCrae KR. A novel pathway of cellular activation mediated by antiphospholipid antibody-induced extracellular vesicles. *J Thromb Haemost*. (2015) 13:1928–40.
 79. Gysler SM, Mulla MJ, Guerra M, Brosens JJ, Salmon JE, Chamley LW, et al. Antiphospholipid antibody-induced miR-146a-3p drives trophoblast interleukin-8 secretion through activation of Toll-like receptor 8. *Mol Hum Reprod*. (2016) 22:465–74.
 80. Sciascia S, Bertolaccini ML. Thrombotic risk assessment in APS: the Global APS Score (GAPSS). *Lupus* 2014;23:1286-1287.
 81. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current protocols in bioinformatics* 2019;68:e86.
 82. Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, Calabro E, Croce CM, Pastorino U, Sozzi G. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3713-3718.
 83. Sharova E, Grassi A, Marcer A, Ruggero K, Pinto F, Bassi P, Zanovello P, Zattoni F, D'Agostino DM, Iafrate M, Ciminale V. A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate cancer screening. *British journal of cancer* 2016;114:1362-1366.
 84. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol* 2009;219:449-458.
 85. Bartoli M, Gu X, Tsai NT, Venema RC, Brooks SE, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:33189-33192.
 86. Charakida M, Besler C, Batuca JR, Sangle S, Marques S, Sousa M, Wang G, Tousoulis D, Delgado Alves J, Loukogeorgakis SP, Mackworth-Young C, D'Cruz D, Luscher T, Landmesser U, Deanfield

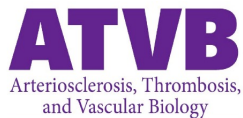
- JE. Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome. *JAMA* 2009;302:1210-1217.
87. Ames PR, Matsuura E, Batuca JR, Ciampa A, Lopez LL, Ferrara F, Iannaccone L, Alves JD. High-density lipoprotein inversely relates to its specific autoantibody favoring oxidation in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010;19:711-716.
 88. Dutzmann J, Daniel JM, Bauersachs J, Hilfiker-Kleiner D, Sedding DG. Emerging translational approaches to target STAT3 signalling and its impact on vascular disease. *Cardiovasc Res* 2015;106:365-374.
 89. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res* 2015;116:531-549
 90. Navickas R, Gal D, Laucevicius A, Taparauskaite A, Zdanyte M, Holvoet P. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res* 2016;111:322-337.
 91. Wei C, Li L, Gupta S. NF- κ B-mediated miR-30b regulation in cardiomyocytes cell death by targeting Bcl-2. *Mol Cell Biochem* 2014;387:135-141.
 92. Shen Y, Shen Z, Miao L, Xin X, Lin S, Zhu Y, Guo W, Zhu YZ. miRNA-30 family inhibition protects against cardiac ischemic injury by regulating cystathionine- γ -lyase expression. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Jan 20;22(3):224-40.
 93. Desjarlais M, Dussault S, Rivard F, Harel S, Sanchez V, Hussain SN, Rivard A. Forced expression of microRNA-146b reduces TRAF6-dependent inflammation and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic conditions. *Atherosclerosis* 2019;289:73-84.
 94. Mononen N, Lyytikäinen L-P, Seppälä I, Mishra PP, Juonala M, Waldenberger M, Klopp N, Illig T, Leiviskä J, Loo B-M. Whole blood microRNA levels associate with glycemic status and correlate with target mRNAs in pathways important to type 2 diabetes. *Scientific reports* 2019;9:1-14.
 95. Liao Y, Li H, Cao H, Dong Y, Gao L, Liu Z, Ge J, Zhu H. Therapeutic silencing miR-146b-5p improves cardiac remodeling in a porcine model of myocardial infarction by modulating the wound reparative phenotype. *Protein & Cell* 2020:1-19.
 96. Mei Z, Huang B, Zhang Y, Qian X, Mo Y, Deng N. Histone deacetylase 6 negatively regulated microRNA-199a-5p induces the

- occurrence of preeclampsia by targeting VEGFA in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019;114:108805.
97. Starikova I, Jamaly S, Sorrentino A, Blondal T, Latysheva N, Sovershaev M, Hansen JB. Differential expression of plasma miRNAs in patients with unprovoked venous thromboembolism and healthy control individuals. *Thromb Res* 2015;136:566-572.
 98. Ames PR, Margarita A, Delgado Alves J, Tommasino C, Iannaccone L, Brancaccio V. Anticardiolipin antibody titre and plasma homocysteine level independently predict intima media thickness of carotid arteries in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2002;11:208-214.
 99. Yamakuchi M. MicroRNAs in Vascular Biology. *International journal of vascular medicine* 2012;2012:794898.
 100. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.
 101. Zuily S, Clerc-Urmès I, Bauman C, Andrade D, Sciascia S, Pengo V, Tektonidou MG, Ugarte A, Gerosa M, Michael Belmont H. Cluster analysis for the identification of clinical phenotypes among antiphospholipid antibody-positive patients from the APS ACTION Registry. *Lupus* 2020;29:1353-1363.
 102. Van den Hoogen LL, van Roon JA, Radstake TR, Fritsch-Stork RD, Derksen RH. Delineating the deranged immune system in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity reviews* 2016;15:50-60



ANEXOS

I. Informe del factor de impacto y cuartil del Journal citation Reports (SCI y/ SSCI) de las bases de datos de referencia del área en el que se encuentra la publicación presentada.



Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology
Volume 41, Issue 2, February 2021; Pages 865-877
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315346>



TRANSLATIONAL SCIENCES

Characterization of Antiphospholipid Syndrome Atherothrombotic Risk by Unsupervised Integrated Transcriptomic Analyses


Laura Pérez-Sánchez^{*}, Alejandra M. Patiño-Trives^{*}, M. Ángeles Aguirre-Zamorano^{ID^{*}}, María Luque-Tévar, M. Carmen Ábalos-Aguilera, Iván Arias-de la Rosa, Pedro Seguí, Francisco Velasco-Gimena, Nuria Barbarroja^{ID}, Alejandro Escudero-Contreras, Eduardo Collantes-Estévez^{ID[†]}, Carlos Pérez-Sánchez[†], and Chary López-Pedra^{ID[†]}

CATEGORY

PERIPHERAL VASCULAR DISEASE

5/67

JCR YEAR	JIF RANK	JIF QUARTILE	JIF PERCENTILE
2021	5/67	Q1	93.28



2021 JOURNAL IMPACT FACTOR

10.514

II. Producción científica

1. Patiño-Trives AM, Pérez-Sánchez C, **Pérez-Sánchez L**, Luque-Tévar M, Ábalos-Aguilera MC, Alcaide-Ruggiero L, Arias-de la Rosa I, Román-Rodríguez C, Seguí P, Espinosa M, Font P, Barbarroja N, Escudero-Contreras A, Antonio González-Reyes J, Manuel Villalba J, Collantes-Estévez E, Aguirre-Zamorano MÁ, López-Pedrerera C Anti-dsDNA Antibodies Increase the Cardiovascular Risk in Systemic Lupus Erythematosus Promoting a Distinctive Immune and Vascular Activation.. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021 Sep;41(9):2417-2430. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.315928. Epub 2021 Jul 29. PMID: 34320837. D1. IF10.51.
2. **Laura Pérez-Sánchez**, Alejandra Patiño-Trives, M^a Angeles Aguirre-Zamorano, Maria Luque-Tevar, Maria Carmen Abalos-Aguilera, Iván Arias de la Rosa, Pedro Seguí, Francisco Velasco, Nuria Barbarroja, Eduardo Collantes-Estevez, Carlos Perez-Sanchez, Chary Lopez-Pedrerera. Characterization of Antiphospholipid Syndrome Atherothrombotic Risk by Unsupervised Integrated Transcriptomic Analyses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021 Feb;41(2):865-877. D1. IF10.51
3. Irene Cecchi, Carlos Perez-Sanchez, Savino Sciascia, Massimo Radin, Ivan Arias de la Rosa, Nuria Barbarroja Puerto, Luca Scudeler, **Laura Pérez-Sánchez**, Alejandra Maria Patiño Trives, Maria Angeles Aguirre Zamorano, Elisa Menegatti, Dario Roccatello, Chary Lopez-Pedrerera. Circulating MicroRNAs as potential biomarkers for monitoring the response to in vivo treatment with rituximab in systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmun Rev*, 2020 Apr. IF 7.71. D1.
4. Carlos Pérez Sánchez, Irene Cecchi, Nuria Barbarroja, Alejandra M Patiño, María Luque- Tévar, **Laura Pérez Sánchez**, Alejandro Ibañez Costa, Ivan Arias de la Rosa, Rafaela Ortega, Alejandro Escudero, M Carmen Castro, Massimo Radin, Dario Rocattelo, Savino Sciascia, the BIOSAR study group, M Ángeles Aguirre, Eduardo Collantes and Chary Lopez Pedrerera. Early restoration of immune and vascular phenotypes in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis patients after B-cell depletion. *J cell Mol Med.* 2019 Sep. IF 4.59. Q1.

5. Patricia Ruiz-Limon, Rafaela Ortega-Castro, Nuria Barbarroja, Carlos Perez-Sanchez, Christophe Jamin, Alejandra Maria Patiño-Trives, Maria Luque-Tevar, Alejandro Ibáñez-Costa, **Laura Pérez-Sánchez**, Iván Arias de la Rosa, M^a Carmen Abalos-Aguilera, Yolanda Jimenez-Gomez, Jerusalem Calvo-Gutierrez, Pilar Font, Alejandro Escudero, Marta Alarcon-Riquelme, Eduardo Collantes-Estevez and Chary Lopez-Pedrer. Molecular characterization of monocyte subsets reveals new mechanisms associated with cardiovascular disease in Rheumatoid Arthritis. Front Immunol. 2019 May. IF 4.71. Q1.
6. Irene Cecchi, **Laura Pérez Sánchez**, Savino Sciascia, Dario Roccatello. Multifocal avascular osteonecrosis despite appropriate anticoagulation therapy in a patient with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid síndrome. BMJ case report. 2018 nov.

III. Premios

Descripción: Premio Profesor D. Carlos Pera al residente excelente

Fecha: Mayo de 2020

Universidad o Entidad: Comisión de Docencia del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.



Descripción: Premio nacional SER 2021 al mejor trabajo publicado en el área de “otras enfermedades autoinmunes sistémicas”

Fecha: Octubre 2021

Universidad o Entidad: Sociedad Española de Reumatología

