

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Anticuerpos anti-fosfatidilserina/protrombina en fracaso
reproductivo recurrente**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Enrique Pleguezuelo Garrote

Directores

Antonio Serrano Hernández
Jesús Hernández Gallego

Madrid

© Daniel Enrique Pleguezuelo Garrote, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

ANTICUERPOS ANTI-FOSFATIDILSERINA/PROTROMBINA EN FRACASO
REPRODUCTIVO RECURRENTE

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

DANIEL ENRIQUE PLEGUEZUELO GARROTE

DIRECTORES

ANTONIO SERRANO HERNANDEZ
JESÚS HERNÁNDEZ GALLEGO

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis doctoral no sólo es fruto del trabajo del autor sino que de forma explícita e implícita, han participado en ella muchas otras personas a las que quisiera escribir estas líneas de agradecimiento.

A mis padres Lourdes Carmen y José Antonio, por haberme inculcado desde la infancia el valor del trabajo, la dedicación y motivarme para llegar hasta el final de los estudios como una vía no para el desarrollo propio sino para la construcción de nuestra Sociedad.

A mi hermana Paula, por su ayuda y preocupación incluso hasta cuando nuestros caminos formativos y profesionales comenzaron a distanciarse.

A mi esposa Adriana y a mis hijos, Lucía y Alejandro, por su soporte, esfuerzo y comprensión para permitirme el tiempo y el apoyo necesario para elaborar esta tesis doctoral.

A mi tutor y director Antonio, por guiarme en la senda de la investigación científica desde mis primeros pasos y enseñarme a advertir los errores y buscar la excelencia, desde la metódica y la rigurosidad.

A mi jefe de Servicio Estela, por su confianza en mí desde el primer día para tomar las riendas de una parte del laboratorio que representa y la apertura de la actividad clínica.

A mis compañeros del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre, por sus consejos, sus recomendaciones, enseñanzas y la ayuda prestada para la elaboración de esta tesis.

A mis compañeras del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario 12 de Octubre, por su implicación, generosidad y apoyo para la elaboración de esta tesis.

A mis pacientes, de quienes conservo el honor de ser depositario de su confianza para el tratamiento de sus dolencias, de los que aprendo cada día y son fuente de motivación para seguir explorando nuevos caminos para el avance de la Medicina.

DEDICATORIA:

A mis hijos, por el tiempo que no pasé con ellos para elaborar esta tesis doctoral

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	Página 1
1.1.	Descripción y generalidades del síndrome anti-fosfolipídico (SAF)	Página 1
1.2.	Criterios clasificatorios del SAF	Página 8
1.3.	Prevalencia del síndrome	Página 11
1.4.	SAF seronegativo	Página 13
1.5.	Los anticuerpos anti-fosfatidilserina/protrombina	Página 15
1.6.	Manifestaciones obstétricas: abortos recurrentes.	Página 18
1.6.1.	Definición y prevalencia.	Página 18
1.6.2.	Manifestaciones obstétricas en SAF: abortos recurrentes. Estudio de factores inmunológicos	Página 21
1.6.3.	Manifestaciones obstétricas en SAF: abortos recurrentes. Limitaciones de los criterios de clasificación de SAF vigentes	Página 22
1.6.4.	Manifestaciones obstétricas en SAF: abortos recurrentes. La utilización empírica de tratamientos utilizados en el síndrome anti-fosfolipídico	Página 24
1.6.5.	Manifestaciones obstétricas en SAF: abortos recurrentes. Fisiopatología de los anticuerpos anti-fosfolipídicos	Página 25
1.7.	Manifestaciones obstétricas en SAF: fracaso de implantación recurrente	Página 27
1.7.1.	Definición, causas y prevalencia:	Página 27
1.7.2.	Prevalencia de los anticuerpos anti-fosfolipídicos en esta entidad	Página 28
1.7.3.	Mecanismos de acción propuestos de los anticuerpos anti-fosfolipídicos en fracaso de implantación recurrente	Página 29
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	Página 33
2.1.	Razonamiento y bases que propician el estudio	Página 33
2.2.	Hipótesis	Página 33
2.3.	Objetivos	Página 34
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	Página 39
3.1.	Controles sanos:	Página 39
3.2.	Pacientes	Página 40
3.2.1.	Derivación para estudio	Página 40
3.2.2.	Duración del seguimiento y puntos de estudio analítico	Página 41
3.2.3.	Abortos de repetición:	Página 41
3.2.4.	Fracaso de implantación recurrente:	Página 42
3.3.	Estudio de anticuerpos anti-fosfolipídicos incluidos en los criterios de clasificación	Página 42
3.3.1.	Anti-Cardiolipina igg e igm y anti-Beta-2-Glicoproteína-I igg, igm e iga	Página 42
3.3.2.	Anticoagulante lúpico	Página 43
3.4.	Estudio de anticuerpos anti-fosfatidilserina/protrombina	Página 43
3.5.	Estudio de otros autoanticuerpos no órgano-específicos	Página 44
3.6.	Estudio de otros autoanticuerpos órgano-específicos	Página 44

4.	RESULTADOS	Página 45
4.1.1.	Análisis 1A. Definición de un punto de corte para dar como positivos valores de aPS/PT IgG e IgM en las pacientes y los controles de este estudio.	Página 45
4.1.2.	Análisis 1B. Comparación del rendimiento del punto de corte encontrado con otros posibles, como los sugeridos por el fabricante del test diagnóstico o los calculados a partir de las muestras de las embarazadas que formaban la cohorte de controles sanos.	Página 48
4.1.3.	Análisis 2A. Descripción demográfica del grupo control.	Página 51
4.1.4.	Análisis 2B. Descripción demográfica del grupo de pacientes con abortos recurrentes ocurridos antes de la semana 10 de gestación.	Página 54
4.1.5.	Análisis 2C. Descripción demográfica del grupo de pacientes con abortos desde la semana 10 de gestación en adelante.	Página 58
4.1.6.	Análisis 2D. Descripción demográfica del grupo de pacientes con fracaso de implantación recurrente.	Página 61
4.1.7.	Análisis 2E. Estudio de los niveles de aPS/PT en controles sanos y pacientes en la primera determinación.	Página 66
4.1.8.	Análisis 2F. Estudio de la prevalencia de aPS/PT en controles sanos y los grupos de pacientes.	Página 70
4.1.9.	Análisis 2G. Estudio de la prevalencia de aFL incluidos en los criterios de Sídney en los grupos de pacientes y en controles sanos. Análisis del solapamiento con respecto a aPS/PT.	Página 78
4.1.10.	Análisis 2H. Estudio de la evolución de los niveles de aPS/PT en los diferentes grupos de pacientes.	Página 83
4.1.11.	Análisis 4A. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para fracaso de implantación recurrente.	Página 94
4.1.12.	Análisis 3A. Análisis univariante de los aPS/PT en fracaso de implantación recurrente.	Página 95
4.1.13.	Análisis 4B. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en fracaso de implantación recurrente.	Página 96
4.1.14.	Análisis 4C. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para pacientes con tres o más abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación.	Página 98
4.1.15.	Análisis 3B. Análisis univariante de los aPS/PT en mujeres con tres o más abortos consecutivos antes de la semana 10 de gestación.	Página 99
4.1.16.	Análisis 4D. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en el grupo de pacientes con tres o más abortos consecutivos ocurridos antes de la semana 10 de gestación.	Página 99
4.1.17.	Análisis 4E. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para pérdidas fetales, con uno o más abortos ocurridos en la semana 10 de gestación o en adelante.	Página 101
4.1.18.	Análisis 3C. Análisis univariante de los aPS/PT para pérdidas fetales, con uno o más abortos ocurridos en la semana 10 de gestación o en adelante.	Página 101
4.1.19.	Análisis 4F. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en pérdidas fetales, con uno o más abortos desde la semana 10 de gestación en adelante.	Página 102

4.1.20.	Análisis 4G. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.	Página 103
4.1.21.	Análisis 3D. Análisis univariante de los aPS/PT para dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.	Página 104
4.1.22.	Análisis 4H. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.	Página 104
4.1.23.	Análisis 4I. Prevalencia y análisis univariante de las alteraciones tiroideas y multivariante en conjunto con los aFL estudiados.	Página 105
4.1.24.	Análisis 5A. Resultado de las intervenciones terapéuticas realizadas en virtud de los resultados analíticos obtenidos.	Página 112
5.	DISCUSIÓN	Página 121
6.	CONCLUSIONES	Página 139
7.	BIBLIOGRAFÍA	Página 141
8.	ANEXOS	Página 151
8.1.	Artículo original publicado en <i>Journal of Clinical Medicine</i>	Página 151
8.2.	Artículo original publicado en <i>RMD Open</i>	Página 165
9.	RESUMEN	Página 173
9.1.	Resumen en castellano	Página 173
9.2.	<i>Abstract in English</i>	Página 174

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN Y GENERALIDADES DEL SÍNDROME ANTI-FOSFOLÍPIDICO

El síndrome antifosfolípido (SAF) caracteriza a una enfermedad de base autoinmune descrita en 1983 por Hughes y Harris(1). Este Síndrome se define por la detección en sangre de autoanticuerpos con capacidad de unión a fosfolípidos cargados negativamente o a proteínas plasmáticas(2) asociadas a ellos sobre los endotelios vasculares y la observación clínica de trombosis venosa, arterial o morbilidad obstétrica(3) principalmente. Aunque el término que da nombre a este Síndrome hace mención a los fosfolípidos endoteliales como diana principal de los autoanticuerpos encontrados en estos pacientes, el antígeno que se ha considerado tradicionalmente más relevante(4) pertenece al segundo grupo de los enumerados, la Beta-2-Glicoproteína-I (B2GPI) o apolipoproteína H (apoH), una proteína de unión a lípidos(5) que suele encontrarse en sangre con una concentración de 100–200µg/mL(6). No obstante, a día de hoy, además de la B2GPI, se considera que la protrombina también formaría parte de los antígenos a los que los anticuerpos que ocasionan el SAF se dirigirían mayoritariamente(4). Además de la clínica de trombosis venosa o arterial y la mencionada morbilidad obstétrica, desde la descripción del Síndrome se han notificado un conjunto de manifestaciones clínicas que suelen presentarse acompañando a la sintomatología clásica y son: trombocitopenia, microangiopatía renal, valvulopatía cardíaca, *livedo reticularis*, migrañas, corea, convulsiones y mielitis longitudinal(7).

En enfermedades con presentación clínica heterogénea y en cierta medida aún desconocidas en cuanto a los mecanismos que las originan, las reuniones científicas de profesionales dedicados a la asistencia de pacientes afectos y de investigadores básicos y clínicos, suelen promover la definición de unos criterios de consenso para que las cohortes de pacientes de los diferentes estudios sean lo más homogéneas posibles y así conseguir avanzar en su conocimiento. En SAF, el consenso vigente fue acordado en una reunión celebrada en Sídney(3) en 2004.

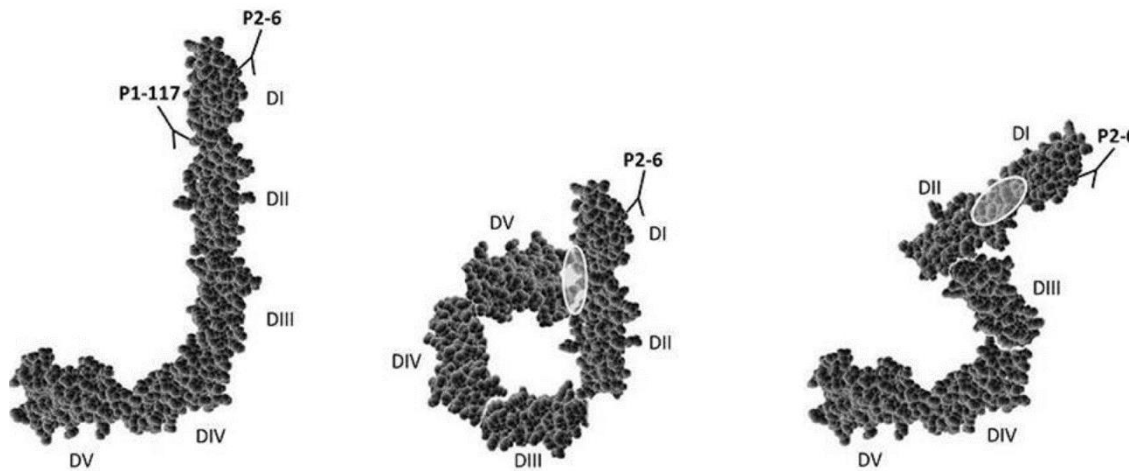
Cuando Hughes y Harris describieron este Síndrome, lo hicieron en pacientes afectos de otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico. No obstante, con posterioridad se demostró la existencia de SAF en pacientes no afectos de otras patologías autoinmunes. En estos casos, a pesar de la recomendación adversa del consenso de Sídney, suele añadirse a la denominación SAF el adjetivo de primario(8). Con este complemento se intenta enfatizar que su origen no parece radicado en un trastorno mayor de la regulación de las respuestas inmunes, sino que pudiera deberse a una disrupción puntual de la tolerancia frente proteínas propias. Por el contrario, cuando la enfermedad se manifiesta junto a características clínicas y hallazgos complementarios sugerentes de otra enfermedad autoinmune, el SAF suele denominarse como secundario, aunque también se reserva este término en investigación básica para enfatizar los hallazgos en modelos animales. Entre las enfermedades autoinmunes encontradas en la población a las que puede asociarse el SAF, una de todas emerge por su mayor prevalencia sobre las demás. Es el caso del lupus eritematoso sistémico, una enfermedad en la que

sucede una desregulación profunda y persistente en el tiempo de la respuesta inmune, con rotura continuada de la tolerancia frente a antígenos propios, y que conlleva la activación y supervivencia de un repertorio de células autorreactivas, entre los que se encuentran linfocitos B y células plasmáticas, siendo éstas las fuentes de producción mayoritarias de los autoanticuerpos(9). Dichos autoanticuerpos pueden encontrarse en títulos detectables en estos pacientes y, dependiendo de su capacidad de fijación al epítipo que reconocen y sus características fisicoquímicas, pueden participar de forma relevante en el proceso patogénico de la enfermedad.

Ya sea en la denominada forma primaria o asociada a otras enfermedades autoinmunes, por definición, en el SAF se produce una activación de la cascada de la coagulación, siendo la trombosis, venosa profunda o arterial, una de sus manifestaciones más frecuentes y reconocidas(10). No obstante, la trombosis en pacientes con SAF sin tratamiento es inconstante. Esta observación ha tenido una especial relevancia para dirigir los estudios que intentan aproximarse a la patogenia de este Síndrome, obligando a buscar rutas y mecanismos más complejos de los esperados en una enfermedad autoinmune en la que antígenos, autoanticuerpos y los factores que intervienen en la coagulación se suponen en contacto permanente(11) en sangre. A pesar de la controversia, en modelos animales se ha demostrado la patogenicidad de los aFL al observarse la generación de trombosis tras la infusión de estos(12). En humanos se ha descrito una forma de la enfermedad denominada SAF catastrófico, en la que ocurre una concatenación de eventos trombóticos en un periodo corto de

tiempo y que cursa con una grave tasa de morbimortalidad(13). Como resultado de estas observaciones dispares, se ha hipotetizado que debieran existir otros factores que resultan esenciales para la activación persistente de la coagulación en los pacientes con SAF catastrófico y que aparecen y desaparecen intermitentemente o se activan y se inhiben en los pacientes con formas de SAF no catastrófico. Este factor o conjunto de factores desconocidos subyacentes y que podrían suponer la aparición de un “brote” de trombosis en pacientes con SAF ha sido recogido en la llamada teoría del segundo golpe o *second hit*(14). En esta teoría, la activación de la inmunidad innata de forma intensa por un proceso inflamatorio o una cirugía, podría servir de desencadenante para la activación de la cascada de la coagulación en personas portadoras de aFL circulantes que habrían comprometido la integridad de los endotelios y generado un ambiente procoagulante (“primer golpe”) que a efectos de la cascada de la coagulación resultaba silente(15). Uno de los mecanismos propuestos para este “segundo golpe” consiste en la exposición y el camuflaje de epítomos en la principal proteína de unión a fosfolípidos asociada con este Síndrome, la B2GPI. Esta proteína está compuesta por 5 dominios con repeticiones consenso conocidos en el campo del SAF como dominios “sushi”, debido a la forma tridimensional que adquieren. Se ha descrito que el microambiente de oxidación y reducción predominante(16) podría inducir cambios en la exposición y ocultación de estos epítomos. Se conoce que la B2GPI se encuentra mayoritariamente en una conformación cerrada, mediada por la interacción entre el dominio I y el dominio V(17). Esta interacción parece estar

controlada por la relación entre los residuos de cisteína en las posiciones 288 y 326 en forma de tioles libres en el dominio V.



□ **Figura 1:** Ilustración de las conformaciones abierta (izquierda, derecha) y cerrada (centro) de la proteína B2GPI. Modificado con autorización del trabajo de L Pelkmans y colaboradores (18)

En un ambiente predominantemente oxidativo, estos residuos forman un enlace disulfuro y la B2GPI torna en una configuración abierta en forma de “J” o “garfio”, exponiendo epítomos habitualmente ocultos(18, 19). Cuando estos epítomos inicialmente crípticos son expuestos a las condiciones previamente reseñadas, pueden inducir la activación de clones de células B con receptores BCR específicos con resultado final de la producción de autoanticuerpos. Estos autoanticuerpos frente a los epítomos ahora expuestos podrían unirse a sus dianas y conseguirían estabilizar la conformación en “J” de la B2GPI. Mediante esta unión, se ha hipotetizado que la B2GPI podría acumularse en sangre en esta conformación abierta, resultando en una mayor activación de la cascada de la coagulación(20). Aunque el principal dominio reconocido por los anti-B2GPI es el dominio I, no todos los anticuerpos anti-B2GPI IgG e IgM presentan

especificidad frente a él, habiéndose identificado diferentes dianas en los dominios de la molécula reconocidas por los anticuerpos de los pacientes estudiados. Además, los patrones de reconocimiento de los anticuerpos de pacientes con SAF primario o asociado a otras enfermedades autoinmunes parecen ser diferentes, por lo que la distinción entre una variante y otra de la enfermedad parece incluso radicarse en procesos mecanicísticos diferentes(21). Otros isotipos de anticuerpos frente a la B2GPI, en concreto el IgA, parecen dirigir los anticuerpos frente a los dominios IV y V, y no frente al dominio I(22). Estas descripciones dan idea de la diversidad de idiotipos y epítomos reconocidos para un anticuerpo con una misma denominación genérica, anti-B2GPI, pudiendo ayudar a explicar la amplia variabilidad clínica observada en pacientes que los portan.

La explicación detallada por la que los anticuerpos aFL motivan la activación de la cascada de la coagulación es aún objeto de investigación(23). Los procesos, rutas y mecanismos que se han postulado son muy cuantiosos y variados pero entre todos ellos, existe cierto consenso en definir que la trombosis mediada por los aFL precisa el concurso de tres procesos principales que se entrelazan en un circuito de consecuencias desfavorables. El primero de ellos consiste en la unión de los aFL a las células endoteliales, acarreado su activación e infringiendo un estado procoagulante. El segundo consiste en la activación plaquetaria. Por último, el tercero, se basa en la activación de la cascada del complemento, que potencia la activación de células endoteliales y plaquetas.

Los aFL pueden unirse a las células endoteliales mediante la fijación de sus idiotipos a la proteína B2GPI. La unión induce la expresión de moléculas de adhesión como selectina-E, ICAM-1 VCAM-1(24), la activación de NF-kB(25), la fosforilación de MAPK p38(26), la expresión de factor tisular(27), la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8(26, 28) y la expresión de moléculas HLA de clase II. El incremento en la expresión de moléculas de adhesión atraerá a monocitos, que serán activados en el microambiente inflamatorio y aumentarán también la expresión en su superficie de factor tisular. La activación de estos dos grupos de células se basa en la estimulación de varias rutas intracelulares como TLR4(28, 29), Anexina II y ApoE2-R.

Sobre las plaquetas, los aFL inducen su activación y agregación, detectándose de forma frecuente en pacientes una reducción en su cuantificación en sangre o trombocitopenia. La activación plaquetaria ocurre en un contexto de preestimulación con la presencia de trombina o colágeno. Este estado conduce al desplazamiento de la molécula Anexina V y la consecuente expresión de fosfatidilserina en la membrana externa plaquetaria, de la glicoproteína IIb-IIIa(17), la secreción de factor plaquetario 4(19) y del incremento en sangre de tromboxano A2(18) de origen plaquetario, con propiedades favorecedoras de la agregación plaquetaria y la vasoconstricción.

Otros mecanismos descritos para la activación de la coagulación por parte de los aFL consisten en la inhibición de la proteína C activada, la generación de trampas neutrofílicas extracelulares (NETs)(29), la activación de, de la ruta de

señalización NF-kB(30), el consumo de complemento, en especial de C3(31), la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS)(32) y la activación de NADPH oxidasa 2(33).

De forma independiente a los mecanismos de trombosis, los aFL se han relacionado con una alteración de los endotelios vasculares consistente en la afectación del estrato íntimo. Se ha detectado en pacientes con nefropatía y presencia de aFL y se ha visto mediada por la activación de la ruta de señalización de mTORC(34).

1.2. CRITERIOS CLASIFICATORIOS DEL SAF

En el momento actual no existen criterios diagnósticos consensuados para el SAF sino criterios clasificatorios diseñados para homogeneizar y comparar los estudios de investigación clínica. Estos criterios fueron elaborados por primera vez en 1998 en Sapporo(35) y recibieron su última actualización en el congreso mundial de Sídney en 2004, siendo publicados en 2006(3). Aunque este consenso fue diseñado para investigación, la práctica clínica suele apoyarse en él para diagnóstico y justificación de las medidas de tratamiento. Dicho consenso establece la necesidad de haber padecido un episodio clínico de los contemplados, como una trombosis venosa, una trombosis arterial, de pequeños vasos o en cualquier órgano en el que pueda ser demostrada. Además de los cuadros trombóticos, desde el consenso de Sapporo de 1998(35), en los

criterios de clasificación se incluyeron manifestaciones obstétricas que pueden afectar a cualquiera de los trimestres de gestación:

1. Concatenación de abortos continuados (tres o más) sin otra causa anatómica, hormonal o alteraciones cromosómicas de los progenitores que lo justifiquen antes de la semana 10 de gestación.
2. Pérdida fetal de un bebé sin detección de cromosomopatías después de la semana 10 de gestación.
3. Prematuridad antes de la semana 34 debida a preeclampsia, eclampsia o insuficiencia placentaria.

La revisión de los criterios de clasificación no supuso la introducción de nuevos criterios clínicos, pero algunas manifestaciones como la *livedo reticularis*, la enfermedad valvular cardíaca, trombocitopenia, algunas nefropatías y el deterioro cognitivo fueron reconocidas como entidades asociadas o atribuibles al SAF(3, 36, 37).

Además del criterio clínico, para que un paciente sea clasificado como afecto de SAF, debe presentar uno de los criterios de laboratorio. En el consenso de Sapporo se estableció la necesidad de encontrar positivos de forma persistente anticuerpos anti-Cardiolipina (aCL) de isotipo IgG o IgM y anticoagulante lúpico. La revisión de Sídney(3) añadió la positividad de los autoanticuerpos anti-B2GPI IgG e IgM a los ya reconocidos previamente. Los aFL deben ser positivos en un título alto o superior al calculado para el percentil 99 de la población general en la que el paciente se testa, pudiendo presentar uno o más aFL. La persistencia de los autoanticuerpos detectados en al menos dos determinaciones

distanciadas temporalmente por 12 semanas, estos es, 6 semanas más que en el consenso de Sapporo, fue instaurada en tales términos debido a la necesidad de descartar elevaciones transitorias de los aFL debidas a infecciones o a correactividad de las primeras técnicas de detección con anticuerpos despertados por infecciones. Se entendía, ahora y entonces, que si los autoanticuerpos persistían en ausencia de una clínica infecciosa pasados tres meses, que la producción de los anticuerpos detectados era estable y suficiente como para relacionarse con la clínica trombótica u obstétrica observada. Aunque las técnicas de detección modernas tienen excelentes niveles de sensibilidad y especificidad y no presentan apenas correactividad con otras situaciones clínicas, la necesidad de asegurar la persistencia de los autoanticuerpos ha conseguido llegar hasta nuestros días y mantenerse en la última revisión de los criterios de clasificación dado que se ha observado que un 25% de los pacientes presentan oscilaciones relevantes en el título de anticuerpos(3). Por otro lado, el consenso de Sídney recomienda que entre el evento clínico que suscita el estudio y las indagaciones de laboratorio no exista una distancia mayor a 12 semanas, aunque permite la clasificación de pacientes con una diferencia entre el evento clínico y la positividad de laboratorio hasta de cinco años(3).

1.3. PREVALENCIA DEL SÍNDROME

La prevalencia e incidencia de SAF real es difícil de estimar debido a que las manifestaciones clínicas que llevarían a interrogar la presencia de aFL no son exclusivas de este Síndrome y comparten diagnóstico diferencial con otras entidades(38). Entre las alteraciones que podrían justificar un evento trombotico adicional o no a la presencia de aFL se reconoce la importancia los siguientes factores: edad mayor a 55 años para hombres y 65 para mujeres, hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, hábito tabáquico, índice de masa corporal mayor a 30kg/m², microalbuminuria, estado portador de trombofilia hereditaria, utilización de anticonceptivos orales, síndrome nefrótico, malignidad, inmovilización o cirugía previa(3). Además, la diferente metodología de detección con sensibilidad y especificidades distintas podría impactar aún más en el reconocimiento de pacientes afectados de esta enfermedad. Aun considerando condiciones óptimas para la indicación de los estudios y el empleo de una metodología consistente, las características poblacionales con distribución étnica, sexo y edad, pueden hacer variar aún más la epidemiología del SAF. La prevalencia estimada por algunos autores es de 40-50 por cada 100000 habitantes y una incidencia anual de 5 por cada 100000 habitantes(36, 39). Se ha comunicado la presencia de aFL en el 13% de los pacientes con ictus en cualquier edad, en uno de cada tres en menores de 50 años(40), el 11% de los que han sufrido un infarto de miocardio, en el 9,5%-20%(40, 41) de las trombosis venosas profundas y en el 6% de las mujeres con morbilidad obstétrica(41). Respecto a este último grupo de patologías, cabe mencionar que la prevalencia indicada incluye estudios que informan acerca de

mujeres con abortos, retraso de crecimiento intrauterino, preeclampsia, eclampsia y Síndrome HELLP. Al profundizar aún más en este campo, se reconoce que aproximadamente un 9% de mujeres con abortos recurrentes presenta aFL positivos. Este estudio extrapola la prevalencia encontrada de aFL en las diferentes patologías a la prevalencia general de éstas, realizando un cálculo aproximado que podría ayudar a entender la magnitud de morbilidad que supone el SAF en la población a la que hace referencia, en este caso, estadounidense. Los autores concluyen que cada año sólo en EEUU sería esperable encontrar 50000 casos de abortos relacionados con aFL, 110000 ictus, 100000 infartos de miocardio y 30000 trombosis venosas profundas(41).

La prevalencia de las complicaciones mencionadas anteriormente en pacientes diagnosticados de SAF se ha comunicado en un artículo reciente fruto del esfuerzo colaborativo internacional y que ha reclutado 804 pacientes con aFL positivos persistentes. En ellos la prevalencia de trombosis arterial o venosa fue del 71%, siendo las venosas más frecuentes (43%) que las arteriales (37%), y con un 11% de pacientes presentando ambas(42).

El mayor conocimiento y concienciación sobre el SAF en la comunidad médica ha llevado a una reducción en la demora diagnóstica desde que un paciente sufre la primera manifestación clínica compatible. Recientemente se ha publicado un artículo que estudia este aspecto, con un tiempo medio de retraso de 1990 a 2000 de 4,7 años y una demora actual desde 2015 de 0,8 años(43).

En este estudio resultó llamativo que en pacientes con una demora diagnóstica,

presentaron antes del evento trombótico otra manifestación clínica diferente pero asociable a otras enfermedades autoinmunes como artralgias, lesiones cutáneas, trombocitopenia y en menor frecuencia, necrosis ósea de cadera, migrañas y *livedo reticularis*(43). Por el contrario, los pacientes sin demora diagnóstica no reconocieron otra sintomatología previa al evento trombótico(43).

1.4. SAF SERONEGATIVO

Desde la descripción del Síndrome se han reconocido y publicado numerosos casos de pacientes que habiendo padecido las situaciones clínicas contempladas en los criterios clasificatorios y careciendo otra causa que las justifique, presentan negatividad para los cinco aFL incluidos en el último consenso de Sídney(44, 45). Esta situación se ha denominado “SAF seronegativo” y en ella se han tomado dos aproximaciones diferentes y a la vez complementarias:

- Una de ellas consiste en el examen de los aFL incluidos en el criterio de clasificación de laboratorio mediante técnicas de detección diferentes(46), al conocerse que la correlación entre diferentes métodos es adecuada no es perfecta(47, 48), pudiendo incurrirse en falsos negativos para un número limitado de pacientes. En un taller de calidad realizado en nuestro laboratorio con participación de otros centros de diagnóstico a nivel nacional con la colaboración de GECLID-SEI, demostramos que esta correlación es baja, con un 63% de muestras identificadas correctamente entre 40 laboratorios(49).

- La segunda consiste en demostrar la presencia de aFL extracriterio o extraconsenso. Éstos conforman un grupo cuantioso de autoanticuerpos entre los que destacan los anti-beta-2-glicoproteína-I de isotipo IgA(50), los inmunocomplejos circulantes de anticuerpos anti-beta-2-glicoproteína-I(51), los anti-anexina V(52), los anti-anexina II(53), anti-proteína C(54), los anti-proteína S(55), los anti-protrombina(56), los anti-fosfatidilserina(57), los anti-fosfatidil-etanolamina(58), los anti-fosfatidil-inositol(59), los anti-ácido lisobisfosfatídico(60), los anti-complejo vimentina-cardiolipina(61) y los anti-complejo fosfatidilserina/protrombina (aPS/PT)(62).

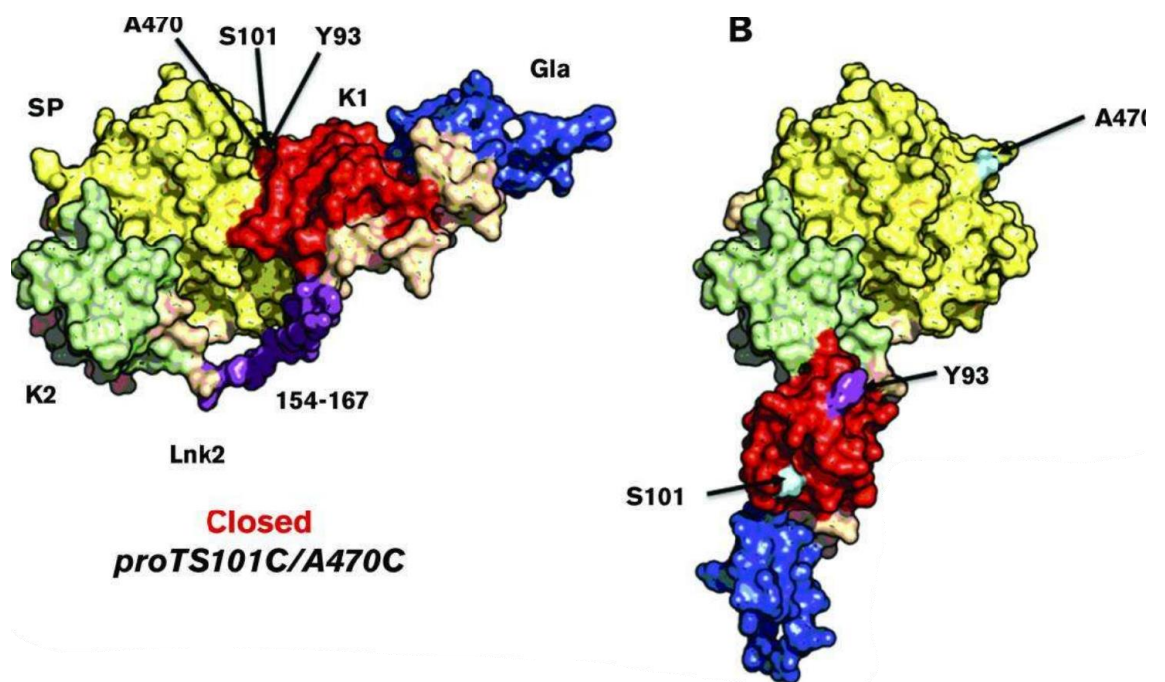
Desde el congreso mundial de SAF de 2010 celebrado en Galveston, Texas, se recomienda la determinación de los aFL de isotipo IgA en pacientes negativos para los aFL incluidos en los criterios de clasificación(63). La medida de estos anticuerpos ha sido objeto de debate dado que no se ha observado el valor añadido de su determinación en el numeroso grupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico(64). No obstante, los aFL de este isotipo, especialmente los que reconocen la B2GPI, se han descrito en relación con todas las formas clínicas conocidas de SAF primario, como trombosis arterial, venosa, ictus y morbilidad obstétrica(50).

1.5. LOS ANTICUERPOS ANTI-FOSFATIDILSERINA/PROTROMBINA

A finales de la década de 1950 el factor II o protrombina fue objeto de asociación con el factor anticoagulante en pacientes con lupus(65). Desde entonces se han realizado estudios sobre los anticuerpos anti-protrombina en cohortes similares de pacientes pero con una asociación muy débil con las manifestaciones de SAF(66). Los aPS/PT fueron delineados en una comunicación rápida publicada en el año 1991 por Galli y colaboradores(67) en un estudio que demostró que el anticoagulante lúpico no se dirigía únicamente a fosfolípidos sino a un complejo formado por protrombina y lípidos compuesto por un 20% fosfatidilserina y un 80% fosfatidilcolina(67). El anticoagulante lúpico fue así relacionado con anticuerpos que en presencia de calcio, reconocerían un epítipo inicialmente oculto en la protrombina que se expondría tras la unión con este complejo de lípidos(67). La detección de anticuerpos anti-fosfatidilserina/protrombina diferenciada de los anti-protrombina fue publicada por el mismo grupo en 1997(68) y su presencia fue confirmada con las manifestaciones clínicas del SAF por Atsumi, Bertolaccini y Koike en 2000(62).

Los anticuerpos aPS/PT se asocian fuertemente con la clínica de SAF y se encuentran habitualmente en pacientes que han presentado trombosis (69, 70), tanto de forma aislada como en asociación con diferentes perfiles de otros aFL. Se han descrito en pacientes positivos para anticoagulante lúpico(62, 71) únicamente (el 49% de los pacientes positivos para AL testado mediante dRVVT resultó positivo para aPS/PT y sólo un 3% de los AL negativos) y por otro, en pacientes también positivos para anticuerpos anti-B2GPI y anti-Cardiolipina(69,

72), conformando la denominada “triple corona” y suponiendo un alto riesgo protrombótico. De hecho, en la reunión de Sídney donde se establecieron los últimos criterios de clasificación para SAF, los aPS/PT se mencionan de forma destacada como autoanticuerpos asociados a SAF en los que sería necesario realizar un mayor esfuerzo de investigación, considerando prematura su inclusión en el momento de elaboración del consenso en 2004(3). En concreto el consenso de Sídney estimó que la determinación de los aPS/PT sería conveniente para confirmar la presencia de AL.



□ **Figura 2:** Ilustración de las conformaciones abierta (izquierda) y cerrada (derecha) de la protrombina. Modificado del trabajo de M Chinnaraj y colaboradores(73)

En un estudio reciente por el grupo de Vittorio Pengo, se describió cómo a escala molecular los aPS/PT pueden reconocer diferentes configuraciones tridimensionales de la protrombina(73). De forma análoga a lo que ocurre con

la B2GPI, la protrombina puede encontrarse en una forma abierta o cerrada. Es una proteína formada por varios dominios: Gla, en el extremo N-terminal, dos dominios con forma anular o "kringle" y un dominio serin-proteasa. La forma cerrada depende de la interacción entre dos residuos de diferentes dominios, el Y93 perteneciente al Kringle-1 y el W547 del dominio proteasa, siendo la predominante en circulación. Fruto de las mutaciones inducidas para estabilizar las conformaciones abierta y cerrada, pudieron identificar dos grupos de aPS/PT en el suero de 24 pacientes positivos también para anti-Cardiolipina y anti-B2GPI. El primer grupo de anticuerpos reconoce un epítipo situado en una región críptica, sólo expuesto cuando la molécula de protrombina se presenta en configuración abierta. El segundo grupo reconoce un epítipo expuesto tanto en la conformación abierta como en la conformación cerrada localizado en el dominio Gla. Los pacientes estudiados se pudieron dividir entre los que presentaban ambos tipos de anticuerpos (grupo B), y los que presentaban sólo anticuerpos frente a los epítopos expuestos únicamente en la configuración abierta (grupo A). En este estudio, los autores analizaron los niveles séricos de protrombina, encontrando niveles normales y concluyendo que los aPS/PT detectados no presentaban capacidad neutralizante. Como debaten en su artículo, la ausencia de capacidad de neutralización es esperable para los anticuerpos que se fijan a la región críptica, sólo expuesta en conformación abierta, dado que la protrombina suele encontrarse en configuración cerrada habitualmente. De forma adicional, valoran el posible efecto biológico que estos dos tipos de anticuerpos pudieran tener. Por un lado, los anticuerpos dirigidos frente a regiones crípticas podrían inducir la acumulación de protrombina en las

membranas endoteliales y acelerar así la generación de trombina que junto al aumento de la expresión de factor tisular y selectina-E, induciría un fenotipo protrombótico(74, 75). Por otro lado, los anticuerpos dirigidos frente a epítomos naturalmente expuestos reducirían la cantidad de protrombina sobre las membranas endoteliales, limitando la capacidad de conversión de protrombina en trombina. Aunque han estudiado la asociación de los diferentes grupos de anticuerpos con las características clínicas de los 24 pacientes estudiados, detallaron que no han podido encontrar ninguna estadísticamente significativa.

1.6. MANIFESTACIONES OBSTÉTRICAS EN SAF: ABORTOS RECURRENTES.

1.6.1. DEFINICIÓN Y PREVALENCIA.

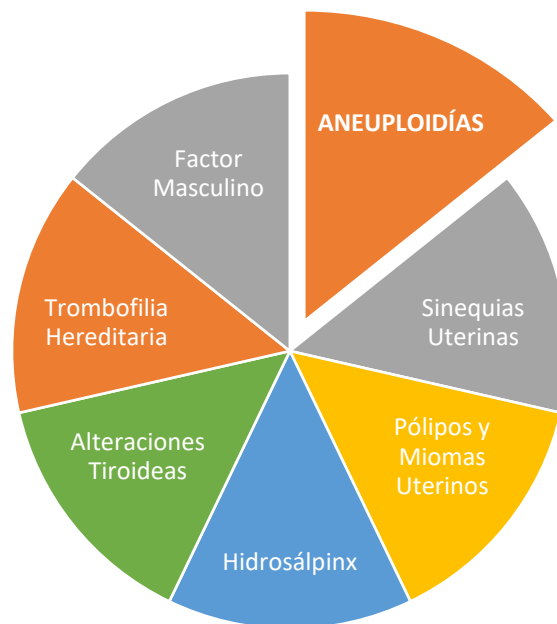
Los aFL son una de las determinaciones recomendadas en el estudio de pacientes con antecedentes obstétricos adversos como en abortos recurrentes o complicaciones como preeclampsia, fallo de crecimiento intrauterino o muerte neonatal sin una causa atribuible. De hecho, como fue reseñado anteriormente, estas manifestaciones están recogidas en los criterios de clasificación del SAF desde su primera formulación en el congreso de Sapporo(35).

La pérdida gestacional se define como la situación en la que el embarazo desaparece antes de que el feto alcance su viabilidad(76). El periodo en el que podrían ocurrir dichas pérdidas abarca desde la concepción hasta la semana 24 de gestación(76). La definición de la recurrencia de los abortos es objeto de debate tanto en el campo de la Obstetricia como en el del SAF

para los casos con pérdidas gestacionales inferiores a la semana 10 de amenorrea. La Organización Mundial de la Salud definió los abortos recurrentes como entidad patológica en 1976 cuando se concatenan tres o más pérdidas gestacionales consecutivas hasta la semana 20 de gestación(77). Más recientemente, la Sociedad Europea de Reproducción Asistida y Embriología (ESHRE) actualizó la definición para incluir dos o más pérdidas sin explicación aparente(76), e incluye tanto abortos ocurridos en gestaciones naturales como fruto de la aplicación de técnicas de reproducción asistida. En el campo del SAF el debate también está abierto y los artículos que estiman la prevalencia de los aFL encontrados en mujeres gestantes y su asociación con manifestaciones obstétricas suelen incluir también a pacientes con dos abortos anteriores a la semana 10(78). Para mayor precisión, el último documento de consenso sobre pérdida gestacional recurrente reserva la definición de aborto recurrente para los casos en los que se ha constatado la existencia de una gestación intrauterina(76), por lo que los embarazos bioquímicos y los ectópicos quedarían excluidos.

Se estima que el 10% de las parejas en edad reproductiva podrían sufrir alguna forma de infertilidad(79) y entre un 1% y un 5% abortos recurrentes(80). El estudio de posibles causas responsables para esta concatenación de pérdidas gestacionales es de interés dado que el riesgo de padecer un nuevo aborto se incrementa con la edad y con una pérdida previa, desde el 25% para mujeres tras dos abortos, hasta el 40% para

mujeres tras tres abortos(81). Esta probabilidad es mayor a la esperada debido al azar, lo que obliga a un estudio de posibles factores que pudieran intervenir en la pérdida gestacional. En alrededor del 50% de los casos se ha llegado a identificar una causa concreta para la recurrencia de los abortos(82). Entre los casos con explicación, un 60% se relaciona con aneuploidías embrionarias(83), que suelen aparecer con más frecuencia en los productos de la concepción de progenitores más añosos(84).



□ **Figura 3:** *Diagrama circular con la descripción de las principales etiologías no-inmunomediadas para los abortos recurrentes.*

No obstante, otras causas pueden tener un papel en la recurrencia de los abortos, como son anomalías anatómicas uterinas como sinequias, pólipos, miomas; de los anejos, como hidrosálpinx, alteraciones tiroideas, trombofilia y factor masculino con alteraciones en el seminograma(85).

1.6.2. MANIFESTACIONES OBSTÉTRICAS EN SAF: ABORTOS RECURRENTE.

ESTUDIO DE FACTORES INMUNOLÓGICOS

Entre los factores inmunitarios, la guía sobre abortos recurrentes de la ESHRE recomienda realizar tipaje HLA de clase II sólo en mujeres escandinavas con infertilidad secundaria tras el nacimiento de un varón(86) y el estudio de anticuerpos anti-nucleares (ANA) para cribado de enfermedades autoinmunes que podrían manifestarse con abortos recurrentes(87). La guía considera que las determinaciones de células NK en sangre o biopsia endometrial no han aportado evidencias suficientes sobre su utilidad en este ámbito(88), así como el estudio de los anticuerpos anti-HLA(89).

La guía de abortos recurrentes de la ESHRE incluye la determinación de aFL dentro del epígrafe de estudios de trombofilia. En cuanto a los estudios de trombofilia hereditaria, no recomienda su cribado universal, sino sólo en mujeres que tengan otros factores de riesgo para trombofilia, o en el marco de proyectos de investigación(90). En cambio, sí recomienda el estudio de aFL incluidos en los criterios de Sídney para mujeres que hayan padecido al menos dos abortos, sin necesidad de que tengan un diagnóstico de una enfermedad autoinmune(91). Por último, la guía hace mención a que la positividad en títulos altos de anticuerpos aFL es el único biomarcador inmunológico contemplable para guiar tratamientos inmunomediados, recomendando en mujeres que cumplen los criterios de Sídney(92) iniciar tratamiento con aspirina de 75 a 100mg al día desde antes de la concepción

y dosis profilácticas de heparina (no fraccionada o de bajo peso molecular) desde el conocimiento del estado de gestación, como opción más beneficiosa que la abstención terapéutica(76). La guía sólo concede la posibilidad de utilización de tratamiento anticoagulante en mujeres con dos abortos, en el marco de estudios de investigación clínica.

Además de la ESHRE, otras sociedades en el campo de la Obstetricia recomiendan el estudio de los aFL en mujeres con recurrencia de abortos, como la American Society of Reproductive Medicine (ASRM), la Royal College of Obstetricians and Gynecologists (RCOG) y la Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. (DGGG). Esta última recomendó en 2018 el estudio adicional de aFL no recogidos en los criterios de clasificación de Sídney en mujeres con abortos recurrentes y otras manifestaciones clínicas(93) como microangiopatía renal, alteraciones neurológicas, manifestaciones cardíacas o úlceras cutáneas.

1.6.3. MANIFESTACIONES OBSTÉTRICAS EN SAF: ABORTOS RECURRENTE.

LIMITACIONES DE LOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE SAF VIGENTES

Dado que muchas mujeres con abortos recurrentes no reúnen los criterios clasificatorios para SAF descritos en Sídney(92), se han comenzado a realizar esfuerzos para clasificar pacientes en una agrupación clínica denominada como Síndrome anti-Fosfolípídico Obstétrico Extra-Criterio. Esta entidad estaría conformada por mujeres que cumplen los criterios de laboratorio del consenso de Sídney(3) pero que no reúnen los requisitos del

criterio clínico como tres abortos consecutivos sin una causa identificada antes de la semana 10 de gestación o preeclampsia tardía(94). También incluye a pacientes con manifestaciones clínicas recogidas en los criterios clínicos marcados en Sídney(92), pero con detección positiva de aFL extracriterio(94). No obstante, existen diferencias clínicas entre mujeres con diagnóstico “canónico” de SAF Obstétrico y estos criterios extendidos recientemente investigados. Gracias al esfuerzo colaborativo internacional plasmado en el registro *EUROAPS*, se ha descrito que mientras las mujeres con pérdida gestacional y diagnóstico de SAF con manifestaciones obstétricas acorde a los criterios de clasificación de Sídney suelen presentar un aborto posterior a la semana 10 de gestación, una muerte fetal o neonatal más frecuentemente, las mujeres con criterios extendidos presentarían más frecuentemente una mayor concatenación de abortos antes de la semana 10 de gestación(95). De forma adicional, las conclusiones del grupo de trabajo *EUROAPS* apuntan a que estas diferencias clínicas existentes entre ambos grupos no se traducen en resultados distintos cuando las mujeres reciben tratamiento.

Un metaanálisis reciente de Van Dijk y colaboradores(96) estudió la prevalencia de causas conocidas para abortos recurrentes en mujeres con dos pérdidas consecutivas por un lado y tres o más por otro. Recoge datos de tres estudios que datan de 2010 a 2013 y muestra cómo la prevalencia de aFL incluidos en los criterios de clasificación de Sídney no muestra

diferencias entre ambos grupos de pacientes, con una horquilla de resultados entre el 13,1%(97) y el 17,4%(98) de las mujeres estudiadas.

1.6.4. MANIFESTACIONES OBSTÉTRICAS EN SAF: ABORTOS RECURRENTES. LA UTILIZACIÓN EMPÍRICA DE TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL SÍNDROME ANTI-FOSFOLIPÍDICO

La utilización de heparina y aspirina para la prevención de abortos recurrentes se comenzó a estudiar para mujeres portadoras de anticuerpos aFL en la década de 1990(99, 100) debido a las trombosis detectadas en los vasos uteroplacentarios y a la observación de infarto en zonas de la placenta(101). Desde entonces ha sido un esquema de tratamiento controvertido debido a las dudas sobre el beneficio de agregar HBPM a un tratamiento basado en aspirina en monoterapia(102). Además, se ha utilizado también de forma empírica en mujeres sin trombofilia detectada. En el momento actual las guías de práctica clínica de las principales sociedades de Obstetricia y Reproducción recomiendan la utilización de HBPM y aspirina desde al menos la prueba positiva de gestación en mujeres con SAF(76, 93), tras observar su seguridad, con un menor riesgo de sangrado que las heparinas no fraccionadas al presentar una menor actividad anti-factor II activado(103) y no cruzar la barrera placentaria(104). Un metaanálisis reciente que engloba resultados de ocho ensayos clínicos con 963 pacientes en las que se utilizó Heparina de Bajo Peso Molecular (HBPM) y 891 en las que no fueron comparadas observándose una reducción significativa del número de abortos y un aumento de nacidos

vivos(105). No obstante, los autores no comentaron en profundidad los posibles mecanismos responsables del tratamiento con HBPM sobre el beneficio clínico observado, delineando que estos fármacos podrían inhibir la circulación de aFL, la activación de rutas inflamatorias y la inhibición de trombosis venosa en SAF, citando a otro estudio de Liu y colaboradores(106).

1.6.5. MANIFESTACIONES OBSTÉTRICAS EN SAF: ABORTOS RECURRENTES.

FISIOPATOLOGÍA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLÍPIDICOS

La relación causal entre aFL y abortos y otras morbilidades obstétricas como el retraso del crecimiento intrauterino se comenzaron a reconocer desde que en 1982 De Wolf y colaboradores observaran la presencia de trombosis en placentas de mujeres que habían tenido abortos(101). Posteriormente se realizaron estudios en animales demostrando la patogenicidad de estos anticuerpos. Entre los efectos que explicarían la formación de trombos en este territorio se encuentra la disrupción que los aFL generan sobre la capa anticoagulante de anexina V sobre las células del trofoblasto y endoteliales(15, 107, 108). El efecto neto de la intervención resultaría en un estado procoagulante(107). No obstante, la constatación de que mujeres portadoras de aFL y a habían estado embarazadas no presentaban rastro alguno de trombosis en el estudio anatomopatológico de las placentas, abrió la posibilidad a pensar en otros mecanismos independientes de trombosis para la morbilidad obstétrica asociada a estos anticuerpos. Además del estado protrombótico que pueden generar, se ha

investigado cómo los aFL podrían causar un daño tisular directo dependiente de las uniones con las moléculas que reconocen. Entre todos los aFL, los aB2GPI de isotipo IgG ha sido el más utilizado para describir los mecanismos por los cuales los aFL podrían causar las alteraciones obstétricas asociadas al SAF. En el año 2000, Di Simone y colaboradores, describieron por primera vez que el trofoblasto expresa epítomos que pueden ser reconocidos directamente por anticuerpos aB2GPI y algunas de las consecuencias negativas de esa interacción(109).

Entre los mecanismos observados, los aFL causarían una disrupción de la capacidad invasiva del trofoblasto sobre tejido materno debido a una expresión y/o actividad reducida de metaloproteasas y de la expresión de integrinas y cadherinas, afectando al proceso de placentación. Además, se ha descrito cómo podrían interferir con la diferenciación del trofoblasto a sincitiotrofoblasto(110), debido a la disminución de la expresión de gonadotropina coriónica(109) y causar una alteración en los mecanismos de angiogénesis.

Otros mecanismos descritos se basan en la interacción con los receptores tipo Toll-4 (TLR-4) de la placenta, induciendo un estado proinflamatorio al activar a monocitos y células endoteliales, lo que supondría una infiltración de neutrófilos y el incremento de la síntesis local de TNF-alfa, IL-1Beta e IL-8. Además, los aFL pueden activar la vía clásica del complemento con depósito de C4d.

1.7. MANIFESTACIONES OBSTÉTRICAS EN SAF: FRACASO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE

1.7.1. DEFINICIÓN, CAUSAS Y PREVALENCIA:

Entre las patologías del espectro de la infertilidad se encuentra una derivada del fracaso de la aplicación de técnicas de reproducción asistida. La definición de fallo de implantación recurrente aún no está consolidada pero se tiende a aceptar el fracaso en la obtención de embarazo clínico a pesar de cuatro o más embriones transferidos en tres o más transferencias embrionarias para mujeres menores a 40 años(111). Esta definición se basa en la probabilidad observada de implantación de los embriones transferidos, siendo de uno de cada tres. Con estos resultados la probabilidad de ausencia de gestación tras una primera transferencia es de entre el 65 y el 70%. Tras la transferencia de dos embriones, la probabilidad de fracaso de implantación disminuye al 49% y tras cuatro embriones al 24%(111).

Las causas para el fallo de implantación recurrente se categorizan en tres grupos, una baja receptividad endometrial, un desarrollo embrionario anormal y un cúmulo de causas multifactoriales. Entre el primer grupo se encuentran anomalías anatómicas uterinas(112), afectación de la cavidad endometrial(113), la presencia de miomas intramurales(114), miomas submucosos, pólipos, septo uterino(115), proliferación de la mucosa endometrial alterada coincidente con la transferencia embrionaria, endometritis, trombofilia hereditaria(116), aFL(117) y otros factores

inmunitarios(117, 118). El segundo grupo de causas se refieren a alteraciones en la formación y calidad embrionarias, que se relacionan directamente con la edad de los progenitores(119) e incluyen aneuploidías de los gametos(120) o cultivo embrionario subóptimo(121). La última categoría de factores incluye endometriosis, hidrosálpinx(122), estimulación folicular subóptima, niveles altos de estradiol(123) y transferencias anormales o complicadas(124).

1.7.2. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPÍDICOS EN ESTA ENTIDAD

Se ha descrito que los aFL podrían influir negativamente en la fertilidad humana, afectando tanto a procesos preconcepcionales como post-concepcionales como el desarrollo ovocitario, a la migración y desarrollo embrionario en situación preimplantacional(125), en la arquitectura y la receptividad endometrial(126) y la decidualización(127). No obstante, la baja prevalencia de los aFL incluidos en los criterios de clasificación de Sídney en pacientes con fallo de implantación recurrente ha llevado a desaconsejar su determinación rutinaria en esta situación clínica(85). La prevalencia descrita de aFL en fallo de implantación recurrente oscila entre el 5% y el 8% pero la mayor parte de los estudios prospectivos no han relacionado la presencia de los anticuerpos con una menor tasa de embarazo clínico o nacido vivo(128). No obstante, las limitaciones de los estudios que analizan esta asociación son importantes: las poblaciones estudiadas resultan heterogéneas, los estudios son retrospectivos, los

puntos de corte no son conformes a los últimos criterios de clasificación o no se confirma la persistencia de los aFL(129). Un estudio reciente identifica sólo los aCL IgG como los aFL que resultan de interés en una cohorte de fracaso de implantación recurrente comparado con una cohorte de mujeres fértiles(130). Este estudio sitúa la prevalencia de los aCL IgG en el 3% de las pacientes(130). Otros grupos han estudiado la presencia de aFL en mujeres infértiles o asociándola al resultado de las transferencias embrionarias, pero no específicamente en pacientes que cumplen la definición de fracaso de implantación recurrente. Otros sí tienen en cuenta la definición pero no comparan este grupo con controles fértiles sino con mujeres con abortos de repetición. En este último caso, la prevalencia de aFL en mujeres con fracaso de implantación recurrente no difirió significativamente con respecto a las mujeres con abortos, presentando una prevalencia de aCL del 4,32%, de aB2GPI del 3,70% y de AL del 0,72%.

1.7.3. MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPÍDICOS EN FRACASO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE

Los mecanismos por los cuales los aFL podrían interferir con la implantación y el desarrollo de una gestación clínicamente evidente apuntan más hacia consecuencias deletéreas de la unión de los aFL a los epítomos que reconocen que a la aparición de trombosis. Una de las formas en las que los aFL pudieran relacionarse con el fallo de implantación es gracias a la alteración en el proceso de angiogénesis que resulta clave en la decidualización de la mucosa endometrial(108) y en la diferenciación del

trofoblasto. En estudios animales se ha observado que la interacción entre los aFL y las células de la decidua llevaría a necrosis, depósito de IgG, de fibrina(131) y de factores del complemento(132). Más recientemente se ha observado cómo anticuerpos anti-B2GPI sintéticos podrían inducir cambios en el perfil de expresión génica hacia un estado más proinflamatorio que en ausencia de aFL(133). Un estudio reciente agrega un nuevo mecanismo por el que los aFL podrían interferir con el resultado de las técnicas de reproducción asistida y consiste en la alteración de la receptividad endometrial y la llamada ventana de implantación(134). La ventana de implantación se refiere a una situación en la que el embrión tiene la oportunidad de adherirse e invadir la mucosa endometrial e inducir una serie de cambios en las células epiteliales y estromales(135). Este grupo ha estudiado la expresión tisular de varios factores relacionados con la receptividad endometrial y ha encontrado un descenso significativo en la expresión de HOXA10 y el factor inhibidor de leucemia (LIF) en las mujeres con fracaso de implantación positivas para aFL con respecto a las que resultaron negativas en la determinación de aFL(134). LIF es una citoquina reguladora del proceso de implantación y desarrollo embrionario que permite la migración e invasión del trofoblasto en la mucosa endometrial(136) y suele determinarse su expresión tisular para calcular la receptividad endometrial(137). HOXA10 es un factor de transcripción de genes HOX que se expresa preferentemente en el tracto urogenital y de forma muy significativa en la ventana de implantación(134). Este estudio postula que los aFL desplazarían la ventana de implantación impidiendo

una correcta interacción entre el endometrio y el embrión, ocasionando el fallo de implantación(134).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. RAZONAMIENTO Y BASES QUE PROPICIAN EL ESTUDIO

La baja prevalencia de aFL incluidos en los criterios de clasificación en mujeres sanas sin antecedentes de enfermedades autoinmunes sistémicas diagnosticadas o episodios de trombosis previas y que han presentado alguna forma de fracaso reproductivo, bien como abortos recurrentes o como fracaso de implantación recurrente nos ha llevado a estudiar la posibilidad de que los aPS/PT sean más prevalentes que los aFL incluidos en los últimos criterios de clasificación del SAF en este grupo de pacientes. Así mismo, hemos estudiado la relación de los aPS/PT con los aFL incluidos en los criterios de clasificación y su asociación con las formas de fracaso reproductivo estudiadas.

Todo ello sirvió de fundamento para plantear los siguientes:

2.2. HIPÓTESIS

1. La presencia de los aPS/PT, bien isotipo IgG o IgM se asocia con la concatenación de abortos consecutivos tanto antes como después de la semana 10 de gestación.
2. La presencia de aPS/PT, bien de isotipo IgG o IgM se asocia con la entidad definida como fracaso de implantación recurrente.

3. Los aPS/PT de isotipo IgG o IgM no se asocian con la presencia de otros aFL en cohortes de mujeres sanas en las que ocurren abortos consecutivos o fracaso de implantación recurrente.
4. Cuando las pacientes identificadas como portadoras de aPS/PT reciben tratamiento dirigido en similar esquema al empleado con otros aFL se observa un beneficio clínico en el número de gestaciones clínicas y recién nacidos vivos.

2.3. OBJETIVOS

1. Definición de un punto de corte para aPS/PT IgG e IgM en la población de mujeres gestantes sanas en nuestro entorno. Incluye los siguientes análisis:
 - A. Definición del punto corte.
 - B. Comparación del rendimiento del punto de corte encontrado con otros posibles, como los sugeridos por el fabricante del test diagnóstico o los calculados a partir de las muestras de las embarazadas que formaban la cohorte de controles sanos.
2. Determinación de la prevalencia de aPS/PT en mujeres gestantes y en pacientes afectas de fracaso reproductivo recurrente en las que se han excluido previamente otras causas. Incluye los siguientes análisis:
 - A. Descripción demográfica del grupo control.

- B. Descripción demográfica del grupo de pacientes con abortos recurrentes ocurridos antes de la semana 10 de gestación.
 - C. Descripción demográfica del grupo de pacientes con abortos desde la semana 10 de gestación en adelante.
 - D. Descripción demográfica del grupo de pacientes con fracaso de implantación recurrente.
 - E. Estudio de los niveles de aPS/PT en controles sanos y pacientes en la primera determinación.
 - F. Estudio de la prevalencia de aPS/PT en controles sanos y los grupos de pacientes.
 - G. Estudio de la prevalencia de aFL incluidos en los criterios de Sídney en los grupos de pacientes y en controles sanos. Análisis del solapamiento con respecto a aPS/PT.
 - H. Estudio de la evolución de los niveles de aPS/PT en los diferentes grupos de pacientes.
3. Evaluar la asociación de los aPS/PT con las categorías de fracaso reproductivo recurrente estudiadas. Incluye los siguientes análisis:
- A. Análisis univariante de los aPS/PT en fracaso de implantación recurrente.
 - B. Análisis univariante de los aPS/PT en mujeres con tres o más abortos consecutivos antes de la semana 10 de gestación.

- C. Análisis univariante de los aPS/PT para pérdidas fetales, con uno o más abortos ocurridos en la semana 10 de gestación o en adelante.
 - D. Análisis univariante de los aPS/PT para dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.
4. Determinar si los aPS/PT se comportan como un factor de riesgo independiente para las categorías de fracaso reproductivo recurrente estudiadas. Incluye los siguientes análisis:
- A. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para fracaso de implantación recurrente.
 - B. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en fracaso de implantación recurrente.
 - C. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para pacientes con tres o más abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación.
 - D. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en el grupo de pacientes con tres o más abortos consecutivos ocurridos antes de la semana 10 de gestación.
 - E. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para pérdidas fetales, con uno o más abortos ocurridos en la semana 10 de gestación o en adelante.

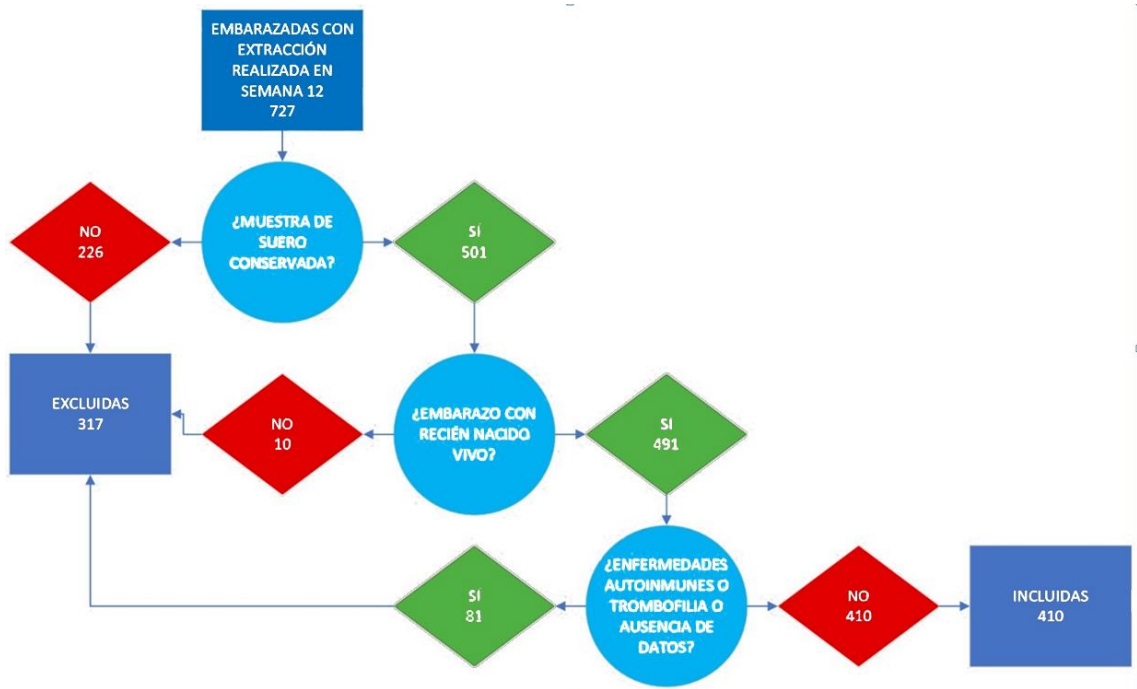
- F. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en pérdidas fetales, con uno o más abortos desde la semana 10 de gestación en adelante.
 - G. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.
 - H. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.
 - I. Prevalencia y análisis univariante de las alteraciones tiroideas y multivariante en conjunto con los aFL estudiados.
5. Observar si las modificaciones realizadas en el tratamiento motivadas por el hallazgo de aPS/PT se traduce en una mejoría clínica. Resultado de las intervenciones terapéuticas realizadas en virtud de los resultados analíticos obtenidos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CONTROLES SANOS:

Los controles sanos fueron mujeres gestantes con muestras de suero extraídas junto al cribado del final del primer trimestre para la determinación de anticuerpos frente a *Toxoplasma*. Las muestras para el estudio se obtuvieron a partir de sueros conservados a -80°C en la seroteca de Microbiología. Entre las muestras disponibles se eligieron 410 correspondientes a mujeres que habían dado a luz en el Hospital a bebés que sobrevivieron al menos durante el primer año de vida. Las historias clínicas de estas mujeres fueron consultadas para recoger la prevalencia de gestaciones, abortos, partos, vivos anteriores y posteriores a la fecha de la muestra de suero conservada, si existían diagnósticos de enfermedades autoinmunes o tratamientos inmunomoduladores, las semanas de gestación en la que ocurrió el parto del embarazo con la muestra estudiada, la forma del parto o la presencia de complicaciones obstétricas asociadas.

El algoritmo de decisiones y el número de controles incluidas y excluidas se ilustra en la Figura 4.



□ **Figura 4:** Algoritmo de decisiones para la inclusión y exclusión de controles sanos para este estudio.

3.2. PACIENTES:

3.2.1. DERIVACIÓN PARA ESTUDIO

Se realizó un protocolo específico para estudio de factores inmunitarios en mujeres con abortos recurrentes y fracaso de implantación recurrente en seguimiento en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario 12 de Octubre y que incluía aquellas pacientes con dos o más abortos consecutivos en primer trimestre y para el grupo de fracaso de implantación, aquellas mujeres que no hubieran quedado embarazadas tras dos o más transferencias de embriones grado 1 o 2. A las pacientes que cumplían estos criterios de inclusión se las derivaba para estudios avanzados consistentes en histerosalpingografía, estudios genéticos

(cariotipo) de la paciente y la pareja, estudio de trombofilias hereditarias en Hematología y estudio de factores inmunitarios en Inmunología.

3.2.2. DURACIÓN DEL SEGUIMIENTO Y PUNTOS DE ESTUDIO ANALÍTICO

Los controles tuvieron un seguimiento clínico ciego con una extensión igual al tiempo en el que se estuvieron incluyendo y estudiando pacientes. Este seguimiento resultó finalmente ser de tres años. Se anotó la presencia de nuevos eventos obstétricos tales como embarazos, abortos, preeclampsia, prematuridad y muertes perinatales. Sólo se estudió, salvo en casos concretos tras solicitud fundamentada por alguno de los especialistas que les asistieron durante este periodo, una única muestra de suero, que fue extraída junto con el cribado serológico realizado para la consulta de revisión alrededor de la semana 10-12 de gestación.

Las pacientes tuvieron un seguimiento clínico durante todo el tiempo en el que fueron asistidas en la Unidad de Reproducción o en Inmunología Clínica, que osciló entre 5 meses y 4 años.

3.2.3. ABORTOS DE REPETICIÓN:

Se definió como criterio de inclusión a dos grupos de pacientes con abortos. Por un lado, a mujeres con dos o más abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de amenorrea y por otro a mujeres con una o más pérdidas fetales ocurridas desde la semana 10 en adelante en ausencia de alteraciones morfológicas o cromosomopatías.

3.2.4. FRACASO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE:

Se incluyeron pacientes con ausencia de gestación clínica evidenciada mediante ausencia de saco gestacional en ecografía o ausencia elevación de betaHCG en sangre tras tres transferencias embrionarias de al menos cuatro embriones de adecuada calidad.

Las pacientes afectas de fracaso de implantación se subdividieron para la descripción demográfica del grupo y para algunos resultados en:

1. Fracaso de implantación primario, cuando nunca habían quedado embarazadas.
2. Fracaso de implantación secundario, cuando la situación de fracaso de implantación es posterior a al menos una gestación con el desenlace que fuere.
3. Fracaso reproductivo mixto, cuando las pacientes cumplieron criterios de fracaso de implantación pero que fueron derivadas para estudio tras un aborto.

3.3. ESTUDIO DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLÍPIDICOS INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

3.3.1. Anti-Cardiolipina IgG e IgM y anti-Beta-2-Glicoproteína-I IgG, IgM e IgA

Los anticuerpos aCL y aB2GPI de isotipos IgG, IgM e IgA fueron estudiados en suero de la analítica extraída tras la primera valoración en consulta mediante los aparatos Bio-Plex 2200 (Bio-Rad, Hercules, California, EEUU). Los puntos de corte se establecieron según cálculo realizado con una

cohorte de donantes de sangre de nuestra población de referencia y se fijaron en 18UI/mL.

3.3.2. El anticoagulante lúpico se determinó en sangre mediante dos técnicas en paralelo, HemosIL dRVVT, con punto de corte en ratio 1,20 y HemosIL Silica Clotting Time, con punto de corte en ratio 1,30 (Instrumentation Laboratory SpA, Milán, Italia) en momentos en los que las pacientes no estaban recibiendo tratamiento anticoagulante ni antiagregante.

3.4. ESTUDIO DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFATIDILSERINA/PROTROMBINA

Los aPS/PT IgG e IgM fueron estudiados en suero mediante la prueba comercial QUANTA Lite ELISA (INOVA DIAGNOSTICS, San Diego, California, EEUU) con aplicación de los puntos de corte calculados previamente en una cohorte de 219 donantes de sangre sin patologías conocidas, resultando en 30UI/mL para el isotipo IgG y 40UI/mL para el isotipo IgM(6). Estos puntos de corte fueron obtenidos tras la exclusión de valores extremos (*“outliers”*) tras la aplicación del método de bloqueo y el cálculo del percentil 99. De forma adicional, estos puntos de corte, de aplicación general para aPS/PT IgG e IgM en nuestro laboratorio, fueron comparados utilizando los datos de controles y pacientes en este estudio con los recomendados por el fabricante y por los personalizados, calculados siguiendo el mismo procedimiento que el empleado para definir el punto de corte para los donantes de sangre (exclusión de valores extremos (*“outliers”*) y cálculo de percentil 99) pero sobre los resultados obtenidos en las controles sanas embarazadas.

3.5. ESTUDIO DE OTROS AUTOANTICUERPOS NO ÓRGANO-ESPECÍFICOS

Se estudió en todas las pacientes al menos en una ocasión la presencia en suero de los siguientes anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo (ENAs): anti-Ro, anti-La, anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Jo1, anti-Cromatina, anti-Scl70, anti-Ribosomal y anti-centrómero-B mediante la plataforma Bio-Plex 2200 (Bio-Rad, Hercules, California, EEUU).

3.6. ESTUDIO DE OTROS AUTOANTICUERPOS ÓRGANO-ESPECÍFICOS

Se recogieron datos sobre la presencia de anticuerpos anti-tiroideos anti-tiroglobulina y anti-microsomales (TPO) en suero a partir del software de Historia Clínica Electrónica del Hospital.

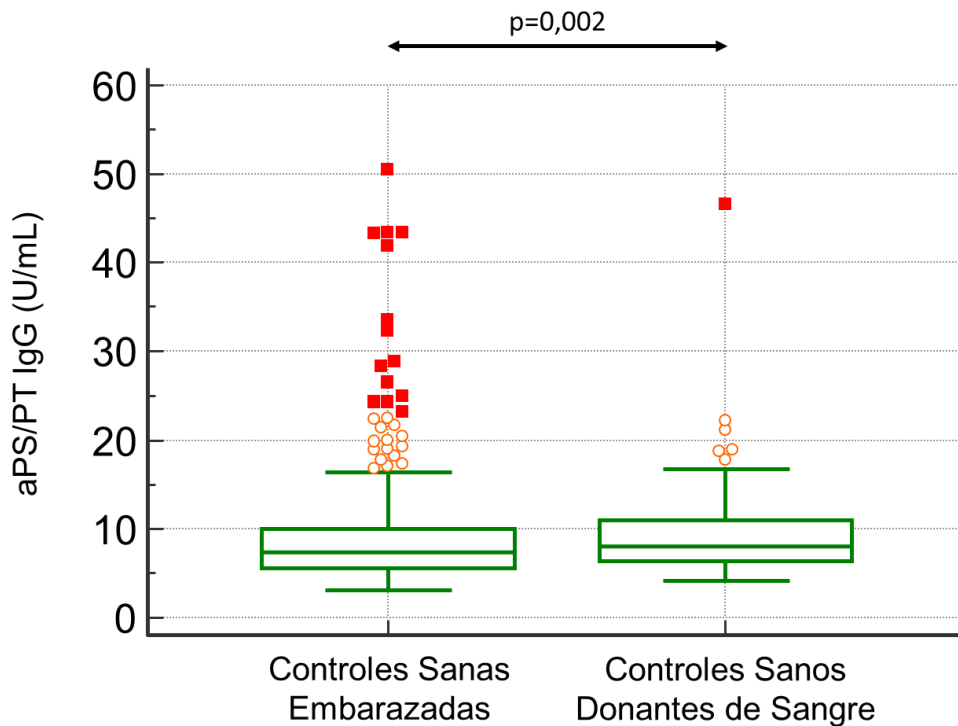
4. RESULTADOS

4.1.1. Análisis 1A. Definición de un punto de corte para dar como positivos valores de aPS/PT IgG e IgM en las pacientes y las controles de este estudio. Los puntos de corte utilizados para la determinación de aPS/PT IgG (30UI/mL) e IgM (40UI/mL) fueron los calculados en un estudio interno en el que se incluyeron 219 donantes de sangre con muestras extraídas en 2017 y compuesto por hombres y mujeres mayores de edad, sin patologías protrombóticas previas conocidas. Los resultados de dicho estudio fueron ampliados posteriormente siguiendo la misma metodología para el cálculo de los puntos de corte en un estudio con una cohorte mayor de controles (n=718) con similares resultados(6). Estos puntos de corte fueron validados comparando la mediana de los títulos de los donantes de sangre del estudio previo con los resultados obtenidos en los controles sanos del estudio actual.

Para conocer si las poblaciones de donantes de sangre con las que se calcularon los puntos de corte para aPS/PT IgG e IgM son comparables para la determinación de estos autoanticuerpos con nuestra población de controles sanas constituida por mujeres embarazadas, se utilizó el test de la U de Mann-Whitney.

	Controles Sanas Embarazadas	Controles Sanos Donantes de Sangre	Controles Sanas Embarazadas	Controles Sanos Donantes de Sangre
	aPS/PT IgG		aPS/PT IgM	
Muestra	410	219	410	219
Valor Mínimo	3	4,18	4,64	0
Valor Máximo	50,5	46,6	47,7	60
Mediana	7,4	8,03	11,95	13,8
IC 95% para la mediana	7,22-7,68	7,70-8,37	11,50-12,70	12,70-15,19
Rango intercuartílico	5,60-9,92	6,39-10,90	9,28-17	9,88-20,82
Valor P	0,002		0,001	

□ **Tabla 1:** diferencias para valores de aPS/PT IgG e IgM entre controles sanas embarazadas y controles sanos donantes de sangre.

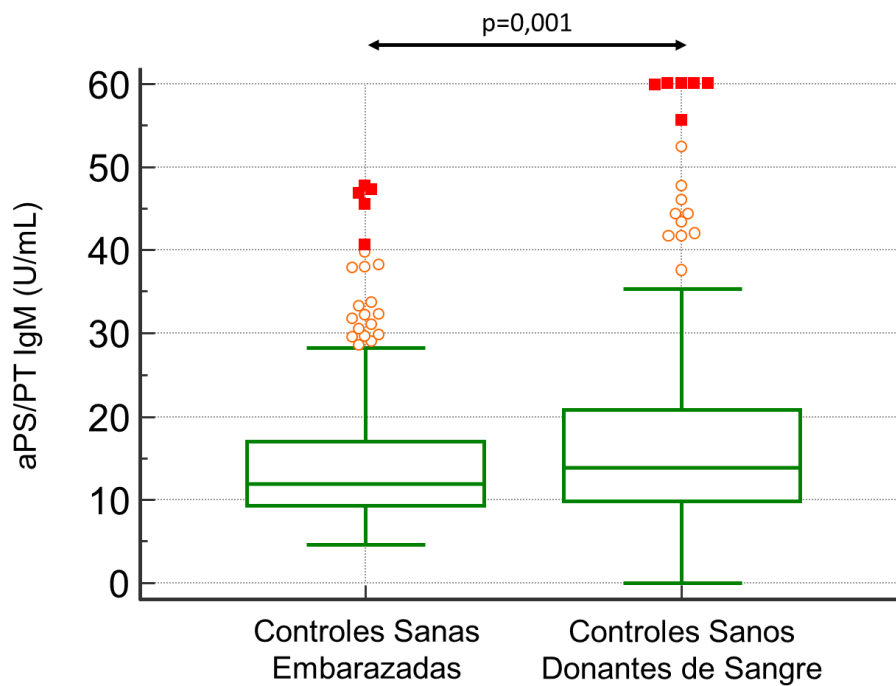


□ **Figura 5:** Gráfico de cajas y bigotes para valores de aPS/PT IgG entre controles sanas embarazadas y controles sanos donantes de sangre.

Como puede apreciarse en las figuras 5 y 6, la mediana de los títulos de aPS/PT IgG para las controles sanas fue de 7,40 (IC 95%: 7,22-7,68UI/mL) y para IgM de 11,95 (IC 95%: 11,50-12,70UI/mL), resultando en diferencias

estadísticamente significativas entre embarazadas sanas y donantes de sangre pero clínicamente poco relevantes.

Tras aplicación del test estadístico de *Kolmogorov-Smirnov* se observó que tanto los títulos de aPS/PT IgG como los de aPS/PT IgM de las controles sanas embarazadas no presentaban una distribución acorde con la normalidad, con una $D=0,192$ para IgG y una $D=142$ para IgM.



□ **Figura 6:** Gráfico de cajas y bigotes para valores de aPS/PT IgM entre controles sanas embarazadas y controles sanos donantes de sangre

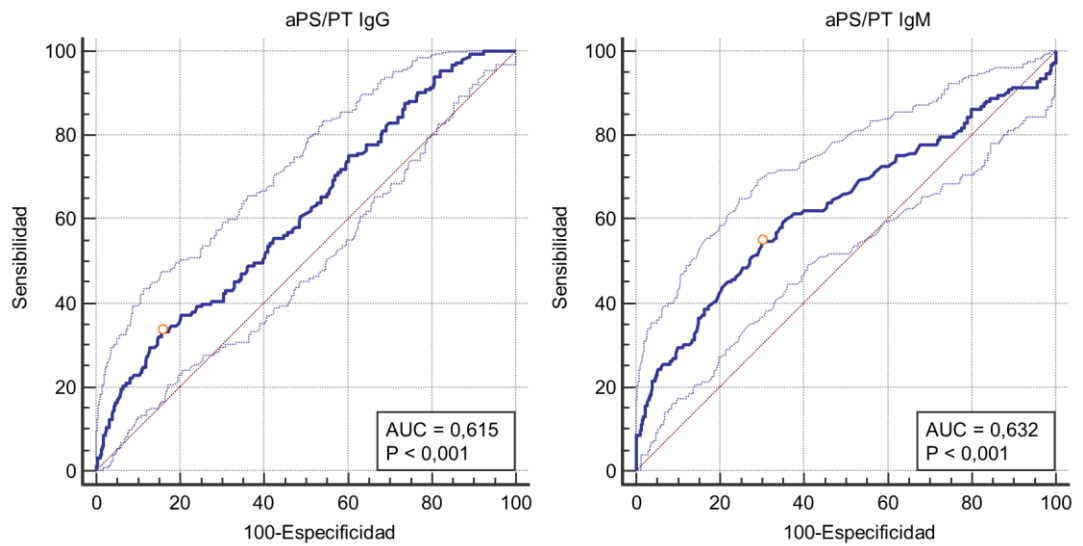
Tomando en consideración los resultados de aPS/PT IgG de nuestras 410 controles sanas, se calculó el percentil 99 bruto de los resultados de esta población, hallando un valor de 42,4UI/mL (IC 95%: 28,3-49UI/mL). Para IgM el percentil 99 bruto fue de 42,5UI/mL (IC 95%: 37,8-47,5UI/mL).

De forma similar al cálculo utilizado para el establecimiento de los puntos de corte para aPS/PT IgG e IgM en el estudio previo con 219 donantes de sangre, los percentiles 99 brutos fueron recalculados tras la aplicación del método de bloqueo(138, 139), que toma en consideración las diferentes agrupaciones de resultados extremos para refinar el cálculo del punto de corte. Como resultado de este procedimiento, el grupo de resultados superior o igual a 41,9UI/mL para aPS/PT IgG fue excluido del análisis para el cálculo del punto de corte. Una vez aplicada esta exclusión, los cinco mayores registros fueron omitidos y el percentil 99 personalizado fue recalculado en 27,25UI/mL (IC 95%: 23,23-33,27UI/mL). Dado que el resultado fue próximo al definido de 30UI/mL para aPS/PT IgG elegido en nuestro laboratorio para donantes de sangre, decidimos proseguir con este último para este estudio.

En cuanto al isotipo IgM, se siguió el mismo procedimiento y se excluyeron los 4 registros iguales o superiores a 45,4UI/mL, con un percentil 99 personalizado recalculado en 37,8UI/mL (IC 95%: 32,2-40,4UI/mL). Dado que el resultado fue próximo al definido de 40UI/mL para aPS/PT IgM elegido en nuestro laboratorio para donantes de sangre, decidimos proseguir con este último para este estudio.

4.1.2. Análisis 1B. Comparación del rendimiento del punto de corte encontrado con otros posibles, como los sugeridos por el fabricante del test diagnóstico

o los calculados a partir de las muestras de las embarazadas que formaban la cohorte de controles sanos.



□ **Figura 7:** Curva ROC para aPS/PT IgG (izquierda) y aPS/PT IgM (derecha) para definir punto de corte

Utilizando los datos obtenidos con las determinaciones de aPS/PT IgG y aPS/PT IgM para pacientes y controles sanas embarazadas, se construyeron diversas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic* o *Característica Operativa del Receptor*) para aPS/PT IgG e IgM y se comparó el rendimiento en cuanto sensibilidad, especificidad e índice de verosimilitud para los puntos de corte estudiados para cada isotipo: el personalizado, fruto del cálculo del percentil 99 tras la aplicación del método de bloqueo para la exclusión de valores extremos (“outliers”), el elegido en nuestro laboratorio a partir de donantes de sangre y el definido por el fabricante.

Para aPS/PT IgG el resultado del cálculo del área bajo la curva (*Area under the curve*, AUC) fue de 0,61, con una sensibilidad para el percentil 99 personalizado de 8,50% (IC 95%: 4,16-14,1), una especificidad de 97,8% (IC 95%: 95,9-99) y un índice de verosimilitud de 3,87 (IC 95%: 1,7-8,9), En cambio, el punto de corte de 30UI/mL elegido en el estudio con los donantes de sangre obtuvo una sensibilidad del 6,54% (IC 95%: 3,2-11,7), una especificidad del 98,3% (IC 95%: 96,5-99,3) y un índice de verosimilitud de 3,83 (IC 95%: 1,5-9,9).

	Punto de Corte	Personalizado	Coincidente con Donantes de Sangre	Fabricante	p99 sin exclusión de outliers
	Criterio	≥27,25	≥30	≥30	≥42,4
aPS/PT IgG	Sensibilidad (IC 95%)	8,5 (4,6 - 14,1)	6,54 (3,2 - 11,7)	6,54 (3,2 - 11,7)	3,27 (1,1 - 7,5)
	Especificidad (IC 95%)	97,8 (95,9 - 99,0)	98,29 (96,5 - 99,3)	98,29 (96,5 - 99,3)	99,02 (97,5 - 99,7)
	IVP (IC 95%)	3,87 (1,7 - 8,9)	3,83 (1,5 - 9,9)	3,83 (1,5 - 9,9)	3,35 (0,9 - 12,3)
	IVN (IC 95%)	0,94 (0,9 - 1,0)	0,95 (0,9 - 1,0)	0,95 (0,9 - 1,0)	0,98 (0,9 - 1,0)
	Criterio	≥37,8	≥40	≥30	≥42,5
aPS/PT IgM	Sensibilidad (IC 95%)	13,07 (8,2 - 19,5)	9,8 (5,6 - 15,7)	20,26	9,15 (5,1 - 14,9)
	Especificidad (IC 95%)	98,05 (96,2 - 99,2)	98,78 (97,2 - 99,6)	96,1 (93,7 - 97,8)	99,02 (97,5 - 99,7)
	IVP (IC 95%)	6,7 (3,0 - 14,9)	8,04 (3,0 - 21,7)	5,19 (2,9 - 9,2)	9,38 (3,1 - 28,1)
	IVN (IC 95%)	0,89 (0,8 - 0,9)	0,91 (0,9 - 1,0)	0,83 (0,8 - 0,9)	0,92 (0,9 - 1,0)

□ **Tabla 2:** Rendimiento de los diferentes puntos de corte estudiados. IVP significa índice de verosimilitud positiva e IVN índice de verosimilitud negativa. Los valores correspondientes al punto de corte elegido para este estudio se muestran en negrita.

De forma análoga se realizó el mismo procedimiento para aPS/PT IgM, con resultado de AUC de 0,624 y una sensibilidad para el percentil 99 personalizado de 13,1% (IC 95%: 8,2-19,5%), una especificidad de 98,1% (IC 95%: 96,2-99,2%) y un índice de verosimilitud de 6,7 (IC 95%: 3-14,9). El punto de corte de 40UI/mL elegido en el estudio realizado con los donantes

de sangre obtuvo una sensibilidad del 9,8% (IC 95%: 5,6-15,7), una especificidad del 98,78% (IC 95%: 97,2-99,6) y un índice de verosimilitud de 8,94 (IC 95%: 3-21,7), por lo que se estableció el punto de corte en nuestro estudio para aPS/PT IgM en 40UI/mL.

4.1.3. Análisis 2A. Descripción demográfica del grupo control.

Como puede observarse en la Tabla 3, el grupo de controles de este estudio constituido por 410 embarazadas sanas, presentó una mediana de edad de 31 años (IC 95%: 30-32), con un resultado para el test de Kolmogorov-Smirnov de $D=0,685$, resultante en una distribución que no siguió la normalidad.

La población se constituyó con un 48,4% de embarazadas de raza caucásica, un 27,7% hispanoamericana, un 8,7% china Han, un 7,1% árabe/bereber, un 3,9% romaní, un 2,3% guineana y un 1,5% india.

La mediana para el índice de masa corporal (IMC) calculada en la población control fue de 27,1 (IC 95%: 24,6-31,5) con un peso normal en el 39,7% del grupo, sobrepeso en otro 39,7% y obesidad en el 20,6% de las participantes. La prevalencia de alcoholismo fue del 10,3% y de hábito tabáquico del 3,1%.

	ESTUDIADO EN	MEDIANA	IC 95%	FACTOR PRESENTE EN	OBSERVACIONES
	EDAD	410	31	30,0-32,0	-
DEMOGRÁFICOS	ETNIA/PROCEDENCIA	126			CAUCÁSICA: 61 (48,4%), HISPANOAMERICANA: 35 (27,7%), ÁRABE/BEREBER: 9 (7,1%), CHINA: 11 (8,7%), ROMANÍ: 5 (3,9%), INDIA: 2 (1,5%), GUINEANA: 3 (2,3%)
	GESTACIONES	410	2	2,0-2,0	410 (100%)
	ABORTOS (AB) PREVIOS O POSTERIORES	410	0	0,0-0,0	127 (30,9%)
	VIVOS TOTALES	410	2	2,0-2,0	410 (100%)
	IVE	410	0	0,0-0,0	79 (19,2%)
	ALTURA	126	161	160,0-163,0	
	PESO	126	71,5	68,5-75,0	
	IMC	126	27,066	26,3-28,1	
	OBESIDAD	126	0	0,0-0,0	40 (31,7%)
	SOBREPESO	126	1	1,0-1,0	90 (71,4%)
FACTORES DE RIESGO	TABAQUISMO	126	0	0,0-0,0	13 (11,5%)
	ALCOHOLISMO	126	0	0,0-0,0	4 (3,2%)
	AUTOINMUNIDAD TIROIDEA	196	0	0,0-0,0	36 (18,5%)
	HIPOTIROIDISMO	194	1	0,0-1,0	108 (55,6%)
	HIPOTIROIDISMO AUTOINMUNE	34			19 (55,8%)
DATOS GESTACIÓN ESTUDIADA	OBTENCIÓN GESTACIÓN NATURAL				
	OBTENCIÓN GESTACIÓN FIV	408	0	0,0-0,0	14 (3,4%)
	PARTO ESPONTÁNEO	410			322 (78,5%)
	PARTO INDUCIDO	410			32 (7,8%)
	PARTO POR CESÁREA	410			56 (13,6%)

□ **Tabla 3:** descripción demográfica del grupo de controles sanos

La mediana de semanas de gestación en la que ocurrió el parto o alumbramiento durante el embarazo en el que fue extraída la sangre objeto

de estudio fue de 39 semanas (IC 95%: 39-39), con 322 partos espontáneos (78,5%), 56 mediante cesárea (13,6%) y 32 inducidos (7,8%).

Se observó la historia obstétrica anterior y posterior a la gestación con muestra analítica estudiada, con una mediana de gestaciones resultante en 2 y oscilando entre un embarazo como mínimo hasta 9 embarazos como valor máximo. El número acumulado de gestaciones para este grupo de mujeres fue de 1047.

La mediana de abortos fue de 0 (IC 95%: 0-0), aunque fueron observados en 127 mujeres (30,9%). De las 127 con abortos informados, 92 (22,4%) los padecieron en primer trimestre, 4 (0,9%) en el segundo trimestre, 3 (0,7%) en el tercer trimestre y 2 (0,4%) informaron muertes neonatales. De las 92 controles con abortos en primer trimestre, sólo 13 (14,1% de las mujeres con abortos en primer trimestre o 3,1% del total) informaron haber padecido dos o más abortos consecutivos antes de la semana 12 de gestación. En la gestación estudiada, 9 (2,1%) informaron haber padecido preeclampsia y 4 (0,9%) crecimiento intrauterino retardado.

El número acumulado de partos con recién nacido vivo en este grupo poblacional fue de 734, con una mediana de 2 por cada mujer (IC 95%: 2-2) y oscilando entre 1 como el valor mínimo y 6 como el valor máximo. 216 (52,6%) de las mujeres que integraron este grupo control ya habían tenido una gestación con alumbramiento de un bebé de forma previa a la

gestación en la que la analítica fue extraída. 49 (11,9%) tuvieron otra gestación con posterioridad a la estudiada.

4.1.4. Análisis 2B. Descripción demográfica del grupo de pacientes con abortos recurrentes ocurridos antes de la semana 10 de gestación.

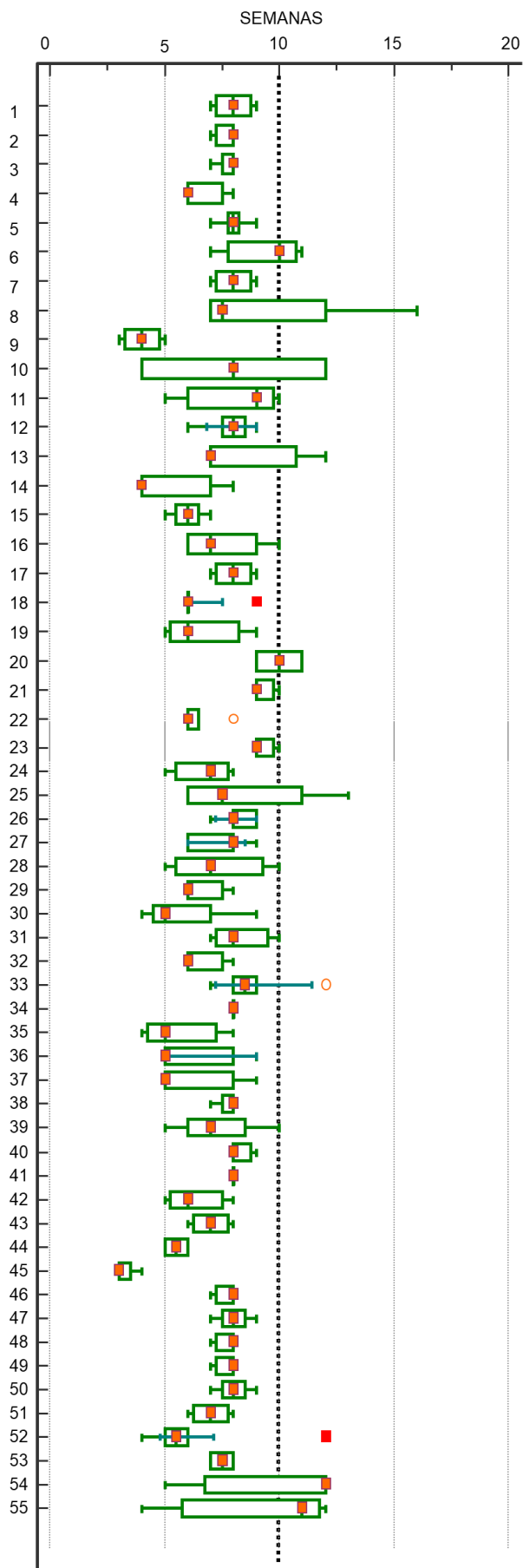
	DOS ABORTOS <S10	≥3 ABORTOS <S10	ABORTOS >S10
PACIENTES INCLUIDAS	32	55	29
	MEDIANA (IC 95%)	MEDIANA (IC 95%)	MEDIANA (IC 95%)
EDAD	36 (34-37)	37 (35-38)	36 (31-39)
ALTURA	160 (156,1-163)	163 (160,8-165)	163 (158-164)
PESO	63,2 (59,1-69,8)	63,5 (61,2-70)	65,1 (62,2-70,7)
IMC	24,9 (22,4-27,2)	24,2 (22,6-24,8)	24,9 (23,7-27,1)
GESTACIONES	3 (2-3)	4 (3-4)	3 (2-4)
SEMANA ABORTOS	7,5 (6,9-8)	8 (7,2-8)	17,5 (14,8-24,2)
ABORTOS	2 (2-2)	3 (3-3,2)	1 (1-2,2)
VIVOS	0 (0-1)	0 (0-0)	1 (0-1)
	PREVALENCIA (%)	PREVALENCIA (%)	PREVALENCIA (%)
ALCOHOLISMO	0 (0%)	1 (1,8%)	0 (0%)
TABAQUISMO	1 (3,1%)	3 (5,4%)	2 (6,8%)
OBESIDAD	4 (12,5%)	10 (18,1%)	5 (17,2%)
SOBREPESO	10 (31,2%)	9 (16,3%)	9 (31%)

S: semana de gestación en la que ocurrieron los abortos

□ **Tabla 4:** descripción demográfica grupos de pacientes

El grupo de pacientes con abortos consecutivos antes de la semana 10 de gestación se compone de 87 mujeres. Se subdivide en dos grandes grupos:

Un primer grupo que reúne a aquellas pacientes que cumplirían el criterio clínico para clasificación de SAF consistente en tres o más abortos consecutivos(3) (55 pacientes).



□ **Figura 8:** Gráfico de cajas y bigotes mostrando la mediana y distribución de abortos de las 55 pacientes pertenecientes al grupo de tres o más abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación.

Otro segundo en el que agrupamos a pacientes que han tenido dos abortos consecutivos sin otra causa que lo explicara (32 pacientes).

En el primer grupo de pacientes con al menos tres abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación, encontramos mujeres que han tenido abortos ocurridos tanto antes de la semana 10 como después, aunque predominantemente anteriores a ese dintel marcado por el último criterio de clasificación(3). De esta forma, 45 (81,8%) pacientes tuvieron tres o más abortos consecutivos todos anteriores a la semana 10 y 10 (18,2%) tuvieron tres o más abortos consecutivos, predominantemente anteriores a la semana 10 pero también

alguno sobrepasado este tiempo de amenorrea.

La mediana de las edades de las 45 pacientes con tres o más abortos consecutivos y todos anteriores a la semana 10 de embarazo fue de 37 años (IC 95%: 34-38,5) y la mediana de las que tuvieron tres abortos consecutivos pero alguno también posterior a la semana 10 fue de 36 años (IC 95%: 35-38,5), sin resultar en diferencia significativas al comparar las medianas mediante el test estadístico de U de Mann-Whitney ($p=0,878$).

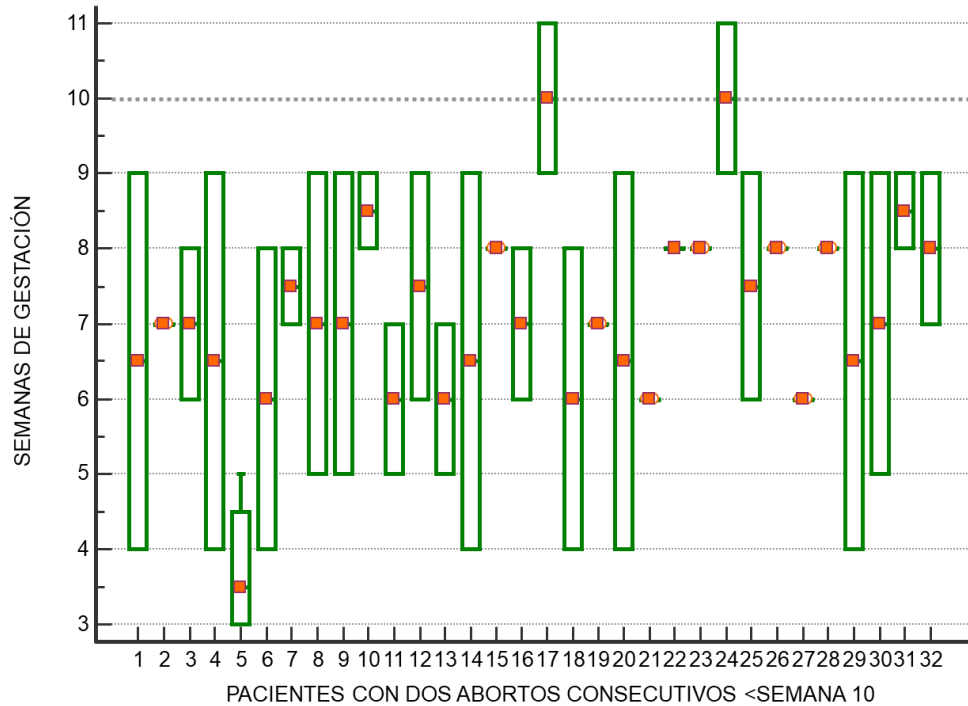
La mayor parte de las pacientes con tres o más abortos consecutivos, tanto exclusivamente antes de la semana 10 como preferentemente antes de esa semana tuvieron gestaciones obtenidas de forma natural con una mediana de transferencias FIV de 0 (IC 95%: 0-0).

La mediana de las semanas en las que ocurrieron los abortos en el primer subgrupo constituido por mujeres con tres o más abortos consecutivos todos anteriores a la semana 10 fue de 8 semanas (IC 95%: 6,8-8). La mediana semanas en las que ocurrieron los abortos en las pacientes que tuvieron tres o más abortos mayoritariamente antes de la semana 10 pero alguno posterior aislado fue de 8,25 (IC 95%: 6,8-9,1). Como la distribución de ambos resultados no seguía la normalidad, fueron comparados con el test estadístico de U-Mann-Whitney con resultado de $p=0,138$, no señalando diferencias significativas.

Entre las 32 pacientes que conforman el segundo gran grupo de pacientes dentro de esta categoría y que padecieron dos abortos consecutivos, y que por tanto, no cumplirían el criterio clínico de clasificación de Sídney(3), 30 (93,7%) tuvieron dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 y 2 (6,3%) tuvieron un aborto anterior y otro a partir de la semana 10 en adelante.

La mediana de edades a la fecha de inclusión en este estudio para las pacientes con dos abortos todos anteriores a la semana 10 de gestación fue de 36 años (IC 95%: 34-37) y la de las dos pacientes que tuvieron dos abortos, uno anterior y otro posterior a la semana 10 fue de 36,5 (extremos: 35-38), sin resultar en diferencias significativas al compararlas con el test estadístico de U de Mann-Whitney ($p=0,696$).

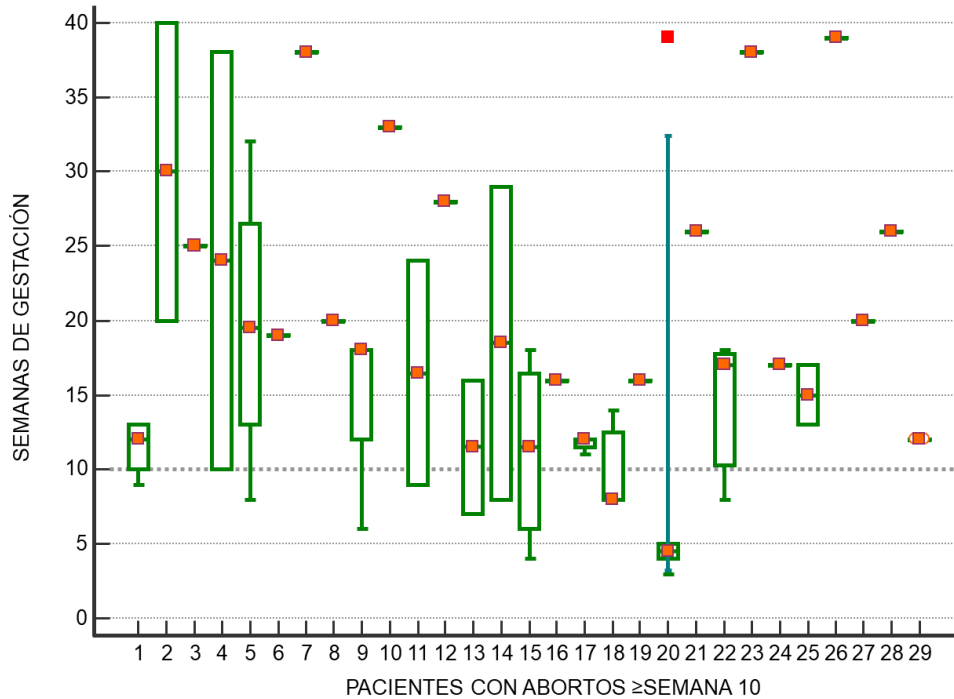
Las pacientes con dos abortos consecutivos todos anteriores a la semana 10 contaban una mediana de 3 embarazos (IC 95%: 2-3) y de 2 abortos (IC 95%: 2-2); resultando similar a las pacientes con dos abortos consecutivos, uno anterior y otro posterior a la semana 10, con una mediana de 3 embarazos (extremos: 3-3) y una mediana de 2 abortos (extremos: 2-2), sin resultar en diferencias significativas al compararlos con el test estadístico de U de Mann-Whitney, $p=0,458$ para las gestaciones y $p=0,852$ para el número total de abortos.



□ **Figura 9:** Gráfico de cajas y bigotes mostrando la mediana y distribución de abortos de las 32 pacientes pertenecientes al grupo de dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación.

La mediana de las semanas en las que ocurrieron los abortos en el primer subgrupo con dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 fue de 7,5 (IC 95%: 6,5-8) y la de las pacientes con dos abortos, uno ocurrido antes y otro igual o posterior a la semana 10 fue de 9, sin diferencias significativas ($p=0,061$) al compararlas con el test de U de Mann-Withney.

4.1.5. Análisis 2C. Descripción demográfica del grupo de pacientes con abortos desde la semana 10 de gestación en adelante.



□ **Figura 10:** Gráfico de cajas y bigotes mostrando la mediana y distribución de abortos de las 29 pacientes pertenecientes al grupo de uno o más abortos desde la semana 10 de gestación.

En la categoría de pacientes con abortos a partir de la semana 10 incluimos un total de 29 mujeres, 20 de ellas (68,9%) habiendo padecido uno o más abortos únicamente a partir de la semana 10 de amenorrea y 9 (31,1%) que habían padecido al menos dos abortos, uno de ellos anterior a la semana 10, pero predominantemente posteriores a dicha semana de gestación.

Las pacientes del primer subgrupo con pérdidas fetales exclusivamente a partir de la semana 10 tenían una mediana de edad al momento de su inclusión en el estudio de 34 años (IC 95%: 25,5-39) y las que tuvieron abortos preferentemente más allá de la semana 10 pero alguno aislado previo, fue de 38 años (IC 95%: 31,2-39,7), sin resultar en diferencias

significativas cuando fueron comparados utilizando el test estadístico de U de Mann-Whitney ($p=0,395$).

Las mujeres con abortos exclusivamente a partir de la semana 10 contaban una mediana de gestaciones de 3 (IC 95%: 2-4) y de 1 aborto (IC 95%: 1-2).

Las pacientes que tuvieron algún aborto anterior a la semana 10 aislado contaban una mediana de embarazos de 4 (IC 95%: 2-4,8) y de abortos de 2 (IC 95%: 1,1-4), sin resultar en diferencias significativas al compararlas mediante la U de Mann-Whitney para el número de embarazos ($p=0,316$) y ligeramente por encima del valor de significación para el número de abortos ($p=0,051$).

En estos dos subgrupos dentro de la categoría de abortos a partir de la semana 10 de gestación, prácticamente todas las gestaciones fueron obtenidas de forma natural, con una mediana de transferencias de 0 (IC 95%: 0-0) y de embriones transferidos de 0 (IC 95%: 0-0). Los extremos para el número de transferencias y embriones transferidos en el subgrupo de pérdidas fetales a partir de la semana 10 exclusivamente fueron 0-2. Los extremos para el número de transferencias FIV realizadas para el subgrupo de abortos anteriores o posteriores a la semana 10, pero mayoritariamente posteriores fueron 0-1 y de 0-2 para el número de embriones transferidos.

La mediana del tiempo de amenorrea en la que ocurrieron los abortos en el primer subgrupo de pacientes con únicamente abortos posteriores a la semana 10 fue de 19,5 semanas (IC 95%: 15,1-26) y la de las mujeres con

abortos predominantemente a partir de la semana 10 en adelante pero alguno aislado previo fue de 15 semanas (IC 95%: 11,2-23,4). La comparación de las medianas de ambos subgrupos se realizó mediante el test estadístico de U de Mann-Whitney con resultado de ausencia de diferencias significativas ($p=0,131$).

4.1.6. Análisis 2D. Descripción demográfica del grupo de pacientes con fracaso de implantación recurrente.

En esta categoría de pacientes con fracaso de implantación recurrente incluimos 37 pacientes, que estratificamos en tres subgrupos para describir mejor esta cohorte en función de su historia clínica.

El primer subgrupo se compone de 23 (62,1%) pacientes que tras al menos tres transferencias y cuatro embriones transferidos, no han obtenido gestación ni la han tenido con anterioridad (fracaso de implantación primario). El segundo subgrupo incluye 8 (21,6%) pacientes que cumplieron criterios para ser consideradas como afectadas de fracaso de implantación recurrente, pero tras haber tenido al menos una gestación previa, con desenlace exitoso o no (fracaso de implantación secundario).

	FRACASO DE IMPLANTACIÓN PRIMARIO	FRACASO DE IMPLANTACIÓN SECUNDARIO	FRACASO REPRODUCTIVO MIXTO	TODAS
PACIENTES INCLUIDAS	23	8	6	37
MEDIANA EDAD (IC 95%)	36 (34,3-38,6)	34 (32,6-37,1)	35,5 (31-39,6)	36 (34-37)
EDAD MÍNIMA	32	31	31	31
EDAD MÁXIMA	43	38	40	43
MEDIANA GESTACIONES (IC 95%)	0 (0-0)	1 (1-2,1)	1 (1-1)	0 (0-1)
MEDIANA VIVOS (IC 95%)	0 (0-0)	0 (0-0,2)	0 (0-0)	0 (0-0)
MEDIANA ABORTOS (IC 95%)	0 (0-0)	1 (0,8-1)	1 (1-1)	0 (0-0,9)
MEDIANA SEMANAS ABORTOS (IC 95%)	0 (0-0)	6 (4,8-13,5)	9 (5,5-9)	0 (0-4,6)
CICLOS FIV (IC 95%)	3 (2-3)	3 (2-4)	2,5 (2-3)	3 (2-3)
TRANSFERENCIAS TOTALES (IC 95%)	4 (4-5)	5 (3,8-7,3)	4 (3-9)	4 (4-5)
TRANSFERENCIAS EN FRESCO (IC 95%)	1 (0-3)	1 (0-2)	0 (0-0)	1 (0-2)
TRANSFERENCIAS CRIOPRESERVADOS (IC 95%)	3,5 (1-4,5)	4 (1-7,5)	1 (1-1)	3,5 (1-4)
EMBRIONES TRANSFERIDOS (IC 95%)	7 (5-8)	8 (5,8-11,9)	4,5 (4-9)	7 (5-8)
EMBRIONES TRANSFERIDOS EN FRESCO (IC 95%)	1,5 (0-4,1)	2 (0-4)	2 (2-2)	2 (0-3,6)
EMBRIONES CRIOPRESERVADOS TRANSFERIDOS (IC 95%)	5 (1-8,1)	7 (1,4-12,5)	2 (2-2)	5,5 (2-8)
MEDIA GRADOS EMBRIONES TRANSFERIDOS EN FRESCO (IC 95%)	2 (1-2,7)	2 (2-2)	1,3 (1,3-1,3)	1,8 (1-2,1)
MEDIANA DÍAS DE CULTIVO (IC 95%)	3 (2,3-3)	2 (1,8-3)	3 (ND)	2,8 (2,1-3)

□ **Tabla 5:** descripción del grupo de pacientes con fracaso de implantación recurrente

El tercer subgrupo considera 6 (16,2%) pacientes que cumplieron criterios de fracaso de implantación pero que fueron derivadas para estudio tras un aborto (fracaso reproductivo mixto), habiendo sido estudiadas por fracaso de implantación recurrente o abortos en la Unidad de Reproducción de nuestro centro.

La edad de las pacientes con fracaso de implantación primario tuvo una mediana de 36 años (IC 95%: 34-38). La mediana de edad de pacientes con fracaso de implantación secundario fue de 34 años (IC 95%: 32,6-37,1) y la

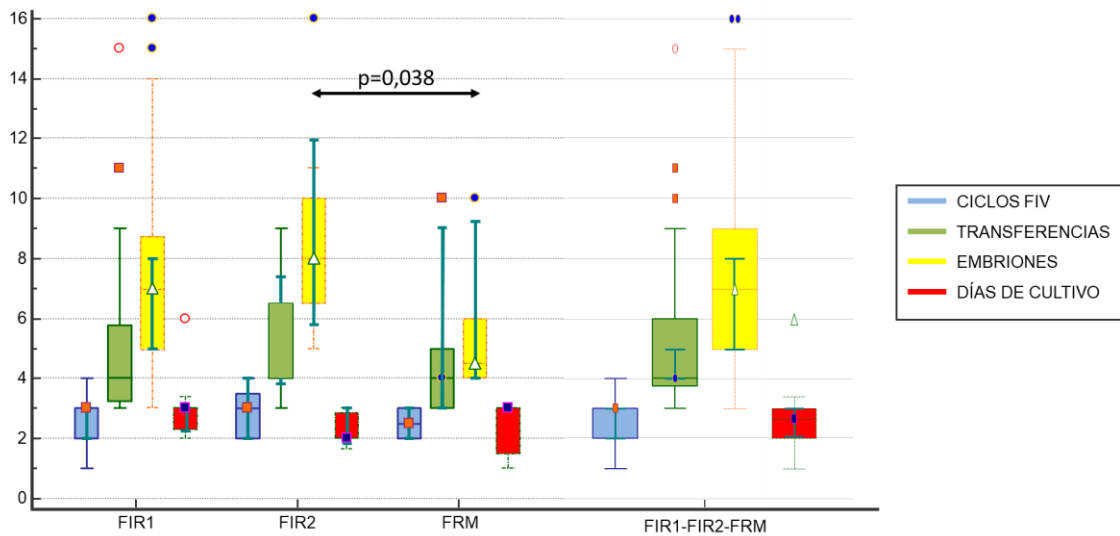
de mujeres con fracaso reproductivo mixto fue de 35 años (IC 95%: 31-39). Las edades de las pacientes de los tres grupos comparados entre sí no arrojaron diferencias significativas utilizando la prueba estadística de U de Mann-Withney. El valor de significación de la comparación de la edad entre pacientes con fracaso de implantación primario y fracaso de implantación secundario fue de $p=0,165$. El resultante de comparar fracaso de implantación primario y fracaso reproductivo mixto fue de $p=0,443$ y el calculado con la comparación entre fracaso de implantación secundario y fracaso reproductivo mixto fue de $p=0,771$.

El grupo de fracaso de implantación primario no tuvo embarazos (mediana 0, IC 95%: 0-0) ni abortos (mediana 0, IC 95%: 0-0). La mediana de transferencias realizadas en este subgrupo fue de 4 (IC 95%: 4-5) y de embriones transferidos de 7 (IC 95%: 5-8). La calidad definida para los embriones transferidos fue de 2 (IC 95%: 1-2,7).

El grupo de fracaso de implantación secundario tuvo una mediana de embarazos previos de 1 (IC 95%: 1-2,18) antes de la instauración del fracaso de implantación. Estas gestaciones previas fueron naturales en 7/8 casos (87,5%) y tuvieron un desenlace en también 7/8 (87,5%) casos en aborto (IC 95%: 0,8-1) ocurrido en un tiempo de gestación mediana de 6 semanas (IC 95%: 6-16) con extremos (6-20). Una única paciente tuvo un embarazo a término con alumbramiento de un recién nacido vivo antes de la instauración del fracaso de implantación recurrente. En la única paciente

en la que estos embarazos previos no se obtuvieron de forma natural, partía de un diagnóstico de esterilidad primaria y los embarazos (2) se produjeron tras transferencia FIV. En esta paciente los abortos no fueron espontáneos sino que tuvo dos IVE por cardiopatías no relacionadas con aneuploidías. Los embarazos previos fueron ectópicos para 3/8 pacientes. En la paciente con aborto espontáneo con tiempo de gestación más elevado éste no ocurrió de forma espontánea o por causas fetales sino que fue atribuido a un accidente que tuvo la paciente mientras estaba embarazada en semana 20. La mediana de transferencias realizadas en este subgrupo fue de 5 (IC 95%: 3,8-7,3) y de embriones transferidos de 8 (IC 95%: 5,8-11,9). La calidad de los embriones transferidos tuvo una mediana de 2.

El subgrupo de fracaso reproductivo mixto contó con una mediana de 1 embarazo (IC 95%: 1-1) posterior al fracaso de implantación recurrente y obtenido en todos los casos tras transferencia de embriones fecundados mediante FIV. La mediana de las semanas en las que ocurrieron los abortos fue de 9 (IC 95%: 6,4-9). Este grupo contó con una mediana de transferencias realizadas de 4 (IC 95%: 3-9) y de 4,5 (IC 95%: 4-9,2) embriones transferidos en total. La mediana de la calidad de los embriones transferidos fue de 1,3.



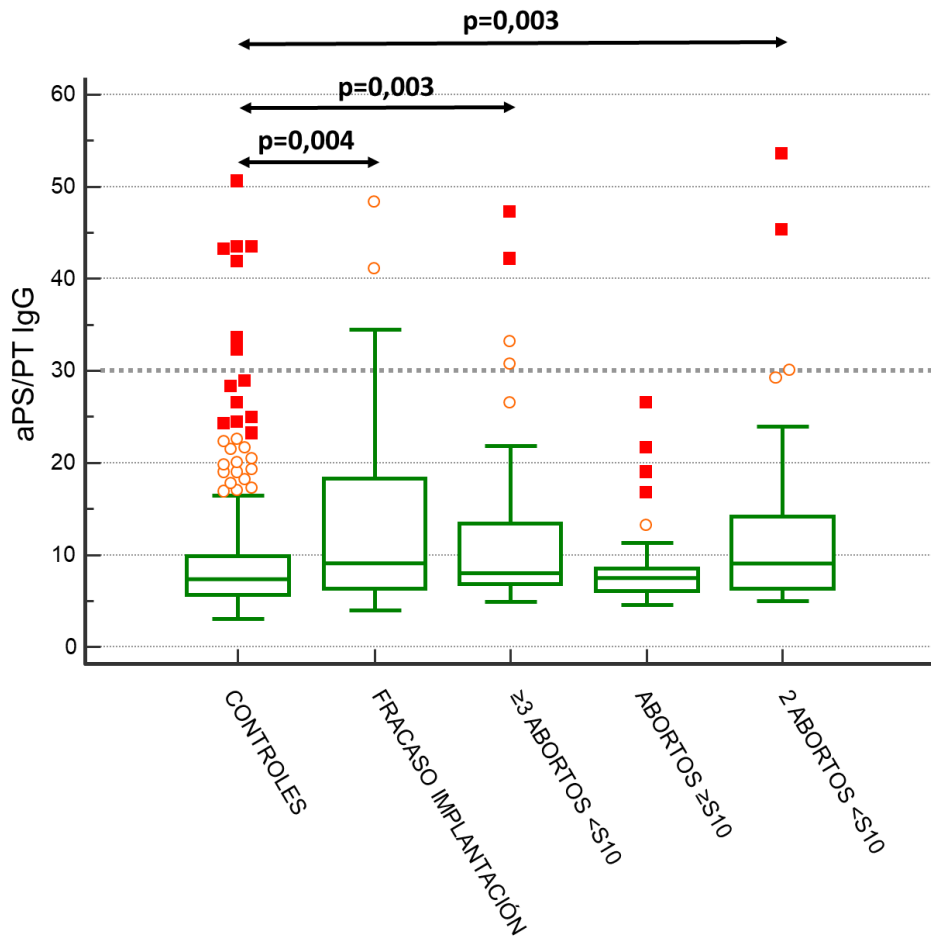
□ **Figura 11:** *diagrama de cajas y bigotes que muestra las medianas e intervalos de confianza al 95% para las variables Ciclos FIV, número de transferencias realizadas, número de embriones transferidos y días de cultivo de los embriones transferidos para cada uno de los subgrupos: Fracaso de Implantación Primario (FIR1), Fracaso de Implantación Secundario (FIR2), Fracaso Reproductivo Mixto (FRM) y para el total del grupo.*

Entre el subgrupo de fracaso de implantación primario y el secundario no hubo diferencias significativas ni en el número de transferencias realizadas ($p=0,522$) ni en el de embriones transferidos ($p=0,204$). Entre el subgrupo de fracaso de implantación primario y el fracaso reproductivo mixto tampoco hubo diferencias en el número de transferencias realizadas ($p=0,589$) ni en el de embriones transferidos ($p=0,176$). Por último, al comparar los subgrupos de fracaso de implantación secundario y fracaso reproductivo mixto, tampoco encontramos diferencias en el número de transferencias realizadas ($p=0,363$) pero sí en el número de embriones transferidos ($p=0,038$), con rango intercuartílico para el fracaso de

implantación secundario de 6,5-10 y para fracaso reproductivo mixto de 4-

6.

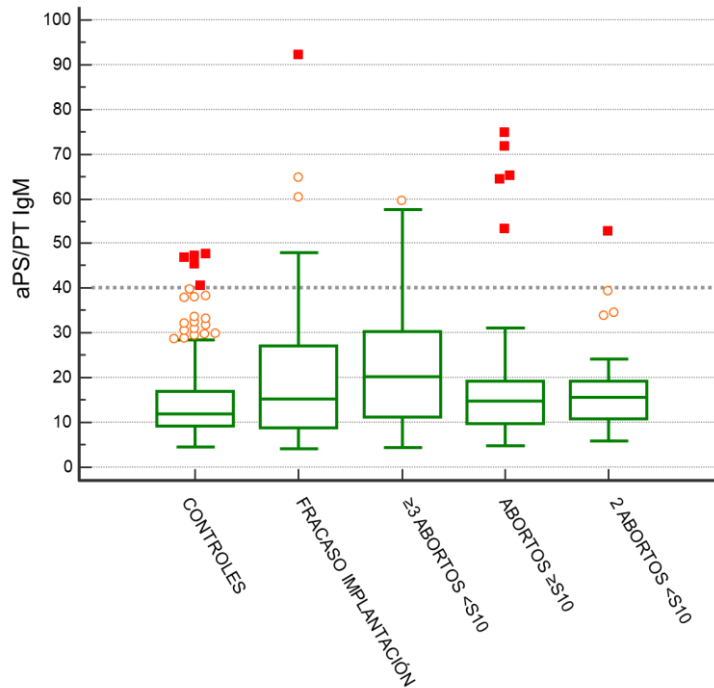
4.1.7. Análisis 2E. Estudio de los niveles de aPS/PT en controles sanos y pacientes en la primera determinación.



□ **Figura 12:** Niveles de aPS/PT IgG en los diferentes grupos estudiados. La barra horizontal coincidente con el valor de 30UI/mL para aPS/PT IgG marca el punto de corte establecido. Las flechas indican las diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados y muestran sobre ellas el valor p de significación.

Los anticuerpos aPS/PT se determinaron en una única ocasión en el grupo control. Como se reseñó en el apartado correspondiente a la definición de los puntos de corte, las determinaciones para aPS/PT IgG en el grupo

control resultó en una mediana de 7,40UI/mL (IC 95%: 7,22-7,68UI/mL) con un rango intercuartílico de 5,60-9,92UI/mL. Los niveles de aPS/PT IgM tuvieron una mediana de 11,95UI/mL (IC 95%: 11,50-12,70UI/mL) y un rango intercuartílico de 9,28-17UI/mL.



□ **Figura 13:** Niveles de aPS/PT IgM en los diferentes grupos estudiados. La barra horizontal coincidente con el valor de 40UI/mL para aPS/PT IgM marca el punto de corte establecido.

La mediana para aPS/PT IgG de las pacientes de todos los grupos estudiados fue de 8,10UI/mL (IC 95%: 7,57-8,96UI/mL) en la primera extracción, resultando en diferencias significativas con respecto a los controles sanos ($p < 0,001$). La mediana para aPS/PT IgM de todas las pacientes en el primer estudio fue de 16,45UI/mL (IC 95%: 14,67-18,40UI/mL), observándose así mismo diferencias con respecto a los controles sanos ($p < 0,001$).

	CONTROLES	FIR	≥3 ABORTOS <S10	ABORTOS ≥S10	2 ABORTOS <S10
CONTROLES	7,40 (7,22-7,68)				
FIR	p=0,004	9,03 (7,74-13,06)			
≥3 ABORTOS <S10	p=0,003	p=0,590	7,99 (7,31-10,36)		
ABORTOS ≥S10	p=0,695	p=0,066	p=0,105	7,47 (6,37-7,99)	
2 ABORTOS <S10	p=0,003	p=0,704	p=0,695	p=0,071	9,90 (7,13-12,90)

□ **Tabla 6:** las celdas sombreadas informan de los valores de las medianas para aPS/PT IgG expresados en UI/mL. Los paréntesis a continuación detallan el IC 95% para los valores de esas medianas. Las celdas no sombreadas informan sobre la significación estadística de las diferencias encontradas entre cada uno de los grupos de pacientes y las controles. En negrita están remarcados los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

El grupo de fracaso de implantación recurrente mostró una mediana de aPS/PT IgG en la primera extracción de 9,03UI/mL (IC 95%: 7,74-13,06UI/mL). Comparado con los niveles de aPS/PT IgG de los controles sanos, se observaron diferencias significativas ($p=0,004$), pero no con respecto a otros grupos de pacientes. En cuanto al isotipo IgM, la mediana en la primera extracción fue de 15,20UI/mL (IC 95%: 11,70-21,07UI/mL), con diferencias también con respecto a los controles sanos ($p=0,041$).

El grupo de pacientes con tres o más abortos consecutivos anteriores a la semana 10 mostró una mediana de aPS/PT IgG de 7,99UI/mL (IC 95%: 7,31-10,36UI/mL), sin resultar en diferencias significativas ($p=0,695$) con respecto a las pacientes del grupo de dos abortos anteriores a la semana 10, que mostraron una mediana para aPS/PT IgG de 9,90UI/mL (IC 95%: 7,13-12,90UI/mL). Comparados con los resultados de los controles sanos, los valores de aPS/PT IgG tanto en el grupo de pacientes con tres o más

abortos anteriores a la semana 10 ($p=0,003$) como en el grupo de dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 sí mostraron diferencias ($p=0,004$).

	CONTROLES	FIR	≥ 3 ABORTOS <S10	ABORTOS \geq S10	2 ABORTOS <S10
CONTROLES	11,95 (11,50-12,70)				
FIR	$p=0,072$	15,20 (11,70-21,07)			
≥ 3 ABORTOS <S10	$p=0,001$	$p=0,224$	20,3 (16,25-23,40)		
ABORTOS \geq S10	$p=0,0121$	$p=0,969$	$p=0,159$	14,9 (10,60-18,14)	
2 ABORTOS <S10	$p=0,032$	$p=0,995$	$p=0,070$	$p=0,890$	15,65 (11,59-18,20)

□ **Tabla 7:** las celdas sombreadas informan de los valores de las medianas para aPS/PT IgM expresados en UI/mL. Los paréntesis a continuación detallan el IC 95% para los valores de esas medianas. Las celdas no sombreadas informan sobre la significación estadística de las diferencias encontradas entre cada uno de los grupos de pacientes y las controles. En negrita están remarcados los valores estadísticamente significativos ($p<0,05$).

En cuanto al isotipo IgM, las pacientes dentro del criterio de Sídney mostraron una mediana de aPS/PT IgM de 20,30UI/mL (IC 95%: 16,2-23,40UI/mL) y las que únicamente padecieron dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de 15,65UI/mL (IC 95%: 11,59-18,20UI/mL), sin diferencias significativas ($p=0,070$). Sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en los títulos de aPS/PT IgM cuando se compararon los resultados de las pacientes con tres o más abortos con los de los controles sanos ($p<0,001$) y cuando se compararon las que padecieron dos abortos consecutivos con los controles sanos ($p=0,045$).

Por último, el grupo de pacientes con pérdidas fetales a partir de la semana 10 en adelante, con una mediana de 7,47 (IC 95% 6,37-7,99), no mostró diferencias significativas en sus valores de aPS/PT IgG con respecto a los controles sanos ($p=0,695$) ni con respecto a ningún grupo de pacientes. El isotipo IgM tuvo una mediana de 14,90UI/mL (IC 95%: 10,60-18,14UI/mL), también sin diferencias significativas con respecto a los controles sanos ($p=0,121$).

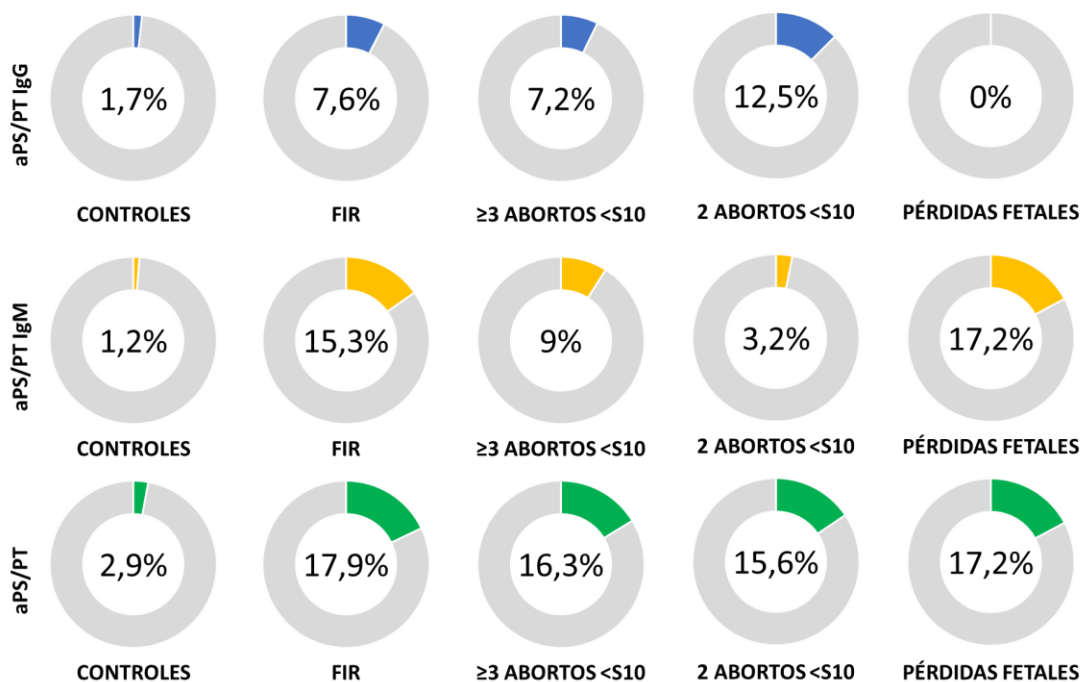
Entre los tres grupos de pacientes no se observaron diferencias en los niveles de aPS/PT IgG: fracaso de implantación recurrente frente a pérdidas fetales ($p=0,071$), fracaso de implantación recurrente frente a abortos anteriores a la semana 10 ($p=0,976$) y pérdidas fetales vs abortos anteriores a la semana 10 ($p=0,058$).

En cuanto a aPS/PT IgM tampoco se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos detectados: fracaso de implantación recurrente frente a pérdidas fetales ($p=0,894$), fracaso de implantación recurrente frente a abortos anteriores a la semana 10 ($p=0,546$) y pérdidas fetales vs abortos anteriores a la semana 10 ($p=0,351$).

4.1.8. Análisis 2F. Estudio de la prevalencia de aPS/PT en controles sanos y los grupos de pacientes.

En el grupo de controles sanos, encontramos positividad de aPS/PT IgG en 7 controles (1,7%) y para IgM en 5 (1,2%). Tras combinar el estudio de ambos isotipos, encontramos alguno positivo en 12 controles (2,9%).

En el grupo de pacientes con fracaso de implantación, observamos presencia anticuerpos aPS/PT IgG en la primera extracción en 3 pacientes (7,6%) y de aPS/PT IgM en 6 pacientes (15,3%). Al observar las positividades de ambos isotipos en conjunto encontramos aPS/PT en 7 pacientes (17,9%), dado que encontramos solapamiento para ambos isotipos en 2 casos. No encontramos nuevas positivizaciones durante el seguimiento en las siguientes extracciones en este grupo de pacientes.



□ **Figura 14:** los diagramas circulares muestran la prevalencia de aPS/PT IgG (azul), IgM (naranja) o ambos isotipos combinados (verde) para los controles y cada uno de los grupos en la primera extracción de sangre estudiada.

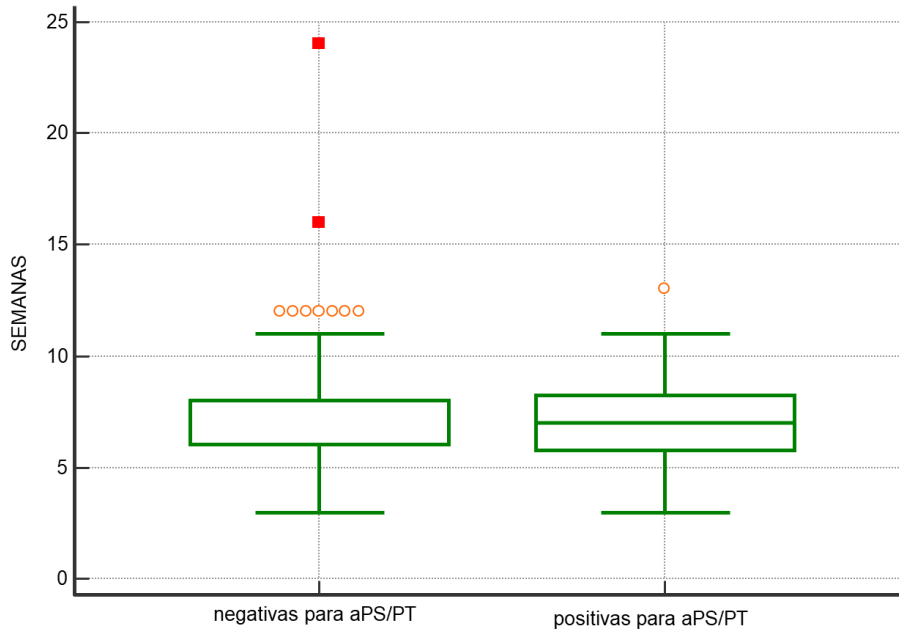
Al estratificar los fracasos de implantación recurrentes según categorías clínicas, encontramos que las pacientes positivas para aPS/PT se distribuyen entre los tres subgrupos. Corresponden al 16% (4 casos) de pacientes con fracaso de implantación primario, al 25% (2 casos) de pacientes con fracaso de implantación secundario y al 16,6% (1 caso) de pacientes con fracaso reproductivo mixto.

Del total de 7 pacientes positivas para aPS/PT del grupo de fracaso de implantación recurrente, sólo hemos podido analizar evolutivamente el comportamiento de estos anticuerpos en 4 casos, de los que uno fue doblemente positivo para IgG e IgM en la primera extracción y tres eran positivos para IgM. Todas las pacientes confirmaron la presencia de anticuerpos a largo plazo con una mediana en días con respecto a la segunda extracción de 160. No obstante, sólo en tres de ellas se realizó en un plazo igual o superior a los 90 días y en un caso, positivo para IgM únicamente, la segunda extracción se realizó a los 21 días de la primera, sin confirmación posterior.

En el supergrupo de pacientes con abortos anteriores a la semana 10 de gestación, observamos la presencia de aPS/PT IgG en 8 pacientes (9,1%) y de aPS/PT IgM en 6 (6,8%), con una prevalencia de ambos isotipos combinados de 14 casos (16,1%). La persistencia de aPS/PT IgG se observó en la segunda determinación realizada en 6 pacientes (75% de los positivos). La mediana de días de diferencia entre la primera extracción y la

segunda fue de 252 (IC 95%: 112-849). De las 6 pacientes positivas para IgM, sólo en 2 se confirmó la persistencia de la positividad en muestras posteriores, en un caso se observó negativización y en tres pacientes ocurrió una pérdida de seguimiento y no se pudo observar la evolución de aPS/PT IgM. En las dos pacientes positivas para aPS/PT IgM la diferencia de días entre la primera extracción y la segunda tuvo una mediana de 27, con extremos 12-42.

Al estratificar las pacientes positivas en la primera muestra estudiada en aquellas que cumplían el criterio clínico de Sídney de 3 abortos o más consecutivos, 4 casos de 55 (7,2%) presentaban en el primer estudio aPS/PT IgG positivos. Por otro lado, 9 pacientes fueron positivas en el primer estudio para IgM (9%) y ambos isotipos en combinación fueron encontrados en 9 pacientes (16,3%). Una vez conocida la prevalencia de aPS/PT en este grupo, procedimos a indagar si existían diferencias en las semanas en las que se habían producido los abortos entre pacientes positivas para aPS/PT (mediana: 7. IC 95%: 6-8) y negativas (mediana: 8. IC 95%: 7-8), no observándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,355$). Tampoco hallamos diferencias entre las positivas para aPS/PT IgG (mediana: 6. IC 95%: 5,89-8) y las positivas para aPS/PT IgM (mediana: 7. IC 95%: 5,26-9,73).



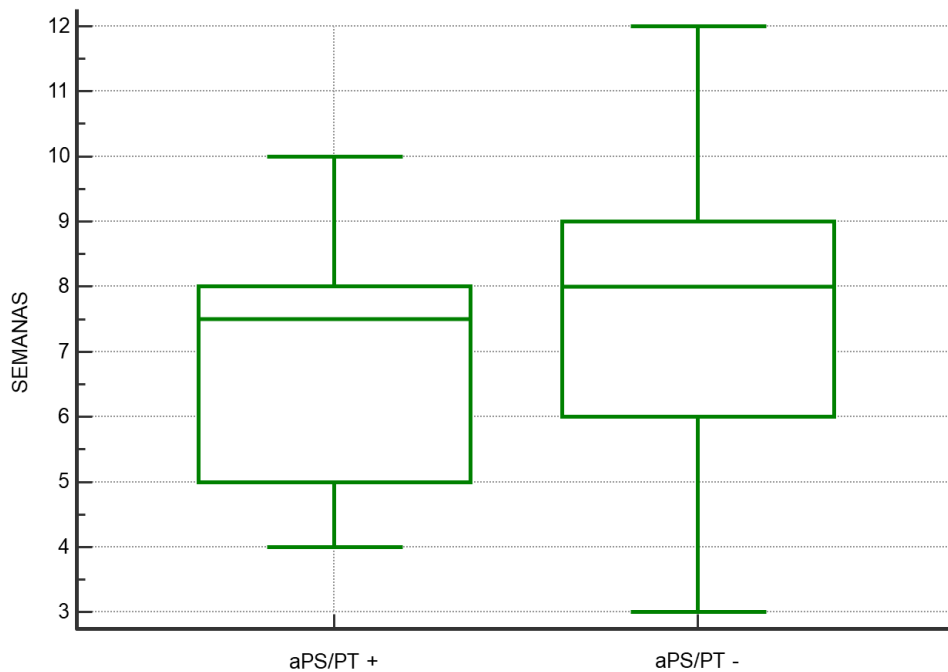
□ **Figura 15:** comparación entre las semanas de gestación en las que ocurrieron los abortos en las pacientes positivas para aPS/PT y las negativas en el grupo de pacientes con ≥ 3 abortos predominantemente anteriores a la semana 10.

En las pacientes que tuvieron dos abortos consecutivos antes de la semana 10 de gestación, el isotipo IgG fue positivo en 4 pacientes de 32 (12,5%), el IgM en 1 único caso (3,2%) y ambos combinados en 5 pacientes (15,6%).

En este grupo de pacientes, la semana de gestación en la que ocurrieron los abortos no mostró diferencias ($p=0,724$) en función de la presencia de aPS/PT (mediana: 7,5. IC 95%: 5-8) o su ausencia (mediana: 8. IC 95%: 6,19-8).

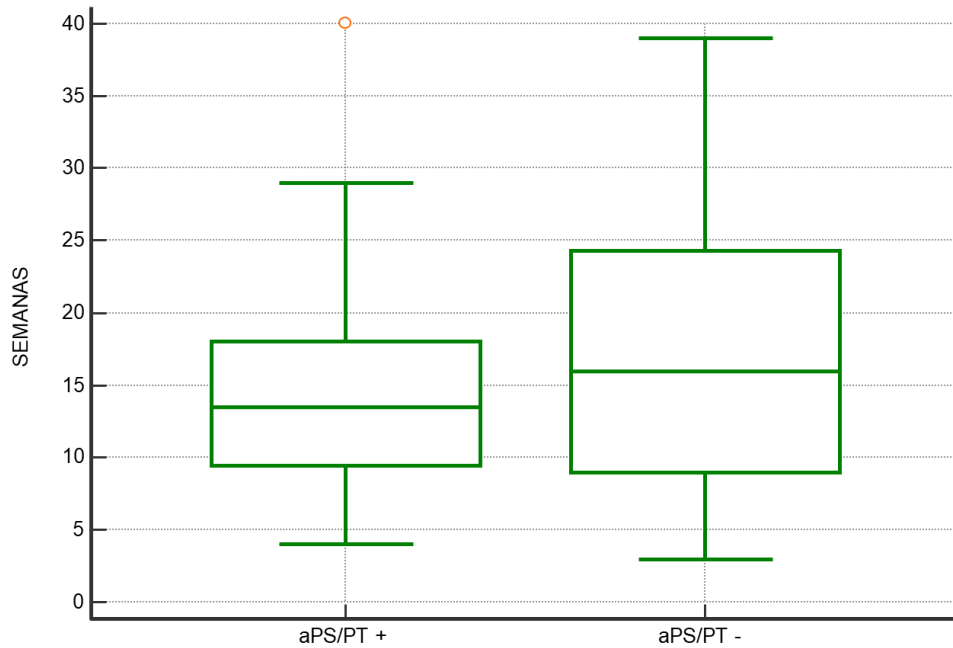
En el grupo de pacientes con pérdidas fetales o más allá de la semana 10 de gestación, ninguna de las 29 pacientes resultó positiva para aPS/PT IgG y 5 fueron positivas para aPS/PT IgM (17,2%). De las 5 pacientes positivas,

disponemos de seguimiento analítico en 3 de ellas, con persistencia en la segunda determinación en todos los casos (100%) y una mediana en días entre la primera y la segunda determinación de 98.



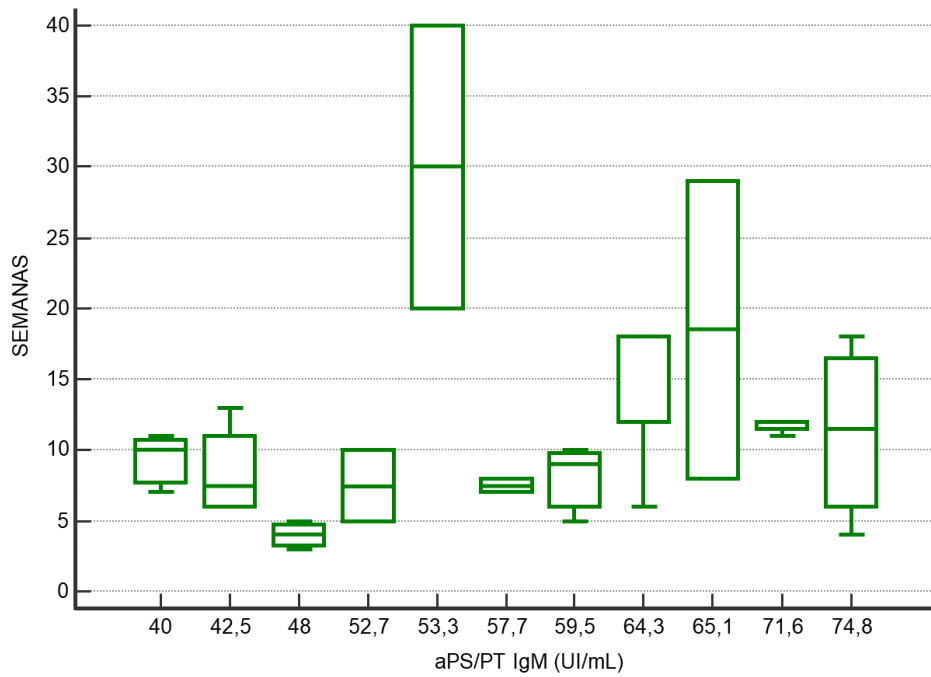
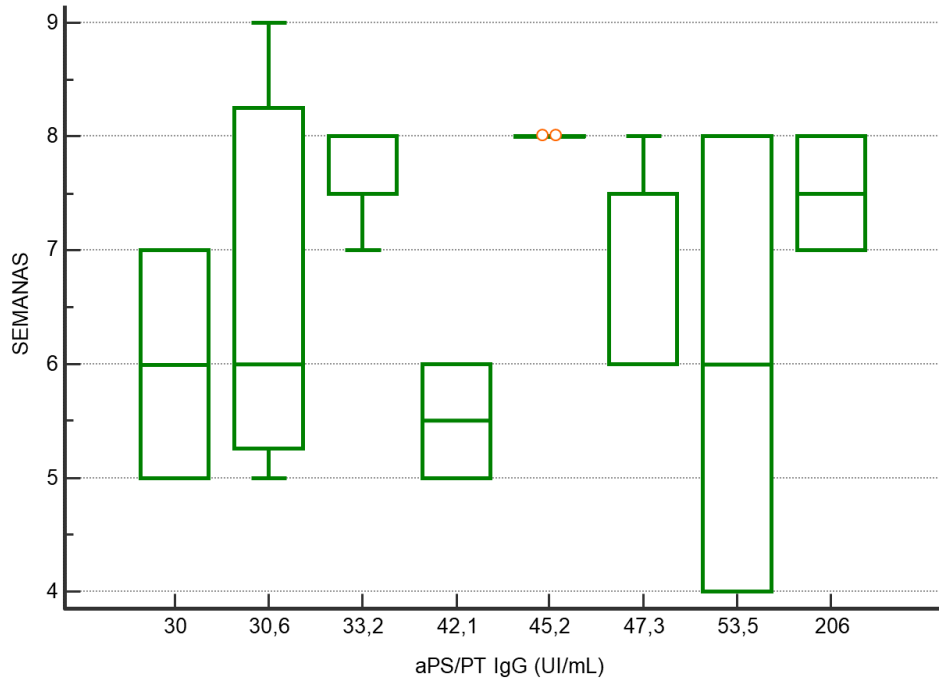
□ **Figura 16:** comparación entre las semanas de gestación en las que ocurrieron los abortos en las pacientes positivas para aPS/PT y las negativas en el grupo de pacientes con 2 consecutivos abortos predominantemente anteriores a la semana 10.

Así mismo, una vez conocida la prevalencia de aPS/PT en el grupo de pacientes con abortos desde la semana 10 en adelante, indagamos si la presencia de aPS/PT (mediana: 13,5. IC 95%: 9,91-18) marcaba diferencias en cuanto a la semana en la que se produjeron los abortos, no encontrando diferencias significativas ($p=0,622$) con respecto a las pacientes no portadoras de aPS/PT (mediana: 16. IC 95%: 12-18,53).



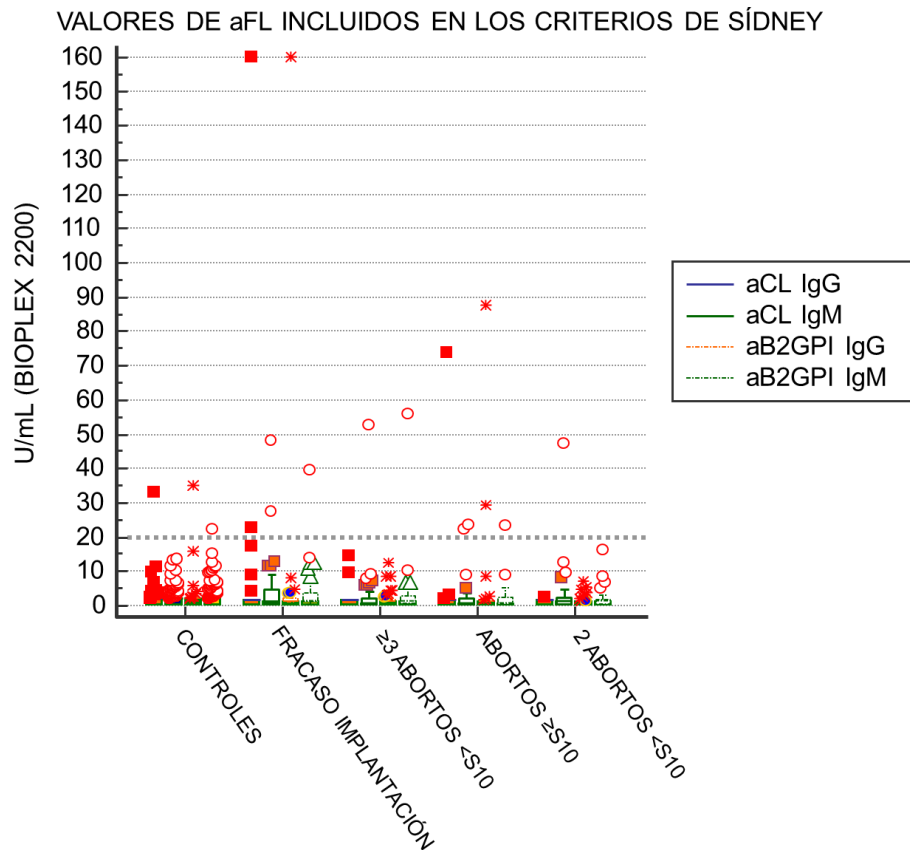
□ **Figura 17:** comparación entre las semanas de gestación en las que ocurrieron los abortos en las pacientes positivas para aPS/PT y las negativas en el grupo de pacientes con pérdidas fetales.

Una vez constatado que la presencia o ausencia de aPS/PT no influyó en la semana de gestación en la que ocurrieron los abortos en los tres grupos de pacientes, pasamos a indagar si hubo diferencias en las semanas en las que ocurrieron los abortos según el valor encontrado de aPS/PT. El coeficiente de correlación “r” para la variable aPS/PT IgG y la variable semanas en la que ocurrieron los abortos fue de $r=0,157$ con ausencia de significación estadística ($p=0,484$). Los resultados fueron similares para aPS/PT IgM con un coeficiente de correlación $r=0,196$ y una $p=0,274$.



□ **Figura 18:** *semanas en las que ocurrieron los abortos en pacientes positivas para aPS/PT IgG (arriba) y aPS/PT IgM (abajo). No se observa una relación entre el resultado de la concentración de aPS/PT y las semanas en las que ocurrieron los abortos.*

4.1.9. Análisis 2G. Estudio de la prevalencia de aFL incluidos en los criterios de Sídney en los grupos de pacientes y en controles sanos. Análisis del solapamiento con respecto a aPS/PT.



□ **Figura 19:** Niveles de aFL en los diferentes grupos de pacientes estudiados y los controles sanos.

En los controles sanos encontramos dos (0,4%) mujeres positivas para alguno de los aFL incluidos en los criterios de clasificación de Sídney. En concreto, se trata de un control sano que resultó positiva para aCL IgG y aB2GPI IgG y otra positiva para aB2GPI IgM. Ninguna fue positiva para AL ni para aCL IgM.

En el grupo de fracaso de implantación recurrente el estudio de los aFL incluidos en los últimos criterios de clasificación permitió encontrar 5 (13,5%) pacientes positivas. Aunque la prevalencia es baja para todos ellos, el más frecuentemente encontrado fue el anticoagulante lúpico, detectándose en 3 (8,1%) pacientes, todas positivas para la técnica de detección con veneno diluido de víbora y dos para la técnica con Sílice. Entre los otros aFL incluidos en los criterios de Sídney, una (2,7%) paciente resultó positiva para aCL IgG, dos (5,4%) para aCL IgM, una (2,7%) para aB2GPI IgG y una (2,7%) para aB2GPI.

En el grupo de tres o más abortos recurrentes anteriores a la semana 10, la medida de los aFL incluidos en los criterios de clasificación nos permitió hallar una (1,8%) paciente positiva tanto para aCL IgM como para aB2GPI IgM.

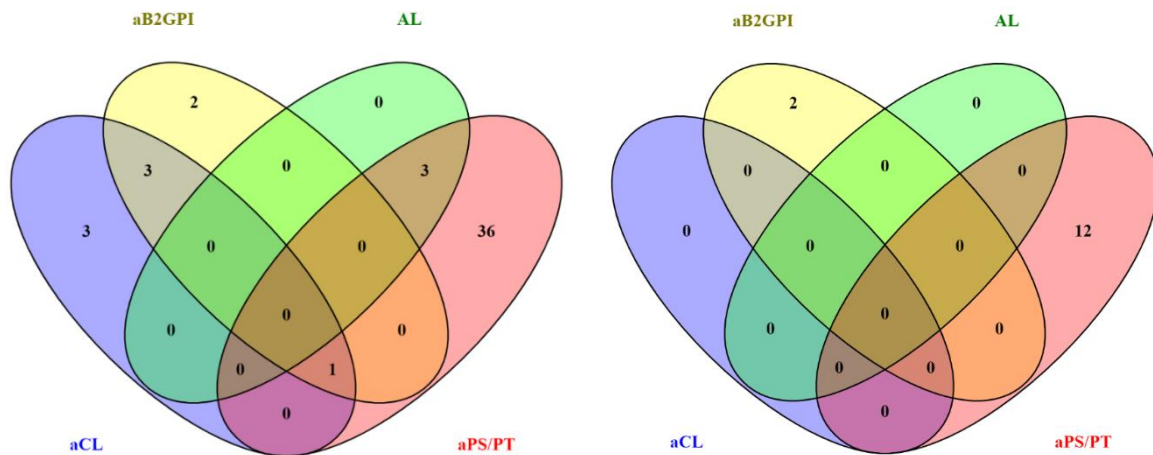
En el grupo de pérdidas fetales encontramos 3 (3,4%) pacientes positivas, una positiva para aCL IgG, IgM y aB2GPI IgG e IgM; otra para aCL IgM y una última para aB2GPI IgG.

En el grupo de dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 el estudio de los aFL incluidos en los criterios de clasificación nos permitió encontrar una (3,1%) paciente con anticuerpos, positiva para aCL IgM.

Una vez conocida la positividad de los aFL incluidos en los criterios de clasificación y de los aPS/PT por separado, interesa conocer la positividad global de los aFL determinados en este estudio y el solapamiento que presentan entre ellos. Entre controles sanos y pacientes, 40 mujeres tuvieron valores positivos para aPS/PT en el estudio inicial. Entre ellas, 36 (90%) no mostraron coincidencia con otros aFL y 4 sí, tres con AL y uno con aCL.

La correlación entre aPS/PT y AL fue significativa con un índice “r” bajo ($r=0,192$. $p=0,017$. IC95%: 0,034-0,341) y un porcentaje de pacientes dobles positivos para aPS/PT y AL dRVVT del 7,6% y de manera complementaria, de positivos para aPS/PT y negativos para AL de 92,3%.

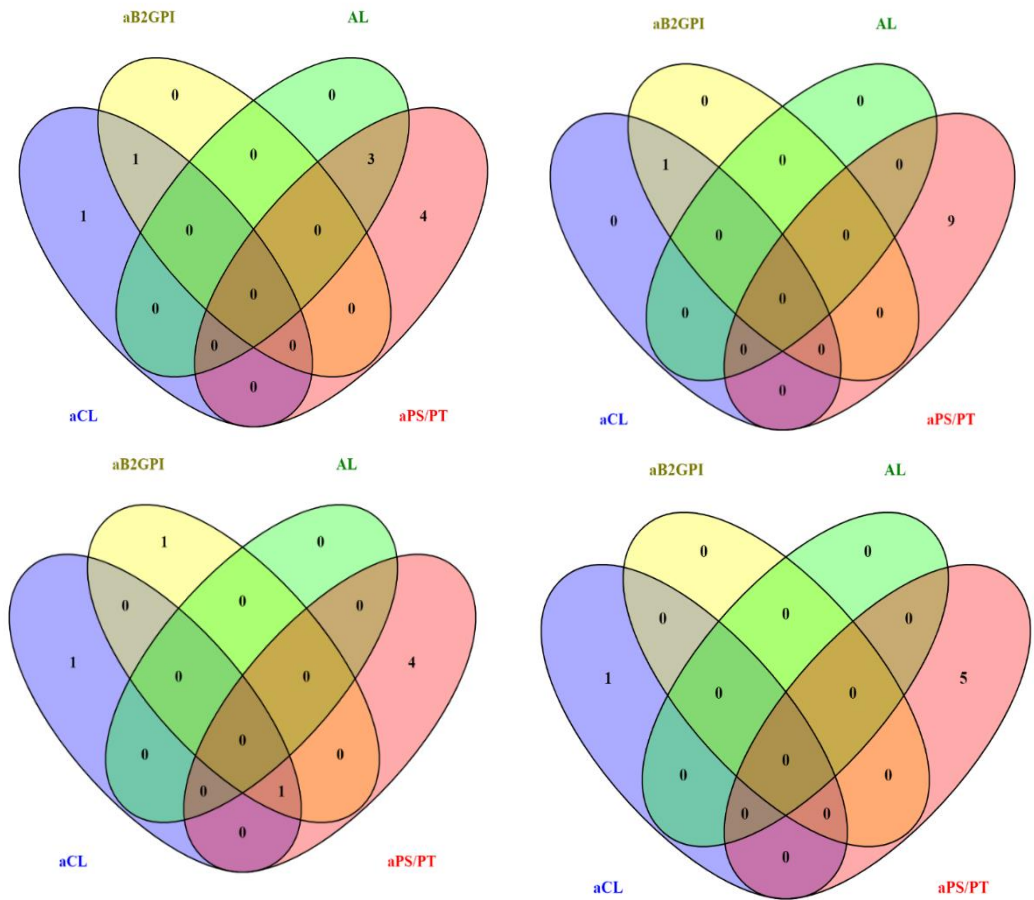
Se calculó la correlación entre los valores cuantitativos de AL dRVVT y aPS/PT IgG e IgM, encontrándose un resultado significativo para el isotipo IgM, aunque con un índice de correlación también bajo ($r=0,238$. $p=0,005$. IC95%: 0,072-0,392). El resto de correlaciones, aPS/PT IgG con el ratio de AL dRVVT ($r=0,047$. $p=0,584$. IC95%: -0,123-0,215), aPS/PT IgM con el ratio de AL Sílice ($r=0,003$. $p=0,964$. IC 95%: -0,165-0,173) y aPS/PT IgG con la ratio de AL Sílice ($r=0,074$. $p=0,392$. IC 95%: -0,096-0,241) no resultaron significativas.



□ **Figura 20:** Positividad y solapamiento entre aFL en el primer estudio realizado en todos los grupos de pacientes (izquierda) y en el grupo de controles sanos (derecha).

En el grupo de controles sanos encontramos 14 (3,4%) mujeres positivas, 12 de ellas para aPS/PT y 2 para aB2GPI sin solapamiento entre ellas.

En el grupo de pacientes con fracaso de implantación recurrente encontramos 9 (24,3%) pacientes con resultados positivos para aFL, 5 para aFL clásicos y 7 resultados positivos para aPS/PT. Cuatro de las 7 pacientes positivas para aPS/PT no mostraron solapamiento con la positividad de otros aFL y tres sí, pero sólo con AL. Es interesante resaltar que estas tres pacientes con AL y aPS/PT positivos supusieron el 7,6% de todos los aPS/PT en este estudio, no encontrando AL positivo aislado en ningún caso.



□ **Figura 21:** Positividad y solapamiento entre aFL en los diferentes grupos de pacientes: fracaso de implantación recurrente (arriba a la izquierda), tres o más abortos anteriores a la semana 10 (arriba a la derecha), muertes fetales (abajo a la izquierda), dos abortos anteriores a la semana 10 (abajo a la derecha).

En el grupo de mujeres con tres o más abortos anteriores a la semana 10, ninguna de las 9 pacientes positivas para aPS/PT en el estudio inicial muestra solapamiento con otros aFL, hallando presencia de aFL en 10 pacientes (18,1%). En el grupo de pérdidas fetales, 7 (24,1%) pacientes resultaron positivas para aFL , con sólo 1 de las 5 pacientes positivas para aPS/PT solapando en positividad con otro aFL, en este caso con aCL.

En el grupo de mujeres con dos abortos consecutivos antes de la semana 10, ninguna de las 5 pacientes positivas para aPS/PT, mostró solapamiento con otro aFL, encontrando aCL en otra de ellas y sumando un total de 6 pacientes positivas para aFL (18,7%).

4.1.10. Análisis 2H. Estudio de la evolución de los niveles de aPS/PT en los diferentes grupos de pacientes.

Para aPS/PT IgG dispusimos de una segunda muestra determinada en 86 de las 153 pacientes (56,2%) incluidas, con una mediana de días de diferencia con respecto a la primera extracción de 126 (IC 95%: 98-177). El estudio de muestras pareadas entre el resultado de la primera extracción (mediana de 9,04UI/mL) y la segunda (mediana de 8,62UI/mL) mediante la prueba de Wilcoxon tuvo una diferencia de medianas (Hodges-Lehmann) de -0,89 con significación estadística ($p=0,021$).

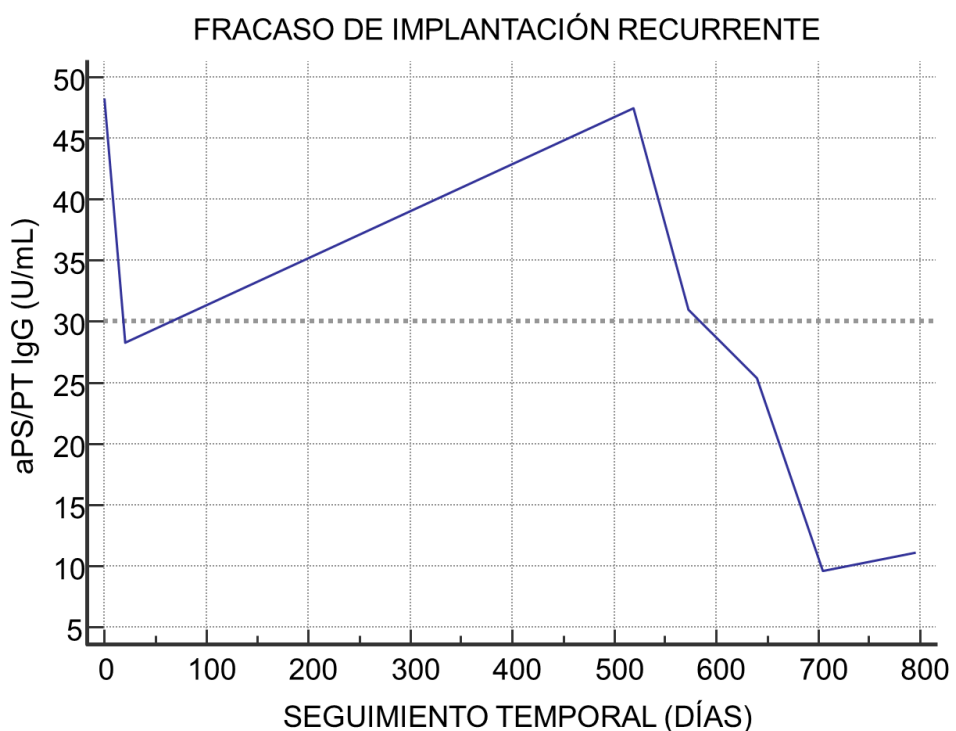
Del total de 11 pacientes con valores positivos para aPS/PT IgG en la primera extracción, obtuvimos una segunda muestra que confirmó la positividad de aPS/PT IgG en 9 pacientes (81,8%), resultando en una diferencia de medianas (Hodges-Lehmann) de -7,55 sin significación estadística ($p=0,250$). El índice Kappa entre la primera extracción y la segunda cuando éstas distaron más de 90 días para pacientes asignados como positivas en el primer estudio fue de 0,79 (IC 95%: 0,57-1,00). La mediana de días de diferencia entre la primera extracción y la segunda fue

de 347 días (IC 95%: 112-574), con una única paciente en la que fue determinada por debajo de 90 días.

De las 8 pacientes con dos muestras pareadas con una diferencia entre las fechas de extracción mayor a 90 días, 7 se confirmaron posteriormente y sólo una disminuyó su título por debajo del valor del punto de corte para aPS/PT IgG establecido en 30UI/mL.

Al observar el comportamiento evolutivo de los aPS/PT IgG en las pacientes positivas en la primera extracción en nuestro estudio, hallamos fluctuaciones en el tiempo de los niveles, con una mediana ponderada temporalmente de todos los valores de todas las extracciones disponibles para este grupo de 34,12UI/mL y un intervalo de confianza al 95% de 25,29UI/mL a 44,43UI/mL. Este cálculo tuvo en cuenta la fecha inicial y fecha final cada una de las extracciones con resultado disponible. Las pacientes negativas en la primera extracción para aPS/PT IgG mantuvieron una mediana global de 7,76UI/mL (IC 95%: 7,38UI-8,13UI/mL). Debido a que el extremo inferior del resultado del cálculo para el intervalo de confianza al 95% para las pacientes inicialmente positivas para aPS/PT IgG resultó casi cinco unidades por debajo del punto de corte definido para estos anticuerpos, y que ello indicaba una fluctuación hacia la negatividad en algunas pacientes, procedimos al cálculo del porcentaje de tiempo que los títulos se mantuvieron superiores al punto de corte. Para las 9 pacientes positivas inicialmente y que contaban con más de una determinación de

aPS/PT IgG, el 64,8% (mediana) del tiempo de seguimiento presentaron valores positivos, con un intervalo de confianza al 95% de 21,65% a 93,93%. Estos resultados contrastan con los del grupo de pacientes que resultaron negativas para aPS/PT en el estudio inicial, que obtuvieron una mediana de 0% del tiempo de seguimiento con valores positivos (IC 95%: 0-0%).



□ **Figura 22:** Evolución de los niveles de los aPS/PT IgG en pacientes con fracaso de implantación recurrente con determinaciones posteriores.

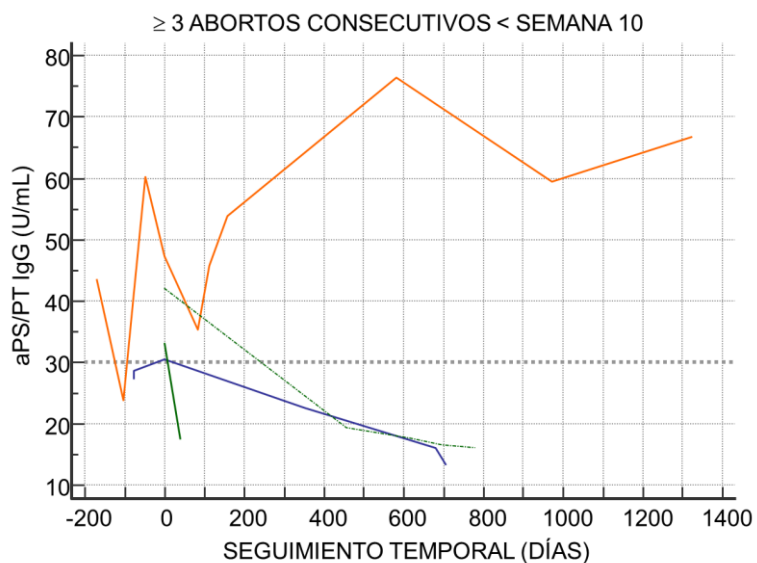
En el grupo de fracaso de implantación recurrente observamos tres pacientes con resultado positivo para aPS/PT IgG en la primera determinación realizada con motivo del estudio de fracaso reproductivo. En dos de ellas sólo dispusimos del primer estudio analítico y en una tercera,

con un tiempo total de seguimiento entre extracciones de 795 días, observamos un valor máximo de 48,3U/mL y mínimo de 9,61U/mL, con una extrapolación de tiempo por encima del punto de corte del 67,7% del periodo estudiado.

	PACIENTE 9	PACIENTE 10	PACIENTE 11	PACIENTE 12
SEGUIMIENTO TEMPORAL (DÍAS)	782	40	1494	779
PRIMER RESULTADO	27,3	33,2	43,6	42,1
ÚLTIMO RESULTADO	13,3	17,4	66,7	16
MÍNIMO	13,3	17,4	23,8	16
MÁXIMO	30,6	33,2	76,4	42,1
% SUPERIOR A PUNTO DE CORTE	6,3	20,3	98,0	31,1

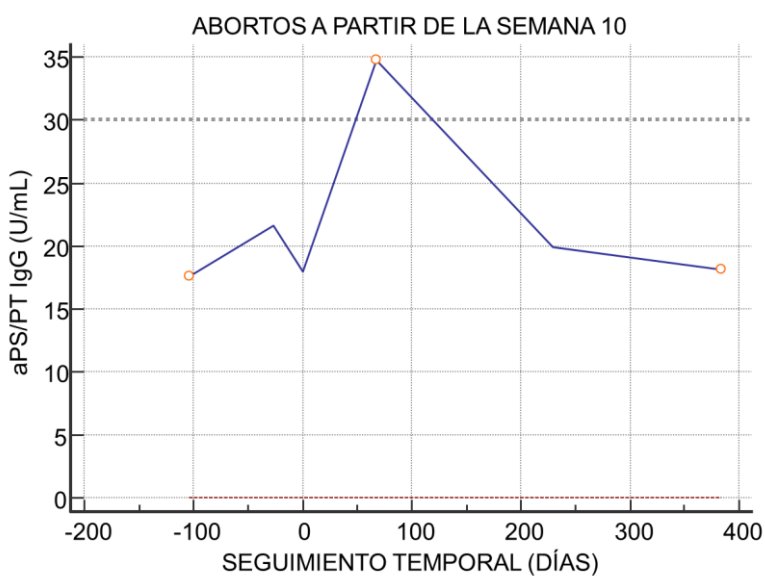
□ **Tabla 8:** *Evolución temporal de aPS/PT IgG en el grupo de pacientes con ≥ 3 abortos anteriores a la semana 10 de gestación.*

En el grupo de pacientes con abortos recurrentes anteriores a la semana 10 de gestación dentro de los criterios de Sidney (3 o más abortos consecutivos sin una causa conocida), disponemos de datos sobre seguimiento en 4 pacientes. En conjunto, el cálculo de la media de porcentaje de tiempo por encima del punto de corte en este grupo de pacientes fue del 38,9%, con una única paciente mostrando resultados positivos la mayor parte del tiempo de seguimiento (98%).



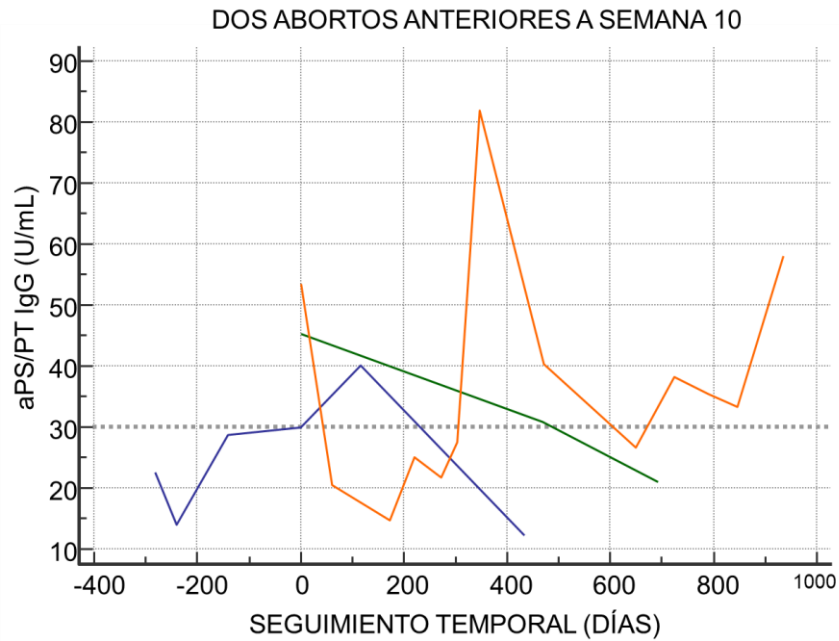
□ **Figura 23:** Evolución de los niveles de los aPS/PT IgG en pacientes con ≥ 3 abortos anteriores a la semana 10 de gestación.

En el grupo de pacientes con abortos a partir de la semana 10, sólo una paciente alcanzó resultados positivos durante el seguimiento desde valores negativos en el estudio basal. El porcentaje de tiempo calculado por encima del punto de corte fue del 14,6%.



□ **Figura 24:** Evolución de los niveles de los aPS/PT IgG en pacientes con ≥ 1 aborto a partir de la semana 10 de gestación.

En el grupo de pacientes con abortos anteriores a la semana 10 pero no incluidas en el consenso de Sídney al haber sólo padecido dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10, encontramos 4 pacientes con datos



□ **Figura 25:** Evolución de los niveles de los aPS/PT IgG en pacientes con 2 abortos anteriores a la semana 10 de gestación.

sobre la evolución de sus determinaciones de aPS/PT IgG. En el gráfico anterior no está representado el seguimiento de una paciente con valores altos de aPS/PT para facilitar la observación de diferencias en el seguimiento de las pacientes con valores más bajos.

Para aPS/PT IgM disponemos de una segunda muestra en 87 de las 155 pacientes, con una diferencia de medianas (Hodges-Lehmann) de -1,45 sin significación estadística ($p=0,091$). Del total de 17 pacientes positivas contamos con 11 en las que pudo realizarse una segunda determinación. La

mediana de tiempo transcurrido entre ambas extracciones fue 113 días (IC 95%: 30-224) y la diferencia de medianas (Hodges-Lehmann) fue de -3,80, sin significación estadística ($p=0,275$). Sólo 7 pacientes de las 11 positivas para aPS/PT IgM en las que pudo determinarse estos anticuerpos en una segunda extracción, cumplieron el requisito temporal de confirmación de 90 o más días, con una diferencia de medianas (Hodges-Lehmann) de -12,25 sin significación estadística ($p=0,156$). El índice Kappa entre la primera extracción y la segunda cuando éstas distaron más de 90 días para pacientes asignados como positivas en el primer estudio fue de 0,74 (IC 95%: 0,46-1,00).

	PACIENTE 1	PACIENTE 8	PACIENTE 18	PACIENTE 21
SEGUIMIENTO TEMPORAL (DÍAS)	715	694	936	176
PRIMER RESULTADO	22,6	45,2	53,5	145
ÚLTIMO RESULTADO	12,3	21,1	58,1	130
MÍNIMO	12,3	21,1	14,8	130
MÁXIMO	40,1	45,2	81,9	206
% SUPERIOR A PUNTO DE CORTE	32,4	70,4	64,9	100

□ **Tabla 9:** *Evolución temporal de aPS/PT IgG en el grupo de pacientes con dos abortos anteriores a la semana 10 de gestación.*

Cinco de las 7 pacientes que resultaron positivas para aPS/PT IgM en la primera determinación mantuvieron los niveles por encima del punto de corte en una segunda extracción separada al menos 90 días de la primera.

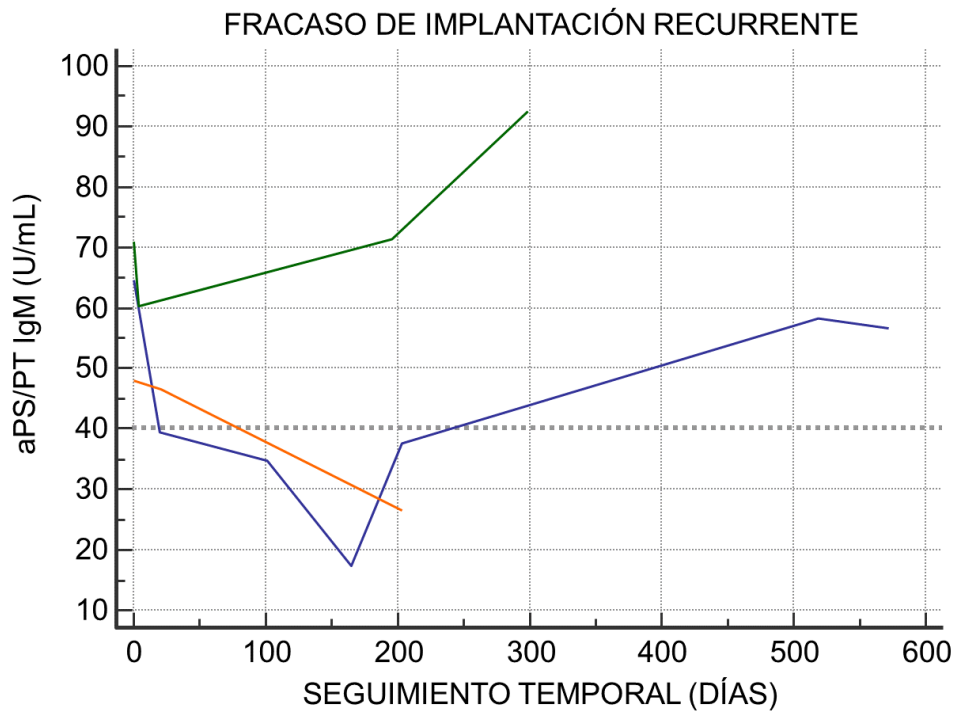
Dos pacientes negativas positivizaron aPS/PT IgG durante el seguimiento en una segunda extracción realizada con una distancia temporal igual o mayor

a 90 días. Si consideramos cualquier diferencia temporal entre extracciones, observamos positividad durante el seguimiento cercano en otras dos pacientes. En el caso de IgM dos pacientes positivizaron durante el seguimiento con una distancia temporal igual o mayor a 90 días. No se observaron positivizaciones en muestras distanciadas en un plazo temporal inferior.

Durante el seguimiento evolutivo, las 17 pacientes positivas en el primer estudio para aPS/PT IgM mostraron una mediana global ponderada temporalmente de 51,50UI/mL (IC 95%: 40,03-64,98UI/mL), mientras que las pacientes negativas para aPS/PT IgM tuvieron una mediana de 14,27UI/mL (IC 95%: 12,29-15,64UI/ml). A pesar de que el extremo inferior del intervalo de confianza al 95% se situó por encima del punto de corte definido para aPS/PT IgM, se estudió el porcentaje de tiempo que los valores estuvieron por encima del punto de corte establecido en 40UI/mL. El resultado de este cálculo fue una mediana de 77,26% (IC 95% 34,70-100%). De forma complementaria se estudió el porcentaje de tiempo que las pacientes negativas para IgM en el primer estudio, obteniendo una mediana de 0% (IC 95%: 0-0%).

En el grupo de fracaso de implantación observamos tres pacientes positivas para aPS/PT IgM de las que una mantiene durante el seguimiento resultados por encima del punto de corte, otra negativiza en la siguiente extracción y una tercera negativiza pero posteriormente vuelve a positivizar

el resultado de aPS/PT IgM con un porcentaje de tiempo calculado por encima del punto de corte del 61,7%.



□ **Figura 26:** Evolución de los niveles de los aPS/PT IgM en pacientes con fracaso de implantación recurrente y determinaciones posteriores.

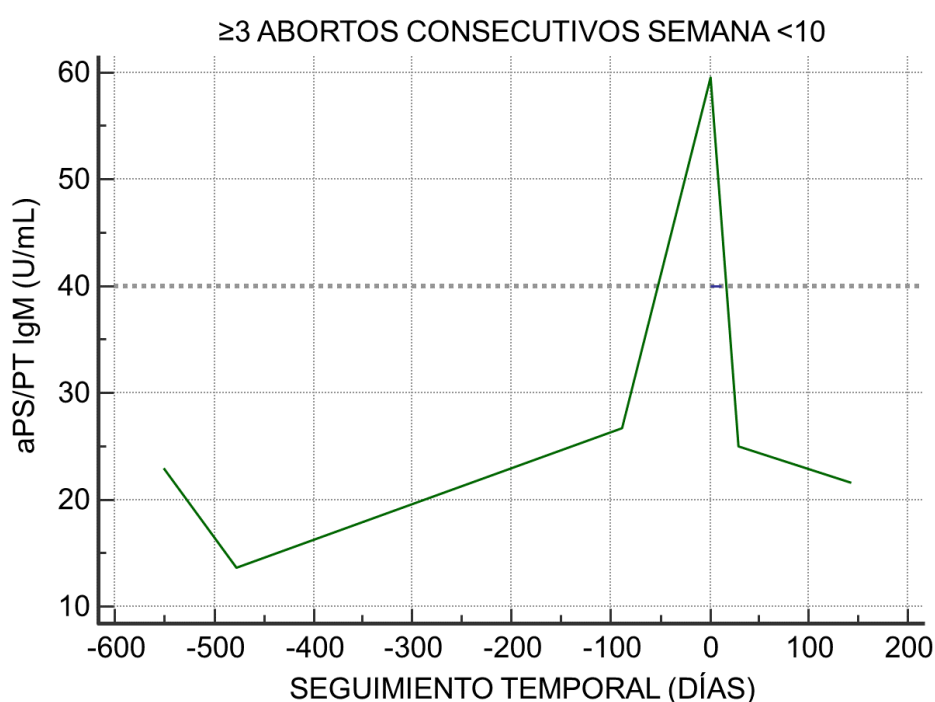
	PACIENTE 2	PACIENTE 3	PACIENTE 16
SEGUIMIENTO TEMPORAL (DÍAS)	572	299	203
PRIMER RESULTADO	64,7	70,9	48
ÚLTIMO RESULTADO	56,6	92,5	26,5
MÍNIMO	17,4	60,3	26,5
MÁXIMO	64,7	92,5	48
% SUPERIOR A PUNTO DE CORTE	61,7	100	39,8

□ **Tabla 10:** Evolución temporal de aPS/PT IgM en el grupo de fracaso de implantación recurrente.

En el grupo de dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación disponemos de datos de dos pacientes positivas para aPS/PT IgM, una con un seguimiento temporal de 693 días y otra de tan sólo 12 días.

	PACIENTE 4	PACIENTE 19
SEGUIMIENTO TEMPORAL (DÍAS)	12	693
PRIMER RESULTADO	40	22,9
ÚLTIMO RESULTADO	40	21,6
MÍNIMO	40	13,6
MÁXIMO	40	59,5
% SUPERIOR A PUNTO DE CORTE	100	100

□ **Tabla 11:** Evolución temporal de aPS/PT IgM en el grupo de ≥ 3 abortos anteriores a la semana 10 de gestación.

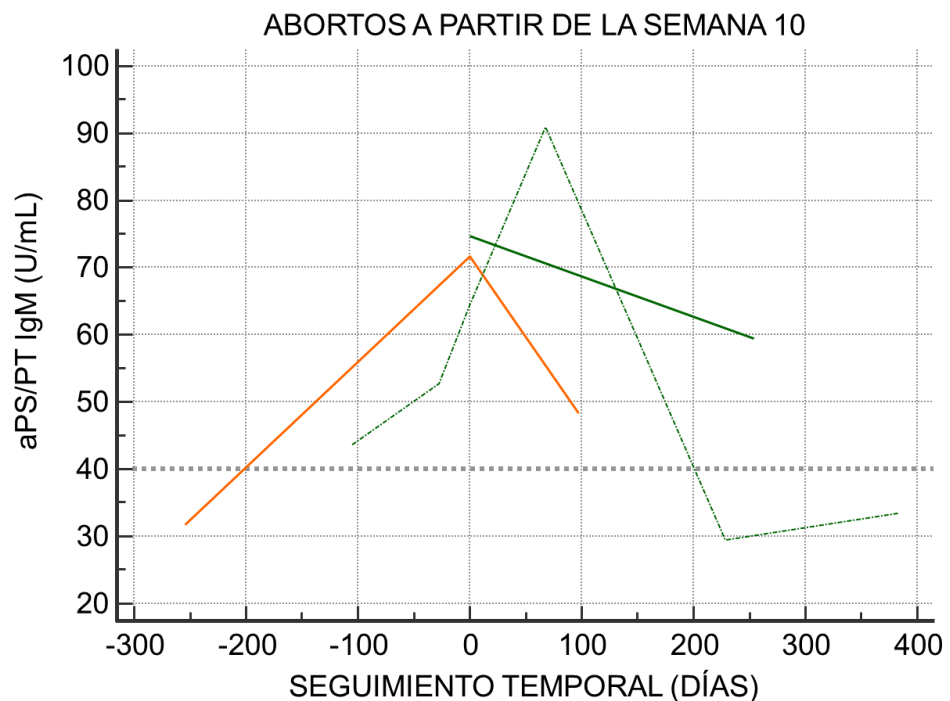


□ **Figura 27:** Evolución de los niveles de los aPS/PT IgM en pacientes con ≥ 3 abortos anteriores a la semana 10 y determinaciones posteriores.

	PACIENTE 6	PACIENTE 13	PACIENTE 14	PACIENTE 15	PACIENTE 20
SEGUIMIENTO TEMPORAL (DÍAS)		254	352	488	
PRIMER RESULTADO	65,1	74,8	31,8	43,6	53,3
ÚLTIMO RESULTADO	65,1	59,5	48,3	33,4	53,3
MÍNIMO	65,1	59,5	31,8	29,5	53,3
MÁXIMO	65,1	74,8	71,6	90,9	53,3
% SUPERIOR A PUNTO DE CORTE		100	100	100	

□ **Tabla 12:** *Evolución temporal de aPS/PT IgM en el grupo de ≥ 1 aborto desde la semana 10 de gestación.*

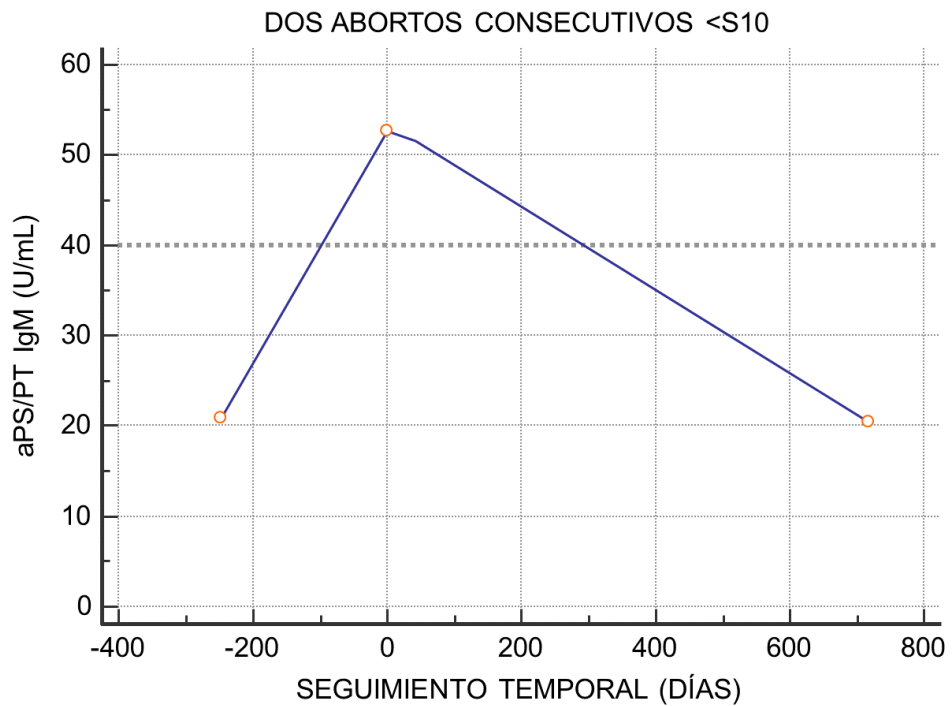
En el grupo de pacientes con abortos a partir de la semana 10 de gestación, encontramos 5 pacientes con resultados positivos en el primer estudio realizado, de las que disponemos de datos evolutivos en tres de ellas, manteniendo siempre valores por encima del punto de corte.



□ **Figura 28:** *Evolución de los niveles de los aPS/PT IgM en pacientes con ≥ 1 aborto a partir de la semana 10 y determinaciones posteriores.*

Por último, en el grupo de pacientes extraconsenso con dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 y sin otra causa que los explique, observamos una paciente en la que calculamos valores por encima del

punto de corte en el 40,6% del tiempo de seguimiento, con un valor mínimo de 20,5U/mL y un máximo de 52,7U/mL.



□ **Figura 29:** Evolución de los niveles de los aPS/PT IgM en pacientes con 2 abortos consecutivos anteriores a la semana 10 y determinaciones posteriores.

4.1.11. Análisis 4A. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para fracaso de implantación recurrente.

Para estudiar la posibilidad de asociación entre los aFL incluidos en los criterios de clasificación de SAF consensuados en Sídney con los grupos clínicos en comparación con los resultados de los controles sanos, se calculó el odds-ratio (OR) y el nivel de significación para cada uno de los grupos de

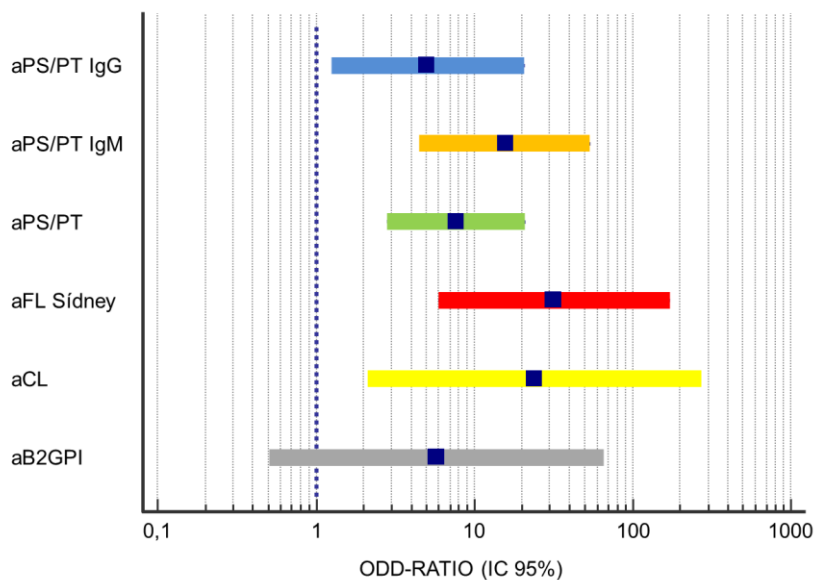
pacientes. En el caso del grupo de pacientes definido como fracaso de implantación recurrente, el estudio de aCL, aB2GPI y AL en global tuvo un resultado favorable para la necesidad de determinación de estos autoanticuerpos (OR: 31,87. IC 95%: 5,94-170,83. $p=0,001$). Si desglosamos el estudio por diferentes aFL, encontramos que los aCL (OR: 24,05. IC 95%: 2,12-272,15. $p=0,010$) mantienen la asociación, mientras que los aB2GPI carecen de significación (OR: 5,82. IC 95%: 0,51-65,88. $p=0,154$). No se pudo estudiar el riesgo atribuido a AL debido a la carencia de resultados para este aFL en el grupo de controles sanos.

Se realizó un análisis adicional por isotipos para aCL y aB2GPI, que mostró el interés de testar tanto IgG (OR: 23,37. IC 95%: 2,06-264,19. $p=0,010$) como IgM (OR: 36,08. IC 95%: 3,65-356,40. $p=0,002$).

4.1.12. Análisis 3A. Análisis univariante de los aPS/PT en fracaso de implantación recurrente.

El estudio de asociación entre la positividad de aPS/PT independientemente de su isotipo y las pacientes con fracaso de implantación recurrente mostró resultados significativos (OR: 7,73. IC 95%: 2,83-21,10. $p=0,001$). Por isotipos, tanto IgG (OR: 5,07. IC 95%: 1,25-20,53. $p=0,022$) como IgM (OR: 15,67. IC 95%: 4,52-54,27. $p<0,001$) mostraron también por separado asociación con el fenotipo clínico.

RESULTADO DE ANÁLISIS UNIVARIANTES PARA FRACASO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE



□ **Figura 30:** Odds-Ratios para fracaso de implantación recurrente en el análisis univariante para cada estudio de aFL.

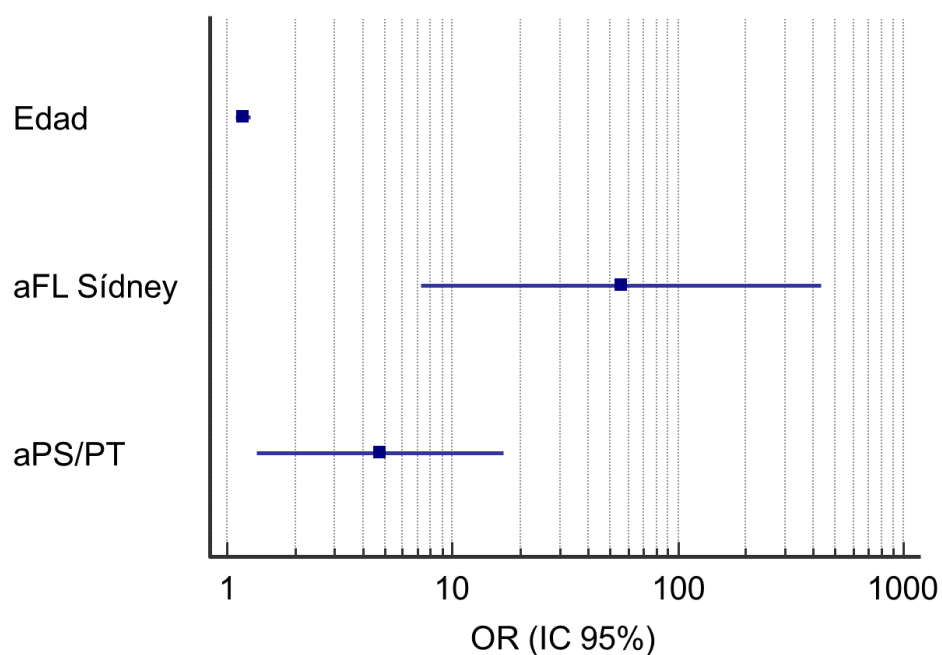
4.1.13. Análisis 4B. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en fracaso de implantación recurrente.

Se realizó un primer estudio multivariante mediante regresión logística en el que se agruparon los resultados de los aFL incluidos en los criterios de clasificación de Sídney sea cual fuere su isotipo e incluyendo AL para las pacientes; y definidos como positivos o negativos, como una variable y por otro, el resultado positivo o negativo de los aPS/PT IgG o IgM. Este cálculo determinó que tanto los aFL vigentes en el consenso actual (OR ajustado: 25,32. IC 95%: 4,45-143,89. p=0,001) y los aPS/PT (OR ajustado: 5,07. IC 95%: 1,61-15,96. p=0,005) muestran asociación con el fenotipo clínico de

fracaso de implantación recurrente, con un área bajo la curva (AUC) de 0,606 (IC 95%: 0,559-0,652) y un nivel de significación del modelo $p < 0,001$.

Posteriormente, se procedió a repetir el estudio añadiendo la contribución de la edad, dada su relación negativa con la reserva y la calidad ováricas y la mayor probabilidad de encontrar autoinmunidad en personas con más edad. El resultado del estudio de regresión logística multivariante incluyendo la variable categórica positividad o no para alguno de los aFL incluidos en los criterios de Sídney, positividad o no para aPS/PT de isotipo IgG o IgM y la edad en años fue un modelo en el que las tres variables descritas obtuvieron resultados significativos: incrementos de un año en edad (OR: 1,17. IC 95%: 1,09-1,26. $p < 0,001$), aFL (OR: 55,66. IC 95%: 7,22-428,56. $p = 0,001$) y aPS/PT (OR: 4,77. IC 95%: 1,34-16,87. $p = 0,015$).

Dado que el anterior estudio podría incluir un sesgo al no haberse podido determinar la presencia o no de anticoagulante lúpico en los controles sanos, se procedió a repetir el cálculo del estudio multivariante mediante regresión logística sin la contribución de este aFL, obteniendo resultados similares con las tres variables obteniendo una contribución para el fenotipo estadísticamente significativa: Edad (OR: 1,17. IC 95%: 1,09-1,25. $p < 0,001$), aCL y aB2GPI (OR: 38,92. IC 95%: 4,08-370,83. $p = 0,015$) como para aPS/PT (OR: 7,22. IC 95%: 2,29-22,77. $p < 0,001$).



□ **Figura 31:** Diagrama de Forest para fracaso de implantación recurrente en el análisis multivariante incluyendo aPS/PT, aFL incluidos en Sídney y la edad.

4.1.14. Análisis 4C. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para pacientes con tres o más abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación.

Los aFL incluidos en los criterios clasificación no alcanzaron una asociación estadísticamente significativa con el fenotipo clínico de tres o más abortos antes de la semana 10 de gestación (OR: 3,77. IC 95%: 0,33-42,36. $p=0,281$). Se calculó la misma asociación para cada uno de los aFL incluidos en esta variable por separado, resultando en ausencia de significación los aCL (OR: 7,71. IC 95%: 0,47-125,21. $p=0,150$) y los aB2GPI (OR: 3,84. IC 95%: 0,34-

43,17. $p=0,274$). La asociación univariante entre AL y este grupo de pacientes no pudo ser calculada debido a la ausencia de resultados del grupo control, en las que esta determinación no pudo realizarse. Por isotipos, la combinación de aCL IgG y aB2GPI IgG (OR: 7,57. IC 95%: 0,46-122,86. $p=0,154$) no mostró una asociación significativa. En cambio, la combinación de aCL IgM y aB2GPI IgM (OR: 15,43. IC 95%: 1,37-173,13. $p=0,026$) sí mostró asociación como factor de riesgo para el fenotipo.

4.1.15. Análisis 3B. Análisis univariante de los aPS/PT en mujeres con tres o más abortos consecutivos antes de la semana 10 de gestación.

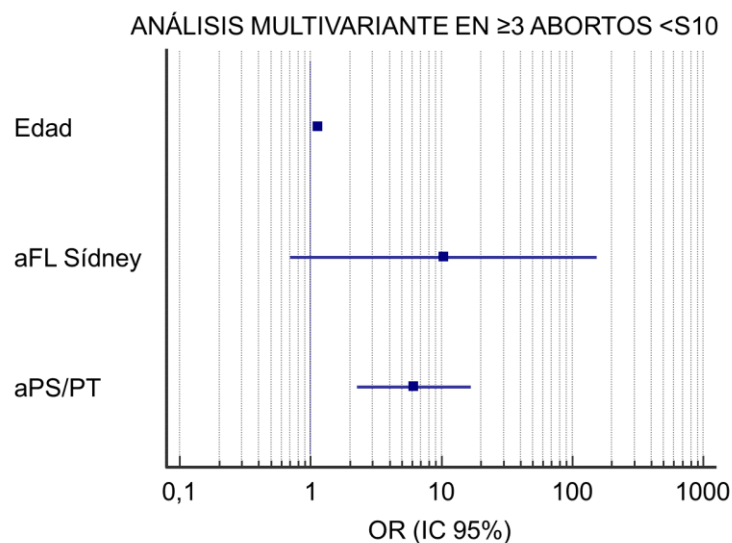
Los resultados de la determinación de aPS/PT, independientemente de su isotipo mostraron asociación con el fenotipo de tres o más abortos consecutivos antes de la semana 10 de gestación (OR: 6,48. IC 95%: 2,59-16,22. $p=0,001$). Por isotipos, tanto IgG (OR: 4,51. IC 95%: 1,27-15,95. $p=0,019$) como IgM (OR: 8,10. IC 95%: 2,26-28,95. $p=0,001$) obtuvieron asociación significativa con el fenotipo clínico.

4.1.16. Análisis 4D. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en el grupo de pacientes con tres o más abortos consecutivos ocurridos antes de la semana 10 de gestación.

En el estudio de regresión logística multivariante calculado con la positividad o negatividad para los aPS/PT y los aFL incluidos en los criterios

de clasificación de SAF, los aPS/PT sí mostraron una contribución significativa como factor de riesgo (OR ajustado: 6,60. IC 95%: 2,63-16,52. $p=0,001$), asociación que no fue alcanzada por la variable que incluía la positividad o negatividad de aCL, aB2GPI y AL, con un AUC del modelo de 0,574 (IC 95%: 0,528-0,619. $p=0,001$). Dado que no se pudo determinar AL en los controles sanos, se volvió a realizar el cálculo excluyendo a estos aFL, con resultados idénticos para aPS/PT (OR: 6,60. IC 95%: 2,63-16,52. $p=0,001$) y similares para los aFL incluidos en el consenso vigente (OR: 4,40. IC 95%: 0,39-49,49. $p=0,230$).

Posteriormente se calculó un nuevo estudio de regresión logística multivariante similar incluyendo la edad en el que se observó una contribución significativa para edad (OR: 1,15. IC 95%: 1,08-1,21. $p<0,001$) y para aPS/PT (OR: 6,17. IC 95%: 2,27-16,78. $p=0,001$), mientras que la variable que incluía a los aFL contemplados en el último consenso de Sídney no obtuvo significación (OR: 10,43. IC 95%: 0,70-153,53. $p=0,087$).



□ **Figura 32:** *Diagrama de Forest ≥ 3 abortos consecutivos anteriores a la semana 10 en el análisis multivariante incluyendo aPS/PT, aFL incluidos en Sídney y la edad.*

4.1.17. Análisis 4E. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para pérdidas fetales, con uno o más abortos ocurridos en la semana 10 de gestación o en adelante.

En el grupo de pacientes con pérdidas fetales, los aFL incluidos en el consenso vigente de SAF obtuvieron una asociación significativa como factor de riesgo en el análisis univariante (OR: 23,53. IC 95%: 3,76-147,12. $p=0,001$). Estos resultados fueron idénticos al análisis univariante contemplando únicamente aCL y aB2GPI. Por isotipos, la combinación de aCL IgG y aB2GPI IgG obtuvo también una asociación significativa como factor de riesgo (OR: 30,29. IC 95%: 2,66-344,78. $p=0,006$), así como IgM, con idénticos resultados.

4.1.18. Análisis 3C. Análisis univariante de los aPS/PT para pérdidas fetales, con uno o más abortos ocurridos en la semana 10 de gestación o en adelante.

El análisis univariante de la contribución de aPS/PT en este grupo de pacientes resultó en una asociación significativa como factor de riesgo (OR: 6,90. IC 95%: 2,25-21,21. $p=0,001$). Por isotipos, el único que mostró

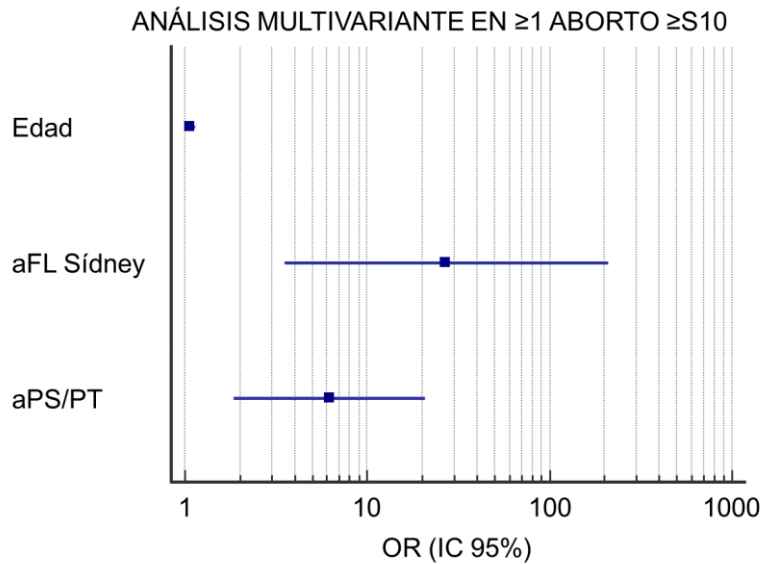
asociación fue IgM (OR: 16,87. IC 95%: 4,57-62,30. $p < 0,001$), dado que los IgG no alcanzaron significación (OR: 0,91. IC 95%: 0,05-16,35. $p = 0,950$).

4.1.19. Análisis 4F. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en pérdidas fetales, con uno o más abortos desde la semana 10 de gestación en adelante.

En el estudio de regresión logística que incluye a los aFL del consenso de Sídney y los aPS/PT, ambas variables obtuvieron la significación estadística para ser considerados factor de riesgo en este grupo de pacientes. Los aFL incluidos en los criterios vigentes alcanzaron mayor peso (OR: 20,48. IC 95%: 3,03-138,10. $p = 0,001$) que los aPS/PT (OR: 6,28. IC 95%: 1,93-20,43. $p = 0,002$), con un AUC de 0,605 (IC 95%: 0,557-0,651. $p = 0,001$) Dado que los controles sanos no fueron testados para AL, se recalculó el análisis incluyendo únicamente aCL y aB2GPI como una variable y aPS/PT como otra. Este cálculo dio resultados idénticos al anterior, dada la ausencia de positividad para AL en este grupo de pacientes.

En el estudio realizado incluyendo a la edad, todas las variables testadas se asociaron con una contribución significativa para este fenotipo clínico, con los aFL incluidos en el último consenso como la variable con OR más alto (OR: 27,02. IC 95%: 3,50-208,22. $p = 0,001$), seguida de aPS/PT (OR: 6,18. IC 95%: 1,83-20,82. $p = 0,003$) y la edad (OR: 1,06. IC 95%: 1-1,13. $p = 0,046$). Para esta última variable, el incremento de riesgo se refiere para aumentos de una unidad en su valor, al contrario que los aFL contemplados en el

consenso de Sídney y los aPS/PT, siendo éstas variables cualitativas que muestran la positividad o no de la determinación de los anticuerpos que engloban.



□ **Figura 33:** Diagrama de Forest ≥ 1 aborto a partir de la semana 10 en el análisis multivariante incluyendo aPS/PT, aFL incluidos en Sídney y la edad.

4.1.20. Análisis 4G. Análisis univariante de los aFL incluidos en los criterios de clasificación para dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.

El estudio de asociación univariante entre los aFL incluidos en el consenso vigente y el grupo de pacientes con dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 de gestación, no arrojó resultados significativos (OR: 6,58. IC 95%: 0,58-74,60. $p=0,128$). Por separado ni aCL (OR: 13,19. IC 95%: 0,80-216,05. $p=0,070$) ni aB2GPI (OR: 2,51. IC 95%: 0,11-53,47. $p=0,554$) no resultaron tampoco en una asociación estadísticamente significativa. Por isotipos, ni la combinación de aCL IgG y aB2GPI IgG (OR: 4,20. IC 95%: 0,16-

105,17. $p=0,382$) ni la de aCL IgM y aB2GPI IgM (OR: 13,19. IC 95%: 0,80-216,05. $p=0,070$) dieron resultado a una asociación significativa.

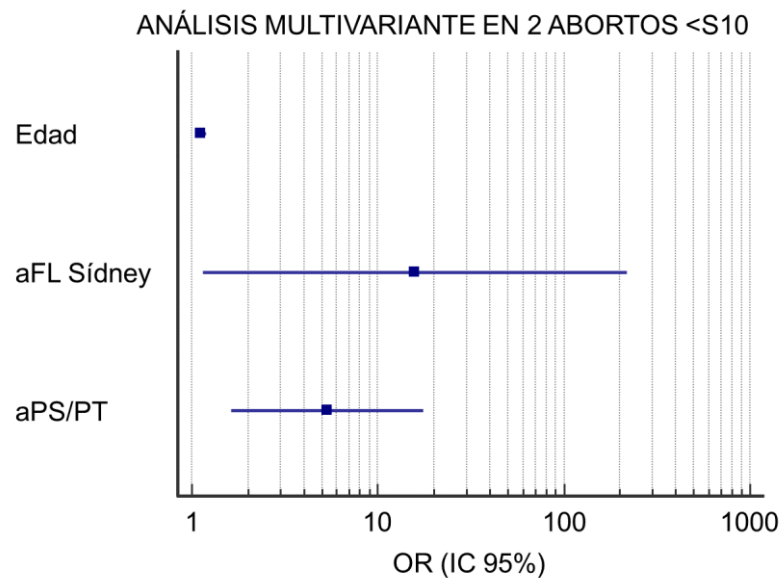
4.1.21. Análisis 3D. Análisis univariante de los aPS/PT para dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.

El análisis univariante entre la presencia o ausencia de aPS/PT y este fenotipo clínico arrojó una asociación significativa (OR: 6,14. IC 95%: 2,01-18,70. $p=0,001$). Por isotipos, sólo IgG (OR: 8,22. IC 95%: 2,27-29,78. $p=0,001$) mostró resultados significativos como factor de riesgo, no alcanzándolos el isotipo IgM (OR: 2,61. IC 95%: 0,29-23,06. $p=0,387$).

4.1.22. Análisis 4H. Análisis Multivariante de aFL incluidos en los criterios de clasificación y los aPS/PT en dos abortos consecutivos ocurridos con anterioridad a la semana 10 de gestación.

El estudio de regresión logística incluyendo los aFL del consenso vigente y los aPS/PT resultó en una asociación significativa para aPS/PT (OR ajustado: 6,34. IC 95%: 2,07-19,37. $p=0,001$), mientras que los aFL contemplados en Sídney (OR ajustado: 7,61. IC 95%: 0,66-86,76. $p=0,102$) no obtuvieron tal significación. El cálculo excluyendo AL obtuvo idénticos resultados, al no encontrar positividad para AL en ninguna de las pacientes de este grupo.

Al repetir este estudio considerando la variable edad y definiendo el riesgo que aporta como los asociados al incremento en una unidad en su valor, todas las variables estudiadas resultaron en una contribución estadísticamente significativa para el fenotipo clínico: edad (OR: 1,12. IC 95%: 1,05-1,19. p=0,001), aFL del consenso de Sídney (OR: 15,86. IC 95%: 1,15-217,44. p=0,038) y aPS/PT (OR: 5,32. IC 95%: 1,62-17,48. p=0,005).



□ **Figura 34:** Diagrama de Forest para dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 en el análisis multivariante incluyendo aPS/PT, aFL incluidos en Sídney y la edad.

4.1.23. Análisis 4I. Prevalencia y análisis univariante de las alteraciones tiroideas y multivariante en conjunto con los aFL estudiados.

Las alteraciones tiroideas, definidas como autoinmunidad con hipotiroidismo, sólo autoinmunidad o sólo hipotiroidismo con TSH superior a 2,50, no obtuvieron resultados significativos como factor de riesgo ni en los análisis univariantes ni multivariantes en cada uno de los grupos de

pacientes. En cambio, cuando los aPS/PT fueron comparados con los aFL clásicos y cada una de las alteraciones tiroideas, en todos los casos los aPS/PT resultaron en un factor de riesgo significativo para la forma de fracaso reproductivo recurrente definida en cada grupo de pacientes.

Dado que es práctica habitual considerar alteraciones en la función tiroidea en pacientes con fracaso de implantación recurrente o abortos, se indagó en los datos disponibles y se calculó la prevalencia de autoinmunidad tiroidea (definida como positividad para anti-tiroglobulina (aTG) y/o anti-peroxidasa tiroidea (aTPO)) con hipotiroidismo con TSH definida como mayor a 2,50 en cada uno de los grupos. Sólo se obtuvieron resultados positivos en el grupo de controles sanos (3 controles de 194 con resultados disponibles, 1,5%) y en el grupo de 3 o más abortos antes de la semana 10 (3 pacientes de 29 con resultados disponibles, 10,3%).

Se realizó análisis univariante para la definición de autoinmunidad tiroidea con hipotiroidismo expuesta anteriormente, para cada uno de los grupos clínicos. No se obtuvieron resultados significativos en fracaso de implantación (OR: 0,16. IC 95%: 0,01-2,78. $p=0,210$), en el grupo de 3 o más abortos anteriores a la semana 10 (OR: 1,06. IC 95%: 0,29-3,84. $p=0,926$), en pérdidas fetales (OR: 0,25. IC 95%: 0,01-4,44. $p=0,350$), ni en el grupo de dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 (OR: 0,24. IC 95%: 0,01-4,19. $p=0,330$).

Se realizó de un estudio multivariante mediante regresión logística con las variables aPS/PT y los aFL incluidos en los criterios de Sídney en la forma descrita anteriormente, junto a la variable definida como autoinmunidad tiroidea y TSH mayor a 2,50 para cada uno de los grupos de pacientes. Para fracaso de implantación recurrente, este cálculo arrojó una ausencia de asociación para la variable de autoinmunidad tiroidea con hipotiroidismo ($p=0,997$), mientras que tanto los aFL incluidos en el último consenso (OR ajustado: 14,93. IC 95%: 1,35-165,10. $p=0,027$) como los aPS/PT (OR ajustado: 6,63. IC 95%: 1,81-24,22. $p=0,004$) sí mostraron asociación con fracaso de implantación recurrente. En el grupo de tres o más abortos consecutivos anteriores a la semana 10, el análisis multivariante resultó en una ausencia de significación para los aFL incluidos en los criterios de clasificación (OR ajustado: 0,00. IC 95%: -. $p=0,998$) y para la alteración tiroidea con autoinmunidad y TSH mayor a 2,50 (OR ajustado: 1,05. IC 95%: 0,28-3,90. $p=0,933$), mientras que los aPS/PT sí mostraron asociación con el fenotipo (OR ajustado: 4,98. IC 95%: 1,31-18,89. $p=0,018$). En el grupo de pacientes con abortos posteriores a la semana 10 (pérdidas fetales) el resultado fue similar al del grupo previo, con una asociación significativa para aPS/PT (OR ajustado: 4,81. IC 95%: 1,79-31,60. $p=0,005$) y ausencia de asociación para los aFL incluidos en los criterios (OR ajustado: 4,81. IC 95%: 0,19-120,01. $p=0,338$) y para autoinmunidad tiroidea con hipotiroidismo (OR ajustado: 0,01. IC 95%: -. $p=0,998$). De igual forma, para las pacientes con sólo dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10, el estudio multivariante sólo mostró asociación para aPS/PT (OR ajustado: 8,00. IC

95%: 2,01-31,72. $p=0,003$), mientras que los aFL incluidos en los criterios de clasificación (OR ajustado: 0,00. IC 95%: -. $p=0,996$) y la autoinmunidad tiroidea con TSH mayor a 2,50 (OR ajustado: 0,00. IC 95%: -. $p=0,998$) no resultaron en asociación con el fenotipo.

Dado que la prevalencia de las dos condiciones relativas a la función tiroidea calculadas anteriormente tuvo una prevalencia baja tanto en el grupo de controles sanos como en los de pacientes, se exploró la posibilidad de que la presencia de anticuerpos aTG y/o aTPO mostraran una mejor asociación con el fracaso de implantación recurrente.

Por ello, se calculó la prevalencia de autoinmunidad tiroidea en cada uno de los grupos: controles sanos (36 positivos de 196 controles con resultados disponibles, 18,3%), fracaso de implantación recurrente (10 de 28 disponibles, 10,7%), tres o más abortos antes de la semana 10 (12 positivos de 44 disponibles, 27,2%), pérdidas fetales (3 positivos de 21 con resultados, 14,2%) y de dos abortos consecutivos antes de la semana 10 (6 positivos de 27 disponibles, 22,2%) y se observó un resultado similar o superior a al encontrado para los aPS/PT y/o los aFL incluidos en el último consenso.

El análisis univariante de la autoinmunidad tiroidea definida como presencia o no de aTG y/o aTPO mostró una ausencia de asociación para fracaso de implantación recurrente (OR: 0,53. IC 95%: 0,15-1,86. $p=0,324$),

para tres o más abortos recurrentes anteriores a la semana 10 (OR: 1,66. IC 95%: 0,78-3,54. $p=0,185$), para pérdidas fetales (OR: 0,74. IC 95%: 0,20-2,64. $p=0,644$) y para dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 (OR: 1,26. IC 95%: 0,47-3,37. $p=0,631$).

El estudio de regresión logística multivariante con estas tres variables confirmó la asociación de aPS/PT (OR ajustado: 11,23. IC 95%: 3,40-37. $p=0,001$) y aFL incluidos en los criterios (OR ajustado: 18,67. IC 95%: 1,60-217,03. $p=0,019$) con fracaso de implantación recurrente, mientras que la autoinmunidad tiroidea no resultó en una asociación estadísticamente significativa (OR ajustado: 0,67. IC 95%: 0,18-2,46. $p=0,548$), con una muestra total de 224 mujeres, 28 con resultados positivos (12,5%) y 196 negativas (87,5%). En el grupo de pacientes con tres o más abortos anteriores a la semana 10 la única variable significativa en el estudio de regresión logística incluyendo autoinmunidad tiroidea (OR ajustado: 0,63. IC 95%: 0,86-4,13. $p=0,112$), aFL del último consenso (OR ajustado: 1,83. IC 95%: 0,38-103,96. $p=0,198$) y aPS/PT fue esta última (OR ajustado: 7,70. IC 95%: 2,48-23,88. $p=0,001$). En pérdidas fetales este mismo estudio reveló la asociación de aPS/PT (OR ajustado: 6,24. IC 95%: 1,48-26,21. $p=0,012$), pero también de los aFL del criterio de Sídney (OR ajustado: 14,65. IC 95%: 1,08-196,24. $p=0,043$), mientras que la autoinmunidad tiroidea obtuvo un resultado como factor protector pero no significativo (OR ajustado: 0,88. IC 95%: 0,23-3,25. $p=0,851$). Para dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10, aPS/PT fue la única variable que mostró asociación (OR

ajustado: 7,48. IC 95%: 2,08-26,83. $p=0,002$), con resultados no significativos para los aFL del consenso (OR ajustado: 0. IC 95%: -. $p=0,998$) y para la variable compuesta por anti-TG y/o anti-TPO (OR ajustado: 1,42. IC 95%: 0,52-3,89. $p=0,486$).

Por último, se realizaron estudios similares en prevalencia, riesgo asociado univariante y regresión logística multivariante analizando la posible contribución de una alteración tiroidea definida como TSH mayor a 2,50, sin tener en cuenta la presencia o no de autoinmunidad específica frente a esta glándula.

La prevalencia de esta condición fue en el grupo de controles sanos (108 casos positivos de 194 con resultados de TSH disponibles) de 55,6%; en el fracaso de implantación recurrente (7 casos de 34) de 20,5%; en el grupo de tres o más abortos antes de la semana 10 (12 casos de 39) de 30,7%; en el de pérdidas fetales (13 casos de 24 con resultados disponibles) de 54,1% y en el de dos abortos consecutivos antes de la semana 10 (6 casos de 22) de 27,2%.

El análisis univariante para la TSH superior a 2,50 resultó en una asociación protectora y significativa para fracaso de implantación recurrente (OR: 0,20. IC 95%: 0,08-0,49. $p=0,001$), para tres o más abortos anteriores a la semana 10 (OR: 0,35. IC 95%: 0,16-0,73. $p=0,005$), para dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 (OR: 0,28. IC 95%: 0,11-0,79.

p=0,015), aunque no para pérdidas fetales (OR: 0,94. IC 95%: 0,40-2,20. p=0,888).

El estudio multivariante confirmó la asociación con el fenotipo de fracaso de implantación recurrente de aPS/PT (OR ajustado: 7,20. IC 95%: 1,75-29,65. p=0,006) como factor de riesgo y de hipotiroidismo definido como TSH superior a 2,50 (OR ajustado: 0,19. IC 95%: 0,07-0,50. p=0,001) como factor protector. No obstante, en el cálculo de regresión logística con estas condiciones, los aFL incluidos en los últimos criterios de clasificación no obtuvieron una asociación estadísticamente significativa (OR ajustado: 12,34. IC 95%: 0,83-182,52. p=0,067). Para 3 o más abortos anteriores a la semana 10, tanto aPS/PT (OR ajustado: 7,88. IC 95%: 2,20-28,18. p=0,001) como TSH mayor a 2,50 (OR ajustado: 0,30. IC 95%: 0,13-0,65. p=0,002), obtuvieron una asociación significativa, los primeros como factor de riesgo y el último como factor protector, mientras que los aFL de los criterios de Sídney no obtuvieron asociación (OR ajustado: 0. IC 95%: -. p=0,998). Para pérdidas fetales la única variable de las contempladas en este cálculo que resultó en una asociación significativa fue aPS/PT (OR ajustado: 7,25. IC 95%: 1,92-27,39. p=0,003), con TSH mayor a 2,50 (OR ajustado: 0,97. IC 95%: 0,39-2,41. p=0,961) y los aFL del criterio de Sídney (OR ajustado: 12,88. IC 95%: 0,94-176,62. p=0,055) sin significación. Por último, para el grupo de dos abortos consecutivos antes de la semana 10, tanto aPS/PT (OR ajustado: 7,52. IC 95%: 1,81-31,12. p=0,005) como TSH mayor a 2,50 (OR ajustado: 0,28. IC 95%: 0,10-0,79. p=0,015) mostraron asociación con el

fenotipo, mientras que los aFL incluidos en los criterios de Sídney no (OR ajustado: 0. IC 95%: -. p=0,998).

4.1.24. Análisis 5. Resultado de las intervenciones terapéuticas realizadas en virtud de los resultados analíticos obtenidos.

En 114 pacientes pudimos observar la evolución clínica tras la valoración en nuestra consulta. Entre ellas, 72 recibieron tratamiento con HBPM (enoxaparina 40-60mg o tinzaparina 4500U) y/o AAS en dosis bajas (Adiro 100mg) con o sin agregación de hidroxicloroquina 200-400mg según se hubiera utilizado o no previamente una pauta basada en heparina y AAS. Las 42 pacientes restantes no realizaron tratamientos habitualmente utilizados en el SAF o ninguno en general. Entre las pacientes que resultaron positivas para alguno de los aFL incluidos en este estudio, disponemos de datos acerca del seguimiento en 26 (81,2%) de 32. En las seis pacientes restantes no se pudo realizar un adecuado seguimiento debido a incomparecencia en las consultas sucesivas y/o ausencia de datos sobre la evolución en la historia clínica.

El esquema de tratamiento más comúnmente utilizado en pacientes con aFL positivos fue HBPM, AAS e hidroxicloroquina (10 pacientes, 38,4%). Menos frecuentemente utilizada fue la pauta consistente en sólo heparina y Adiro (8 pacientes, 30,7%). Una paciente recibió únicamente heparina,

otra únicamente Adiro y 6 pacientes con aFL positivos no recibieron tratamiento. En general, las pacientes portadoras de aFL y que recibieron cualquier tipo de tratamiento, tuvieron un resultado favorable con respecto a las no tratadas (OR: 0,04. IC 95%: 0,01-0,42. p=0,007). El efecto beneficioso del tratamiento obtenido también fue encontrado al analizar la evolución de las pacientes portadoras de aPS/PT (OR: 0,02. IC 95%: 0,01-0,44. p=0,013).

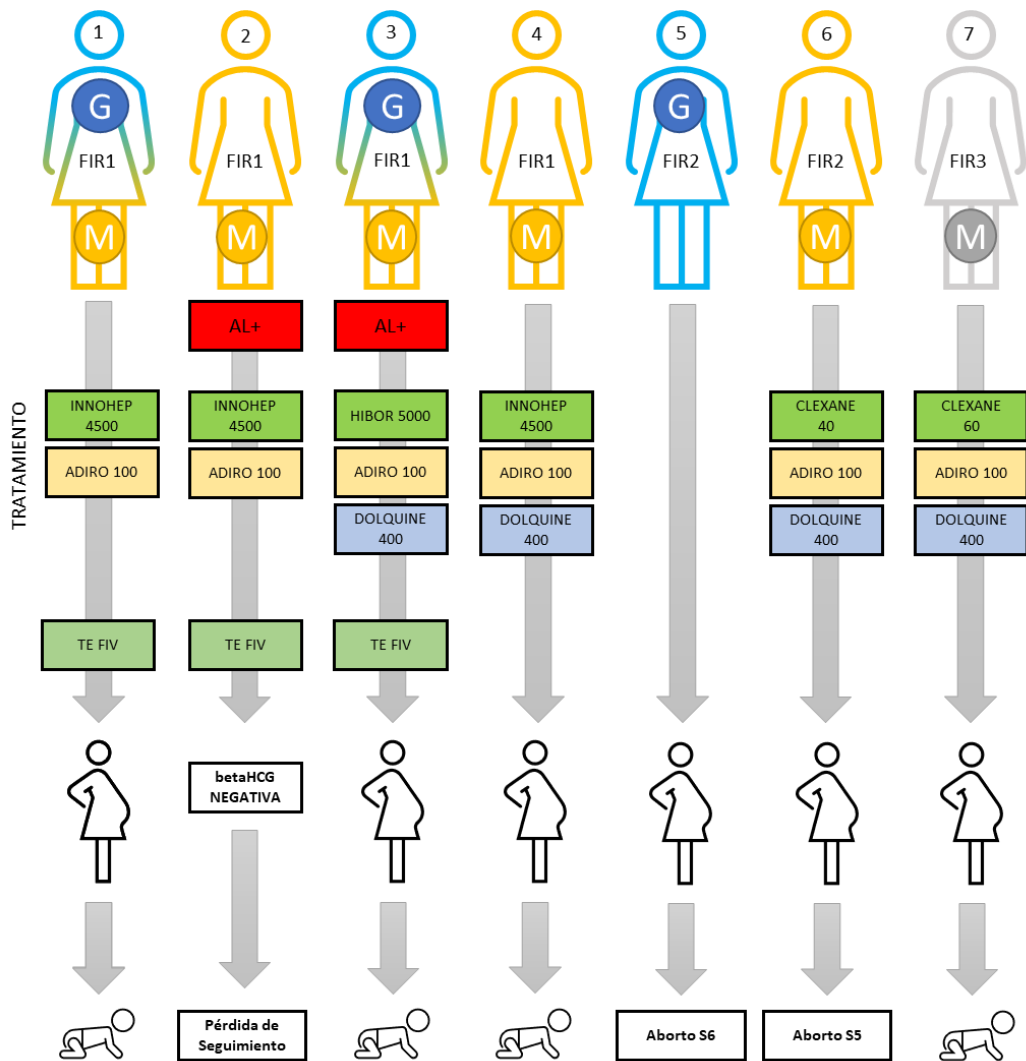
El análisis pormenorizado del beneficio del tratamiento en los diferentes grupos de pacientes no resultó en diferencias significativas, probablemente como consecuencia de la reducción de casos que cumplieran los criterios de positividad para aFL, prescripción de tratamiento y suficientes datos para valorar el efecto de las intervenciones.

Parámetro Estudiado	Paciente FIR 1	Paciente FIR 2	Paciente FIR 3	Paciente FIR 4	Paciente FIR 5	Paciente FIR 6
Clasificación Clínica	FIR Primario	FIR Primario	FIR Primario	FIR Primario	FIR Secundario	FIR Secundario
aCL IgG (UI/mL)	1,6	1,6	1,6	4,16	1,6	1,6
aCL IgM (UI/mL)	3,5	11,6	0,8	4,34	2,4	9
aPS/PT IgG (UI/mL)	48,3	11,4	34,5	8,65	41	26
aPS/PT IgM (UI/mL)	64,7	60,3	92	44,2	16,5	48
aB2GPI IgG (UI/mL)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
aB2GPI IgM (UI/mL)	3,6	12,6	0,3	2,1	2,6	6,9
Ratio AL (SCT)	1,1	1,32	1,22	0,82	1,04	1,25
Ratio AL (dRVVT)	0,96	1,38	1,98	0,82	0,91	0,89
Transferencias Embrionarias FIV previas	3	4	3	4	4	9
Nº de embriones transferidos	5	7	5	4	7	16
Días de cultivo medio de los embriones transferidos	2	2	3	6	2	3

□ **Tabla 13:** *Características clínicas y analíticas de las pacientes positivas para aPS/PT y con seguimiento evolutivo.*

En el grupo de fracaso de implantación recurrente se obtuvieron datos evolutivos de 7 de 9 pacientes con aFL positivos (77,7%), siendo 6 de ellas positivas para aPS/PT (dos doblemente positivas para aPS/PT y AL) y una para aCL IgM. Los datos clínicos y analíticos previos de las pacientes positivas para aPS/PT se recogen en la Tabla 13. De los 7 casos con datos y aFL positivos, seis pacientes recibieron tratamiento y una no. La paciente que no recibió tratamiento quedó embarazada sin que consten transferencias embrionarias realizadas pero tuvo un aborto en semana 6.

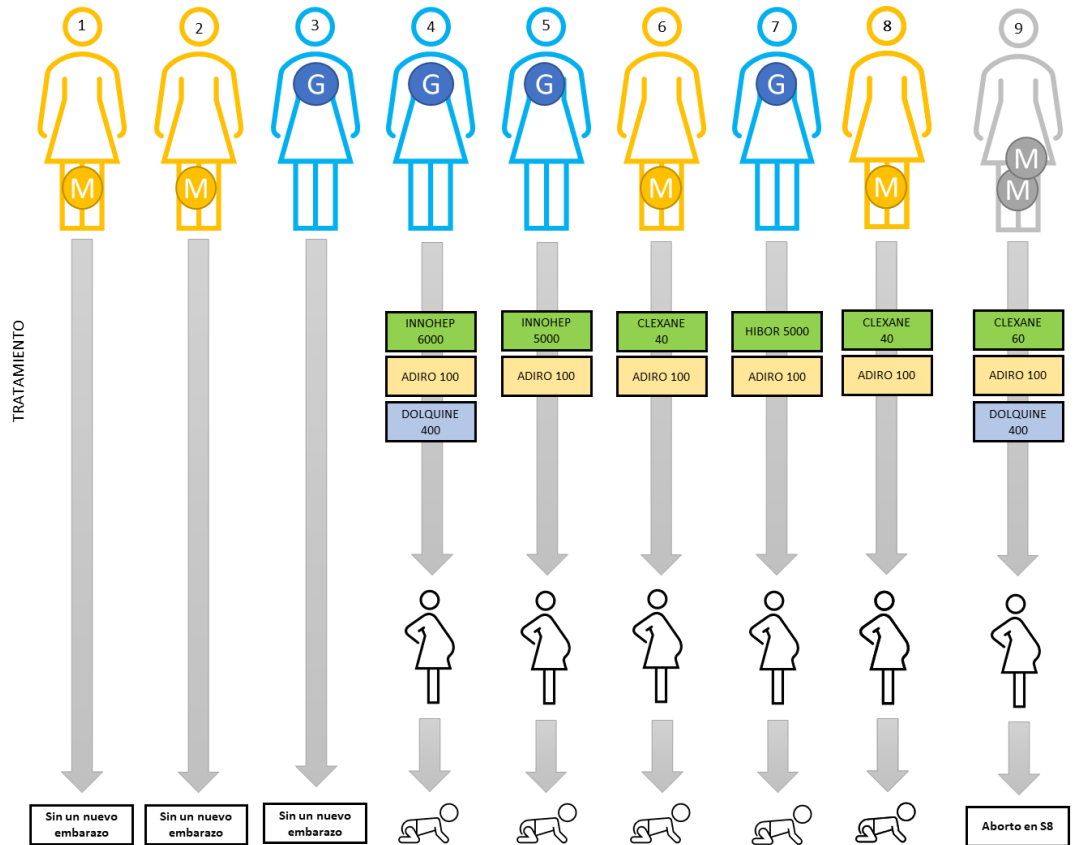
Como puede observarse en la ilustración correspondiente a la figura 35, entre las que sí fue pautado tratamiento, cuatro (66,6%) obtuvieron embarazo y un recién nacido vivo y dos persistieron con ausencia de una gestación exitosa, una con un aborto en semana 5 y otra con ausencia de embarazo. El efecto de la intervención terapéutica comparado con la abstención quedó diluido por el bajo número de casos (OR: 0,18. IC 95%: 0,01-6,47. $p=0,352$) en pacientes portadoras de cualquier aFL. En pacientes positivas para aPS/PT tampoco obtuvimos un resultado significativo (OR: 0,23. IC 95%: 0,01-8,61. $p=0,433$).



□ **Figura 35:** Características clínicas y analíticas de las pacientes positivas para aPS/PT y con seguimiento evolutivo. El color azul en los iconos de mujeres identifica a pacientes portadoras de aPS/PT IgG y el naranja a aPS/PT IgM. La última paciente (extremo derecho) no resultó portadora de aPS/PT sino de aCL IgM. FIR1 se refiere a fracaso de implantación primario y FIR2 a fracaso de implantación secundario, es decir, cuando se diagnostica esta entidad tras algún embarazo previo. La situación de embarazo se representa con un icono de una mujer embarazada y el de recién nacido vivo con el icono de un bebé en posición de gateo.

Como se puede observar en la figura 36, en las 9 pacientes portadoras de aFL con tres o más abortos consecutivos antes de la semana 10 de gestación y suficientes datos evolutivos, 8 fueron positivas para aPS/PT (88,8%) y una para aCL IgM y aB2GPI IgM. Seis recibieron tratamiento y 3 no, obteniendo

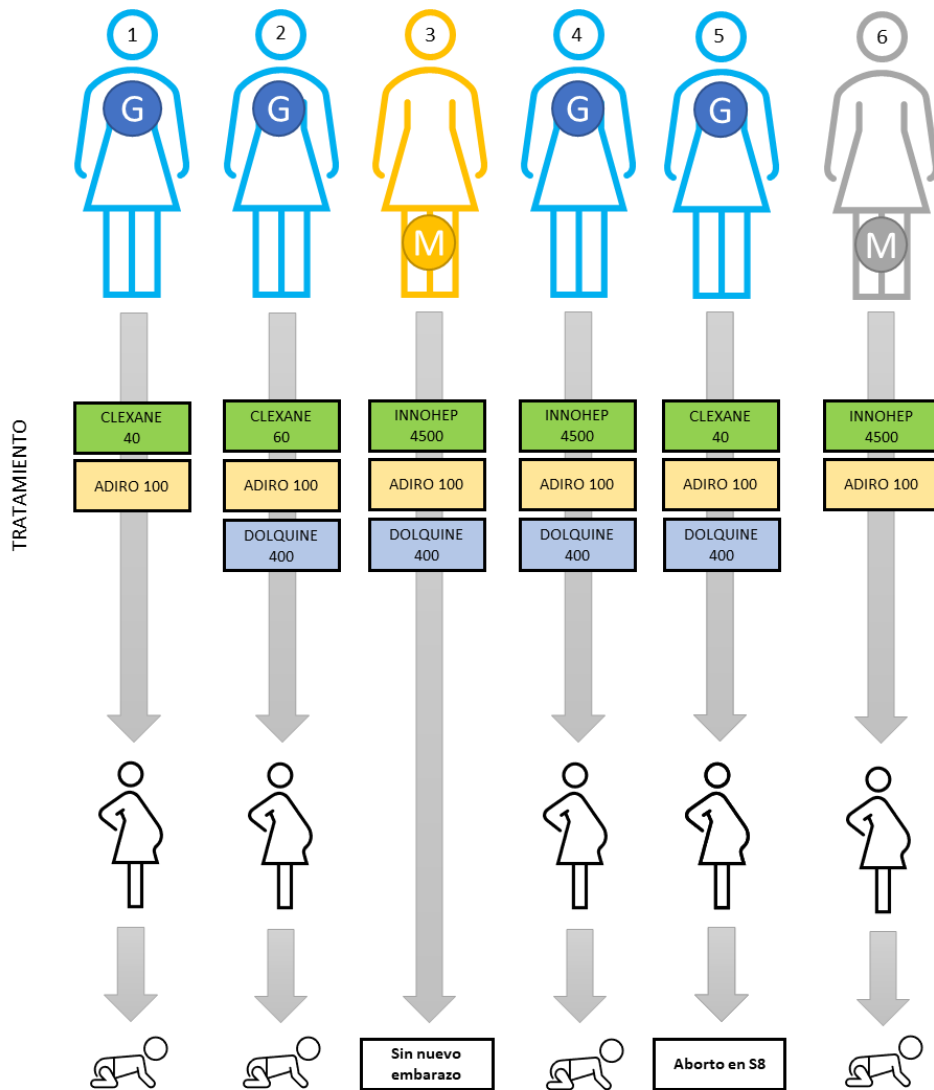
un resultado beneficioso de las intervenciones 5 (83,3%) de las 6 pacientes tratadas. Ninguna de las 3 pacientes sin prescripción de tratamiento registró un siguiente embarazo.



□ **Figura 36:** Características clínicas y analíticas de las pacientes positivas para aPS/PT y otros aFL con seguimiento evolutivo en el grupo de pacientes con antecedentes de tres o más abortos anteriores a la semana 10 de gestación. El color azul en los iconos de mujeres identifica a pacientes portadoras de aPS/PT IgG y el naranja a aPS/PT IgM. La última paciente (extremo derecho) no resultó portadora de aPS/PT sino doblemente positiva para aCL IgM y aB2GPI IgM.

En este grupo de mujeres con antecedentes de tres o más abortos anteriores a la semana 10, la intervención terapéutica comparada con la abstención resultó en un beneficio clínico con diferencias estadísticamente significativas para pacientes portadoras de aPS/PT (OR: 0,01. IC 95%: 0,01-0,81.p=0,039) y ligeramente fuera de la significación cuando las pacientes

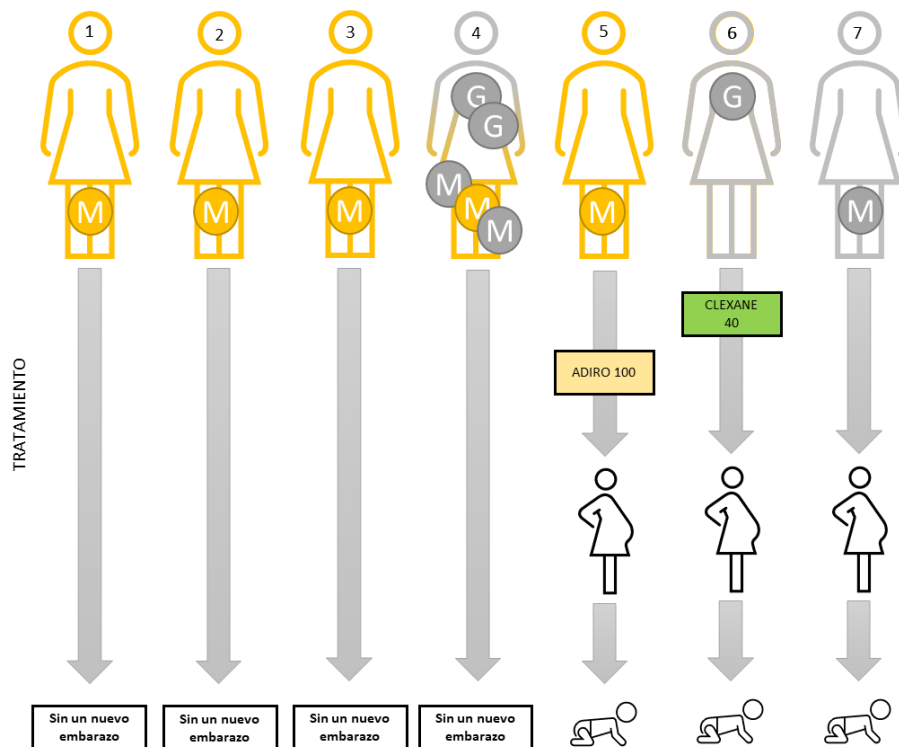
portadoras de cualquier aFL fueron consideradas (OR: 0,03. IC 95%: 0,01-1,25. p=0,066).



□ **Figura 37:** Características clínicas y analíticas de las pacientes positivas para aPS/PT y otros aFL con seguimiento evolutivo en el grupo de pacientes con antecedentes de dos abortos anteriores a la semana 10 de gestación. El color azul en los iconos de mujeres identifica a pacientes portadoras de aPS/PT IgG y el naranja a aPS/PT IgM. La última paciente (extremo derecho) no resultó portadora de aPS/PT sino para aCL IgM.

Como puede observarse en la figura 37, todas las pacientes del grupo de dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 y portadoras de aFL,

recibieron tratamiento. En cuatro de ellas la intervención fue exitosa (66,6%), una no obtuvo embarazo y otra padeció un aborto en semana 8. Al observar el resultado de las intervenciones en todas las pacientes con abortos anteriores a la semana 10, ya fueran dos consecutivos o tres o más, de las 15 pacientes con datos, 12 recibieron tratamiento y 3 no. Las tres no tratadas persistieron en una pérdida gestacional, mientras que 9 de 12 (75%) tratadas obtuvieron una siguiente gestación con nacido vivo. La intervención terapéutica conllevó un beneficio con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,043$ mediante el test de Fischer).



□ **Figura 38:** Características clínicas y analíticas de las pacientes positivas para aPS/PT y otros aFL con seguimiento evolutivo en el grupo de pacientes con pérdidas fetales. El color naranja identifica a pacientes portadoras de aPS/PT IgM y el gris a pacientes positivas para otros aFL diferentes a aPS/PT.

Como puede apreciarse en la figura 38, en el grupo de pérdidas fetales, de las 7 pacientes con datos y portadoras de aFL, dos recibieron tratamiento y cinco no. Obtuvieron embarazo y recién nacido vivo dos pacientes (una positiva para aPS/PT y otra aB2GPI IgG) en las que fue indicado tratamiento y una en la que no, siendo portadora de aCL IgM (OR: 0,06. IC 95%: 0,01-2,33. $p=0,135$).

El esquema de tratamiento con triple terapia (heparina, AAS e hidroxicloroquina) no mostró diferencias significativas con respecto al siguiente esquema más utilizado (heparina y AAS), habiendo obtenido un resultado favorable en 6 de 10 pacientes tratadas con triple terapia (60%) y en 7 de 8 (87,5%) con las tratadas con heparina y AAS.

El tratamiento con heparina fue utilizado en 19 pacientes, obteniendo un resultado satisfactorio en 14, marcando una diferencia estadísticamente significativa en el beneficio de la intervención con respecto a no tratar o tratar exclusivamente con AAS (10 pacientes), en las que 8 persistieron en fracaso reproductivo ($p=0,016$ mediante el test de Fischer).

Los resultados anteriores tienen en cuenta únicamente las pacientes que resultaron positivas en el estudio inicial sin considerar las 4 pacientes que presentaron positivizaciones para aPS/PT, 3 para IgG y 1 para IgM que ocurrieron durante el seguimiento. Entre estas cuatro pacientes, dos recibieron tratamiento y en otras dos no disponemos de datos sobre su

evolución dado que estaban pendientes de programación de una transferencia embrionaria o ciclo FIV en la fecha de escritura de esta tesis doctoral. En las dos pacientes que recibieron tratamiento, una recibió Innohep 4500 y Adiro 100 diarios tras observación de la positivización de aPS/PT IgM. Tenía antecedente de dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 y obtuvo una gestación con nacido vivo. La paciente restante tenía antecedente de abortos más allá de la semana 10, presentó positividad posterior de aPS/PT IgM y recibió tratamiento con Clexane 40, también resultando en embarazo con recién nacido vivo.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo aporta evidencias sobre la asociación de los aPS/PT en particular y los aFL incluidos en los últimos criterios de clasificación de SAF en general con el fracaso reproductivo recurrente. Pone de manifiesto la presencia, con una prevalencia inusitadamente alta, de estos aPS/PT en cohortes de mujeres con abortos de repetición tanto antes de la semana 10 de gestación como después de ese dintel. Además, siendo una de las novedades de los resultados obtenidos, encuentra una prevalencia alta también en pacientes con fracaso de implantación recurrente.

Los resultados de esta tesis doctoral son de interés pues aunque se está comenzando a considerar a la Protrombina como un antígeno de relevancia en SAF(4), los aPS/PT no están incluidos en los vigentes criterios de clasificación del SAF(3). En la actualidad, aunque las pacientes afectas de estas manifestaciones obstétricas cumplan rigurosamente los criterios clínicos, si no presentaran alguna de las indagaciones analíticas refrendadas en el último consenso de Sídney, no podrían ser clasificadas como pacientes afectas de SAF. Estos trabajos vienen a ampliar el acervo científico de datos publicados en favor de la inclusión de los aPS/PT para reconocer mejor todas las expresiones clínicas del SAF. Los resultados cobran especial relevancia dado que la mayor parte de las pacientes identificadas como portadoras de aPS/PT no presentan solapamiento en cuanto a positividad con otros aFL incluidos en los criterios de clasificación y pasarían inadvertidas para su clasificación como pacientes afectas de SAF. Esto dificulta su visibilidad y reconocimiento como pacientes afectos de SAF para una buena parte de la Profesión, para quienes los

criterios de clasificación equivaldrían en la práctica a criterios diagnósticos, como por ejemplo y siendo una parte sumamente implicada en la valoración y manejo de estas pacientes, los especialistas que trabajan en Medicina de la Reproducción, no estando familiarizados con el campo de investigación y tratamiento en SAF.

En este contexto en el que es muy necesario el reconocimiento de los aFL asociados a manifestaciones clínicas y a la luz de nuestros resultados, la ausencia de incorporación de los aPS/PT a los criterios de clasificación del SAF está ayudando a invisibilizar a casi un 18% de pacientes entre todas las categorías de morbilidad obstétrica incluidas en este trabajo. Estas pacientes podrían incluirse en una entidad mal definida, denominada SAF “seronegativo”, que incluiría a pacientes con criterios clínicos pero ausencia de resultados de laboratorio(140). No obstante, dado que las manifestaciones reconocidas del SAF no son patognomónicas de una enfermedad concreta sino que la diversa sintomatología que incluye podría tener otros orígenes fisiopatológicos muy diferentes a los descritos para el SAF, la indefinición que caracteriza a la entidad SAF “seronegativo” dificulta la generación de información, resultados y en definitiva, de evidencias, para aplicar tratamientos de los que estos pacientes pudieran beneficiarse.

Existen algunos estudios publicados sobre el papel que pudieran tener y las asociaciones clínicas encontradas entre los aPS/PT y el fracaso reproductivo manifestado mayoritariamente como abortos de repetición anteriores a la semana 10 de gestación o muertes fetales ocurridas con un tiempo de amenorrea superior al dintel de las 10 semanas. Una parte importante de los resultados de este trabajo

fueron publicados por nuestro grupo en el año 2021 en la revista internacional *Journal of Clinical Medicine*(141) como parte de una recopilación de estudios originales en un número especial denominado “pérdida gestacional recurrente: etiología, diagnóstico y tratamiento” dirigido por el editor invitado Profesor Dr. Ole Bjarne Christiansen y que puede encontrarse en el Anexo (apartado 8) de esta tesis doctoral. En comparación con los resultados de otros estudios, esta tesis doctoral indaga además sobre la presencia de aFL en dos escenarios clínicos actualmente fuera del consenso de Sídney, “dos abortos consecutivos sin otra causa que lo explique antes de la semana 10 de gestación” y “fracaso de implantación recurrente”. Aunque la infertilidad ha sido descrita en algunos estudios con los aFL, no es una asociación frecuentemente reconocida. En un estudio publicado en *Lupus* en 2014, Proeitta y colaboradores describieron una prevalencia de aFL mayor en pacientes infértiles que acudieron a realizar técnicas de reproducción asistida (6,25%) que en la población general (2%), recomendando el cribado de aFL en pacientes que afronten este tipo de técnicas(142). Aunque los resultados del mencionado trabajo son relevantes, no indaga sobre la presencia de aFL en pacientes en las que realmente no se consiga embarazo a pesar de un número suficiente de embriones transferidos de adecuada calidad, careciendo entonces de una muestra informativa de casos de fracaso de implantación recurrente. Otro de los estudios que asocia esterilidad y aFL data de 2012, pero no realiza un seguimiento pormenorizado de las pacientes nuligestas independiente de las que padecieron abortos(143). Un estudio previo de 2010 publicado en *Fertility & Sterility* sí comparó tres cohortes, una de controles, otra de mujeres que habían experimentado abortos y otra de fracaso de implantación recurrente, encontrando una prevalencia de aFL

de 1,5%, 11% y 8% respectivamente(144). Más recientemente se ha publicado un trabajo que relaciona infertilidad, aFL y los niveles de factor activador plaquetario, pero no estudió la presencia de aPS/PT(130).

Como es patente en la reseña de resultados de estudios de investigación hasta la fecha delineados en el párrafo anterior, la casuística de cohortes de pacientes estériles que entrarían en la definición de fracaso de implantación recurrente(111) es muy pobre o prácticamente inexistente. Nuestros datos aportan luz sobre una prevalencia relevante de aPS/PT en este tipo de pacientes, mayor que para otros aFL, como los incluidos en los criterios de clasificación de Sídney(3). Aunque los datos son prometedores y resultan punteros debido a la novedad que representan, es preciso considerar algunas limitaciones que podrían lastrar la bondad de los datos obtenidos. Entre esas limitaciones deben enumerarse el bajo número de pacientes incluidas, resultando en un número reducido de pacientes portadoras de aFL (todas salvo una portadoras de aPS/PT) y una distribución no equitativa de pacientes que recibieron o no tratamiento, estando claramente sobrerrepresentado el grupo de pacientes tratadas. Esta falta de homogeneidad debe entenderse en el contexto en el que se prescribe el tratamiento, siendo pacientes que agotaban o estaban próximas a finalizar los ciclos y transferencias que pudieran ser realizadas en nuestro centro, cuya financiación depende de la administración pública, y cuyas prestaciones están limitadas a un número definido de intentos. Aunque esta circunstancia es una limitación, en dos tercios de las pacientes que recibieron tratamiento en el grupo de fracaso de implantación se obtuvo una gestación exitosa con recién nacido vivo y sólo en un tercio el tratamiento fracasó, con el mismo resultado negativo obtenido

en la paciente portadora de aFL que no recibió tratamiento. En estas dos pacientes tratadas y en el caso que no recibió tratamiento, podría explicarse la concatenación transferencias embrionarias inexitosas por la presencia de otros factores no modificables con el tratamiento utilizado en pacientes con aFL, como podría ser la presencia de factores embrionarios no detectados. Entre estos factores embrionarios, cabe mencionar otra limitación de nuestro estudio y nuestro centro en la fecha de recogida de datos y tratamiento de las pacientes como la transferencia de embriones en día de cultivo 2-3 y la imposibilidad de realizar biopsia embrionaria para detección pre-transferencia de aneuploidías. Con la transferencia de embriones en un estadio anterior al de blastocisto y sin haber interrogado la presencia de alteraciones en el número de cromosomas, existe la posibilidad de realizar transferencias con embriones que no presentan las mismas garantías de implantación que aquellos en los que estas desventajas se han estudiado y descartado.

En el fenotipo de morbilidad obstétrica contemplada en los criterios de clasificación de Sídney, los aPS/PT sí han sido estudiados. En el trabajo de Polona Zigon y colaboradores, publicado en *Journal of Immunological Research* en 2015, encontraron entre todas las manifestaciones obstétricas incluidas en el consenso una prevalencia de aPS/PT positivos aislados en el 6,5% de los casos estudiados, mientras que en los trabajos de esta tesis doctoral encontramos positividad aislada en un 23,5% de los casos. En un trabajo del grupo de Arsène Mekinian publicado en 2016 observaron una positividad aislada de aPS/PT en pacientes con SAF obstétrico seronegativo del 4,7% y solapando con otros aFL hasta en el 46% de los casos

incluyendo además preeclampsia, muerte neonatal y los abortos contemplados en el consenso de Sídney(145). Una proporción de las pacientes incluidas en esta tesis doctoral fue incorporada en un trabajo multicéntrico internacional liderado también por Arsène Mekinian y publicado en *RMD Open* en 2020 y disponible en el anexo 2 de esta tesis doctoral. En él, describimos que el denominado SAF seronegativo con aFL extraconsenso, presenta una mayor prevalencia de manifestaciones obstétricas que trombóticas, que el tratamiento dirigido mejoró significativamente la probabilidad de éxito en la siguiente gestación con respecto a la abstención terapéutica y que la prevalencia en este contexto de aPS/PT IgG fue del 36% y de aPS/PT IgM del 37%(146).

Un meta-análisis reciente publicado por el grupo de Radin y colaboradores en *Thrombosis and Haemostasis* en 2020 estudió la asociación entre aPS/PT y morbilidad obstétrica en siete estudios que sumaban 1388 pacientes(147). En cinco de ellos la asociación entre aPS/PT y morbilidad obstétrica resultó significativa con un OR acumulado de 10,6 (IC 95%: 3,54-35,38). Entre los cinco estudios, uno de los que utilizaron el mismo kit diagnóstico para la determinación de aPS/PT que el nuestro fue el trabajo publicado por Sciascia y colaboradores en 2014 en *Thrombosis Research* (148) con una cohorte de pacientes diagnosticadas de LES. Aunque la asociación global de la morbilidad obstétrica con los aPS/PT fue significativa, lo fue gracias a la asociación encontrada en pacientes con abortos desde la semana 10 en adelante, no observando tal asociación en mujeres con abortos consecutivos anteriores a la semana 10. Los datos presentados en esta tesis doctoral, no obstante, sí permiten realizar una asociación entre aPS/PT y el fenotipo clínico de abortos

recurrentes anteriores a la semana 10, tanto en pacientes con tres o más abortos consecutivos como sólo en dos consecutivos. Las diferencias podrían explicarse por la diferente cohorte de pacientes incluidas. Mientras que Sciascia y colaboradores estudiaron pacientes con LES, esta enfermedad autoinmune fue un criterio de exclusión para los trabajos de esta tesis doctoral, al guiarnos por el ánimo de acercarnos con nuestra población de pacientes incluidas lo máximo posible a las pacientes sanas pero infértiles que son evaluadas en las unidades de medicina reproductiva.

El grupo de Amengual y colaboradores publicó en *Lupus* en 2017 los resultados de un estudio multicéntrico internacional con dos cohortes, una de descubrimiento y otra de confirmación, encontró asociación entre morbilidad obstétrica y aPS/PT en la primera cohorte pero no en la segunda. El grupo de Zhu y colaboradores publicó también en 2017 un estudio en el que estudiaron los antecedentes obstétricos de pacientes que precisaban ingreso hospitalario por trombosis y en los que se determinaron positivos aFL(149). En dicho estudio no se observó asociación entre aPS/PT y morbilidad obstétrica, aunque probablemente el criterio de inclusión marcado por el ingreso hospitalario por trombosis pudiera haber influido en el cálculo de la asociación, más que posibles diferencias étnicas o geográficas con respecto al papel de los aPS/PT en la asociación con abortos recurrentes.

El trabajo que presentamos encuentra asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de aPS/PT y los tipos de morbilidad obstétrica definidos en este estudio. No fue objeto del estudio la demostración de la causalidad, entendida como

el esclarecimiento de los medios por los cuales los aPS/PT producirían daño o cambios irreversibles en los tejidos fetales donde se expresan los epítomos que estos autoanticuerpos tienen la capacidad de reconocer. No obstante, una aproximación posible para enriquecer las asociaciones estadísticas encontradas entre la presencia de aPS/PT y los tipos de morbilidad obstétrica incluidos, sería la obtención de datos favorables en cuanto a la respuesta al tratamiento. Una vez planteada la aproximación de la asociación estadística con la causalidad por medio de la obtención de resultados de la respuesta al tratamiento, nos encontramos con una gran limitación que lastra este objetivo en los grupos de pacientes con abortos, y es el desánimo por realizar un nuevo intento de embarazo. Las pacientes incluidas han padecido dos, tres o más abortos consecutivos y no desean proseguir una búsqueda que les ha traído molestias físicas y psicológicas. Aun así, los datos de las pacientes con abortos portadoras de aFL que sí decidieron proseguir con la búsqueda de una nueva gestación exitosa, aunque gravados por el bajo número, son esperanzadores, al haber hallado que tres cuartos de las pacientes con abortos anteriores a la semana 10 que recibieron tratamiento, lograron un obtener un recién nacido vivo y que las dos pacientes con pérdidas fetales más allá de la semana 10 que recibieron tratamiento, consiguieron el mismo resultado favorable, en comparación con las tres que no recibieron tratamiento y que persistieron en un nuevo aborto.

Estos datos, aunque limitados por el mencionado bajo número de casos con diagnóstico y datos sobre su evolución y resultado de las intervenciones practicadas, permitiría en nuestra opinión, abogar por un cribado precoz de aFL en general y de aPS/PT en particular, en las pacientes que han tenido al menos dos abortos

consecutivos o uno mayor a la semana 10 de gestación, lo que permitiría visibilizar la posible implicación de estos autoanticuerpos en pacientes con abortos y ofrecer, aunque fuera en el marco de proyectos de investigación clínica, la consideración de opciones de tratamiento que podrían redundar en un beneficio para las pacientes. Una vez definidas las limitaciones clínicas de nuestro trabajo, es importante realizar otras reseñas sobre los procedimientos analíticos que hemos seguido para obtener estos resultados. Siguiendo las recomendaciones establecidas en el último consenso de Sídney, consideramos personalizar el punto de corte de nuestro método de detección mediante el cálculo del punto de corte en la población que es atendida en nuestro Hospital. El fabricante del kit diagnóstico para la determinación de aPS/PT en suero establece como punto de corte 30U/mL para aPS/PT IgG y 30U/mL para aPS/PT IgM. La elección para nuestro estudio de un punto de corte diferente para IgM se basa en las recomendaciones del consenso de Sídney, entre las que se aconseja el cálculo del percentil 99 con muestras de donantes de sangre. Esta recomendación viene motivada por la posibilidad de encontrar variación en la determinación analítica de las magnitudes biológicas en sangre en diferentes zonas geográficas, etnias o razas, fruto de la adaptación ambiental u otros condicionantes sociales. Antes de comenzar este trabajo, comparamos los resultados de las determinaciones de aPS/PT IgG e IgM de donantes de sangre incluyendo varones y mujeres adultos con las 410 mujeres embarazadas sanas para las que obtuvimos muestras de suero y suficientes datos como para su inclusión en el estudio. La aplicación del test estadístico de la U de Mann-Whitney comparando los resultados entre donantes de sangre y embarazadas sanas mostró el solapamiento de los intervalos de confianza tanto para aPS/PT IgG como IgM, indicando que eran

poblaciones superponibles. Aún así, el cálculo del percentil 99 con la exclusión de los valores extremos (*“outliers”*) siguiendo las directrices del método de bloqueo, aproximó el punto de corte calculado para aPS/PT IgG en 27,25U/mL al definido por el fabricante y utilizado en nuestro laboratorio para los donantes de sangre (30U/mL). En cuanto a aPS/PT IgM, el punto de corte calculado fue 37,8U/mL, decidiendo elevar la exigencia para nuestro estudio hasta 40U/mL para hacerlo coincidir con el utilizado en nuestro laboratorio calculado a partir de las muestras de los donantes de sangre.

En SAF, de igual forma que ocurre en otras enfermedades autoinmunes en las que se detectan autoanticuerpos, el isotipo y la persistencia de estos resulta de relevancia para atribuir una relación fisiopatológica entre las manifestaciones clínicas y los hallazgos encontrados. La necesidad de encontrar autoanticuerpos persistentes fue establecida en 1999(35) y recogida en los últimos criterios de clasificación establecidos en Sídney en 2004, que consideran necesaria la confirmación de la persistencia de los aFL en al menos dos extracciones separadas por al menos 12 semanas(3). Este criterio de inclusión permitiría no clasificar como pacientes afectados de SAF a aquellos con elevaciones transitorias de anticuerpos fruto de procesos infecciosos en un momento en el que las técnicas de detección no presentaban la especificidad alcanzada con los métodos actuales. Además, los pacientes con persistencia de aFL mostraron una mejor correlación con trombosis que los que únicamente mostraron positividades aisladas(150). El grupo de Vittorio Pengo demostró que en pacientes con un resultado positivo para los aFL incluidos en los criterios de consenso, únicamente el 40% confirmaron persistencia a las 12

semanas(151). Por otro lado, describe que la persistencia entre portadores asintomáticos de aFL se reduce a un 10,6%(151). En cambio, en nuestro estudio, contabilizando las pacientes en las que disponemos de un seguimiento adecuado en el tiempo, sólo una paciente presentó negativización en la analítica de confirmación 12 semanas después para aPS/PT IgG, resultando en una persistencia del 87,5% y dos para aPS/PT IgM, con una persistencia calculada del 71,4%, ambas muy superiores a lo descrito por el trabajo de Pengo(151). Un estudio reciente publicado por el grupo de Gerard Espinosa describe la persistencia de positividad de los aPS/PT en diferentes grupos de pacientes, 28% en IgG y 72% en IgM para pacientes con criterios de clasificación de SAF (y solapamiento con otros aFL), 0% en IgG y 18% en IgM para pacientes que reúnen algún criterio pero no suficientes para la clasificación como SAF, incluyendo las manifestaciones obstétricas, 7% en IgG y 30% en IgM para pacientes con Lupus y 0% en IgG y 30% en IgM para pacientes estudiados por otros motivos y que resultaron positivos en la primera muestra estudiada(152).

No obstante, nuestro trabajo presenta una limitación importante del que no están exentos otros estudios publicados al no disponer de una segunda muestra de confirmación de los resultados positivos en el grupo control. En nuestro caso, el diseño del estudio sobre el que se asientan los resultados obtenidos impidió la obtención de muestras de confirmación en aquellas mujeres participantes como controles sanos que presentaron valores positivos para aPS/PT. Esta carencia nos impidió la realización de estudios estadísticos para evaluar adecuadamente el riesgo atribuible a la persistencia de aPS/PT sobre las variedades de morbilidad obstétrica incluidas en este trabajo. De aplicar un criterio diferente, hubiéramos planteado una

exigencia mayor, basada en la persistencia 12 semanas después, a una cohorte, la de pacientes, mientras que a la de controles sanos no, pudiendo incurrir en un sesgo metodológico.

Además de la persistencia tras el estudio inicial, es relevante destacar los cambios evolutivos en la cuantificación de los aPS/PT. Dos pacientes negativas en el estudio inicial positivizaron valores de aPS/PT IgG durante el seguimiento considerando sólo aquellos resultados con muestras extraídas con una distancia mayor a 12 semanas desde la inicial y de otras dos más considerando muestras extraídas en un intervalo menor. En el caso de aPS/PT IgM, dos pacientes positivizaron en la segunda analítica realizada al menos a las 12 semanas de la inicial. Si bien estas pacientes que positivizaron a posteriori no fueron tenidas en cuenta para el estudio de la prevalencia mostrado en este trabajo, sí se tomaron decisiones clínicas sobre su manejo terapéutico.

Estos resultados, aunque limitados en número, arrojan dudas más que sobre la necesidad de confirmar la persistencia, sino sobre la idoneidad del momento en el que se realizan las extracciones para estudio de autoanticuerpos. Su detección positiva o negativa puede depender de factores ajenos a su propia patogenicidad, como son la frecuencia de la exposición antigénica y la capacidad de la respuesta inmune frente determinados autoantígenos de lograr la maduración de las células B activadas hacia la generación de plasmablastos. En relación con la frecuencia de la exposición antigénica, puede establecerse a nivel teórico cierto paralelismo entre el comportamiento biológico de la molécula B2GPI y la Protrombina. Ambas moléculas

resultan ser dianas de los aFL y ambas comparten la capacidad de tomar diferentes conformaciones tridimensionales, cerrada habitualmente, en condiciones basales, o abierta, durante menores lapsos de tiempo y asociada a fenómenos de inflamación local. La exposición de epítomos críticos en conformación cerrada cuando se estabiliza la configuración **trimdimensional** abierta podría suponer un estímulo para células B autorreactivas que, dependiendo de su estatus como células naïve o memoria, podría producir la secreción de anticuerpos de isotipo IgM en el primer caso y anticuerpos con una cadena pesada diferente a *Mu* en las células B de memoria con cambio de isotipo. Dando por cierta la presencia de células B autorreactivas frente a los epítomos críticos y con fenotipo naïve, cuanto más frecuentes sean las exposiciones, ocurrirán más procesos de activación y producción de anticuerpos IgM y de forma secundaria, más oportunidades para producir células B con isotipos diferentes, como células B de memoria y plasmablastos secretores de IgG o incluso secretores de IgM. Las células B de memoria son células que difieren la secreción de anticuerpos hasta una nueva exposición antigénica, mientras que los plasmablastos circularán hasta nichos específicos en algunos tejidos con microambiente proinflamatorio o en la médula ósea, donde producirán de forma constante, sin necesidad de una nueva reestimulación antigénica las moléculas de inmunoglobulina con las cadenas pesadas, ligeras y especificidad que han conseguido establecer mediante varios procesos de reordenamiento genético marcado por las características antigénicas y del microambiente en el que tuvieron lugar. El resultado de la medida de anticuerpos en sangre en un momento puntual supone la simplificación de todos estos procesos en una determinada concentración o título. De forma indirecta, la exigencia que el consenso de Sídney establece sobre

la persistencia de los anticuerpos en valores positivos 12 semanas después de la primera medida, favorece el reconocimiento como pacientes afectos de SAF aquellos que con criterios clínicos suficientes, presentan producción de aFL mediante células productoras de anticuerpos de vida larga (células plasmáticas) o aquellos que presentan fenómenos de activación más frecuentes, como podrían ser por ejemplo los pacientes afectos de lupus. Por otro lado, esta exigencia minusvalora respuestas autoinmunes que podrían darse sólo en condiciones determinadas en las que la exposición antigénica pudiera ocurrir en condiciones muy particulares, pero que podría conllevar la generación de anticuerpos que, dependiendo del microambiente en el que se desenvuelve la respuesta inmune, generaría o no células B de memoria o plasmablastos productores de anticuerpos igualmente deletéreos a aquellos que son producidos de forma constante.

Una situación muy particular en la biología humana es el desarrollo embrionario. En este contexto, no disponemos de conocimientos exhaustivos sobre la configuración tridimensional y la exposición de moléculas como la B2GPI o la Protrombina en los tejidos fetales sobre los que la respuesta inmune materna pudiera generar algún tipo de actividad, como por ejemplo en el trofoblasto extravellocitario. De esta forma, podría hipotetizarse que la persistencia a largo plazo de los aFL podría no ser tan relevante como la producción ad-hoc de anticuerpos en la generación de morbilidad obstétrica temprana como abortos anteriores a la semana 10 de gestación o incluso infertilidad con fracaso de implantación recurrente, de forma que una vez terminada la exposición antigénica que motiva la respuesta, ésta resultara silenciada hasta una nueva iteración. Esta nueva exposición podría darse

en una misma o siguiente gestación, generando un título de anticuerpos que podría inducir daño sobre los tejidos embrionarios donde B2GPI o Protrombina se expresan.

Además del debate en torno a la persistencia de los aFL en general y de los aPS/PT en particular, otro punto de interés para valorar la inclusión de estos últimos aFL en los criterios de clasificación de SAF es su solapamiento o asociación con otro de los aFL más clásicos, el AL. En uno de sus últimos artículos publicados, Meroni describe AL como un aFL resultado de una determinación funcional que detecta una población heterogénea de anticuerpos que actúan como inhibidores *invitro* de la coagulación(4). Dado que es un resultado proveniente de una técnica funcional, con múltiples métodos de detección posibles, la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (*International Society of Thrombosis and Haemostasis*), ha realizado un esfuerzo importante en su estandarización(153). La positividad de AL, entre todos los aFL, es la que más predispone a los pacientes que lo portan al desarrollo de trombosis(154). Aunque el AL puede encontrarse en solapamiento con otros aFL, hasta inicios de la década de 1990 no se observó una correlación clara con algún otro autoanticuerpo dirigido frente a fosfolípidos, sus proteínas asociadas o a factores de la coagulación. Los aPS/PT fueron descritos como aFL en 1997(68) pero observados en pacientes portadores de AL ya en 1991(67). Desde entonces la determinación de aPS/PT ha estado ligada a la confirmación de la presencia de AL, dada la dificultad para su demostración en pacientes en tratamiento anticoagulante al ser una prueba funcional. De hecho, fueron confirmados como aFL candidatos a ser considerados en siguientes revisiones del consenso que aún no han tenido lugar(3). En el apartado específico de los anticuerpos dirigidos frente a la Protrombina en el artículo que

publica el consenso de Sídney, los autores mencionan que el 95% de los pacientes positivos para aPS/PT solaparon positividad con AL(3). No obstante, los datos a los que hacen mención provienen de un trabajo anterior de Atsumi y Bertolaccini en el que el valor de 95,6% corresponde a la especificidad de la correlación de aPS/PT con AL, que resultó estadísticamente significativa, pero con la siguiente distribución: 49 pacientes de 253 estudiados mediante dRVVT dieron un resultado positivo. Entre esos 49 pacientes positivos para AL mediante dRVVT, 24 (48,9%) solaparon positividad con aPS/PT IgG o IgM y 25 (51,1%) resultaron negativos para aPS/PT. Treinta y tres pacientes resultaron positivos para aPS/PT, de los que 24 (72,7%) fueron positivos para AL dRVVT y 9 (27,2%) resultaron positivos aislados para aPS/PT. Aunque la relación entre ambas técnicas es relevante, se aleja del valor esgrimido en la publicación del consenso de Sídney. Otros artículos posteriores como el del grupo de Meroni, encontraron una correlación muy alta entre AL y aPS/PT, sugiriendo que éstos podrían tomarse directamente como un marcador subrogado de la presencia de AL(155). En 2015, el grupo de Zigon publicó un artículo sobre morbilidad obstétrica en el que encontraron una prevalencia elevada de aPS/PT en pacientes con abortos cumpliendo los criterios de Sídney. El 13% de las pacientes que cumplieron esos criterios presentó positividad para aPS/PT determinado mediante ELISA no comercial. En cambio, sólo el 8,7% presentó positividad para LA medido mediante dRVVT. Aunque no mostraron figuras o datos sobre el solapamiento entre diferentes aFL en las pacientes, es evidente que encontraron pacientes negativas para LA y positivas para aPS/PT en el contexto de abortos de repetición.

En nuestros datos, sólo 3 pacientes pertenecientes al grupo de fracaso de implantación presentaron positividad para AL mediante dRVVT y solapamiento con aPS/PT, no hallándose AL positivos aislados ni con solapamiento con otros aFL. La no inclusión de pacientes con fracaso de implantación recurrente en este trabajo al ser una entidad no incluida en los criterios de clasificación de Sídney hubiera conllevado la ausencia de detección de pacientes positivas para AL. La correlación entre la positividad de aPS/PT y de AL en nuestros datos es significativa pero con un índice "r" muy por debajo de lo esperable para ser considerados tests equivalentes. De forma independiente a la clasificación categórica en resultado positivo o negativo para AL y para aPS/PT, estudiamos así mismo la correlación entre los diferentes resultados cuantitativos para AL determinado mediante dRVVT y sílice, al disponer de resultados de ambas metodologías en paralelo, hallando una correlación significativa únicamente en el caso de la ratio de AL determinado mediante dRVVT y los valores de aPS/PT IgM. En cualquier caso, el valor de la correlación presentó un índice "r" muy por debajo de lo esperable para tomar los aPS/PT IgM como marcador subrogado de AL medido mediante dRVVT y probablemente explicado por el bajo número de resultados positivos para AL entre nuestras pacientes.

No disponemos de una explicación definitiva para la baja prevalencia de AL a pesar de encontrar aPS/PT positivos, pero podría deberse a la estricta selección de las pacientes incluidas en este estudio, siendo todas negativas para especificidades de anticuerpos anti-antígenos extraíbles del núcleo y no diagnosticadas de enfermedades autoinmunes sistémicas o reumatológicas diferentes a SAF o autoinmunidad tiroidea. Este sesgo de selección ha debido propiciar el

enriquecimiento de nuestras cohortes de fracaso reproductivo con pacientes negativas para AL y que no obstante, han resultado positivas para otros aFL como los aPS/PT.

La ausencia de determinación de AL en el grupo control nos impidió realizar un análisis multivariante mediante regresión logística del riesgo aportado por aPS/PT en relación a la presencia de AL. No obstante, al no encontrar pacientes positivas en los grupos de abortos de repetición, tanto antes de la semana 10 de gestación como posteriores, la ausencia de estos resultados únicamente podría arrojar dudas sobre el efecto que pudieran tener los aPS/PT sobre la cohorte de fracaso de implantación recurrente, no incluida como morbilidad obstétrica en los vigentes criterios de clasificación acordados en la reunión de Sídney(3).

Los resultados obtenidos, valorados convenientemente bajo el prisma de las limitaciones observadas, dan lugar a las siguientes conclusiones de esta tesis doctoral.

6. CONCLUSIONES

Los trabajos contenidos en esta tesis doctoral permiten enumerar las siguientes conclusiones sobre los aPS/PT y el fracaso reproductivo recurrente inexplicado definido como fracaso de implantación recurrente, tres o más abortos consecutivos y anteriores a la semana 10 de gestación, al menos un aborto a partir de la semana 10 de gestación y dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10:

1. El punto de corte para aPS/PT de isotipo IgG calculado es igual al propuesto por el fabricante del kit diagnóstico (30UI/mL). En el caso del isotipo IgM, hemos obtenido un punto de corte más alto (40UI/mL) que el recomendado por el fabricante del método de detección (30UI/mL). En ambos casos el rendimiento del punto de corte es similar a los del fabricante u otros calculados en otras poblaciones estudiadas.
2. Los aPS/PT se encuentran con una prevalencia más alta que los aFL incluidos en los vigentes criterios de clasificación de Sídney para SAF en todas las categorías clínicas estudiadas de fracaso reproductivo recurrente.
3. Los aPS/PT se hallan en la gran mayoría de casos en pacientes que han resultado negativos para otros aFL incluidos en los criterios de clasificación vigentes.
4. La presencia de los aPS/PT se asocia de forma estadísticamente significativa con todos los tipos de fracaso reproductivo recurrente estudiados.

5. Los aPS/PT suponen un factor de riesgo independiente para todas las categorías clínicas estudiadas en los análisis de regresión logística multivariante junto con los aFL incluidos en los criterios de clasificación de Sídney y la edad.
6. El tratamiento dirigido de las pacientes portadoras de aPS/PT resultó ser una intervención beneficiosa con diferencias estadísticamente significativas con respecto a la abstención terapéutica cuando se analizó la respuesta a tratamiento para el conjunto de pacientes incluidas en esta tesis doctoral.
7. Al estratificar el estudio del resultado de la intervención en los diferentes grupos de pacientes, el beneficio observado mostró diferencias significativas únicamente para el grupo de pacientes con tres o más abortos anteriores a la semana 10 de gestación y cuando fueron consideradas todas las pacientes con dos o más abortos anteriores a la semana 10 de gestación.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2(8361): 1211-4.
2. Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335(8705): 1544-7.
3. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.
4. Meroni PL, Borghi MO. Antiphospholipid Antibody Assays in 2021: Looking for a Predictive Value in Addition to a Diagnostic One. *Front Immunol* 2021; 12: 726820.
5. Gandhi AA, Estes SK, Rysenga CE, et al. Understanding the Pathophysiology of Thrombotic APS through Animal Models. *Int J Mol Sci* 2021; 22(5).
6. Serrano M, Espinosa G, Lalueza A, et al. Beta-2-Glycoprotein-I Deficiency Could Precipitate an Antiphospholipid Syndrome-like Prothrombotic Situation in Patients With Coronavirus Disease 2019. *ACR Open Rheumatol* 2021.
7. Abreu MM, Danowski A, Wahl DG, et al. The relevance of "non-criteria" clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Technical Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Clinical Features. *Autoimmun Rev* 2015.
8. Asherson RA. A "primary" antiphospholipid syndrome? *J Rheumatol* 1988; 15(12): 1742-6.
9. Wu H, Fu S, Zhao M, et al. Dysregulation of Cell Death and Its Epigenetic Mechanisms in Systemic Lupus Erythematosus. *Molecules* 2016; 22(1).
10. Alijotas-Reig J, Ferrer-Oliveras R, Ruffatti A, et al. The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): A survey of 247 consecutive cases. *Autoimmun Rev* 2015; 14(5): 387-95.
11. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood* 2011; 118(17): 4714-8.
12. Pierangeli SS, Liu SW, Anderson G, et al. Thrombogenic properties of murine anti-cardiolipin antibodies induced by beta 2 glycoprotein 1 and human immunoglobulin G antiphospholipid antibodies. *Circulation* 1996; 94(7): 1746-51.
13. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome, 1998. A review of the clinical features, possible pathogenesis and treatment. *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S55-62.
14. Bordin G, Boldorini R, Meroni PL. The two hit hypothesis in the antiphospholipid syndrome: acute ischaemic heart involvement after valvular replacement despite anticoagulation in a patient with secondary APS. *Lupus* 2003; 12(11): 851-3.
15. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, et al. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(6): 330-9.
16. Radic M, Pattanaik D. Cellular and Molecular Mechanisms of Anti-Phospholipid Syndrome. *Front Immunol* 2018; 9: 969.

17. Agar C, van Os GM, Morgelin M, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116(8): 1336-43.
18. Pelkmans L, Kelchtermans H, de Groot PG, et al. Variability in exposure of epitope G40-R43 of domain I in commercial anti-beta2-glycoprotein I IgG ELISAs. *PLoS One* 2013; 8(8): e71402.
19. de Laat B, van Berkel M, Urbanus RT, et al. Immune responses against domain I of beta(2)-glycoprotein I are driven by conformational changes: domain I of beta(2)-glycoprotein I harbors a cryptic immunogenic epitope. *Arthritis Rheum* 2011; 63(12): 3960-8.
20. Raimondo MG, Pericleous C, Radziszewska A, et al. Oxidation of beta2-glycoprotein I associates with IgG antibodies to domain I in patients with antiphospholipid syndrome. *PLoS One* 2017; 12(10): e0186513.
21. Giles IP, Isenberg DA, Latchman DS, et al. How do antiphospholipid antibodies bind beta2-glycoprotein I? *Arthritis Rheum* 2003; 48(8): 2111-21.
22. Serrano M, Martinez-Flores JA, Norman GL, et al. The IgA Isotype of Anti-beta2 Glycoprotein I Antibodies Recognizes Epitopes in Domains 3, 4, and 5 That Are Located in a Lateral Zone of the Molecule (L-Shaped). *Front Immunol* 2019; 10: 1031.
23. Passam FH, Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, et al. Molecular pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: the role of oxidative post-translational modification of beta 2 glycoprotein I. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1: 275-82.
24. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96(5): 2211-9.
25. Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, et al. E-Selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2003; 1(4): 843-8.
26. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, et al. Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 2005; 52(5): 1545-54.
27. Branch DW, Rodgers GM. Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of thrombosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168(1 Pt 1): 206-10.
28. Xia L, Zhou H, Wang T, et al. Activation of mTOR is involved in anti-beta2GPI/beta2GPI-induced expression of tissue factor and IL-8 in monocytes. *Thromb Res* 2017; 157: 103-10.
29. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(11): 2990-3003.
30. Poulton K, Rahman A, Giles I. Examining how antiphospholipid antibodies activate intracellular signaling pathways: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2012; 41(5): 720-36.
31. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, et al. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005; 52(7): 2120-4.
32. Qiao J, Arthur JF, Gardiner EE, et al. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biol* 2018; 14: 126-30.

33. Manukyan D, Muller-Calleja N, Jackel S, et al. Cofactor-independent human antiphospholipid antibodies induce venous thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2016; 14(5): 1011-20.
34. Canaud G, Bienaime F, Tabarin F, et al. Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2014; 371(4): 303-12.
35. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7): 1309-11.
36. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2017; 151 Suppl 1: S43-S7.
37. Erkan D, Lockshin MD. Non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010; 19(4): 424-7.
38. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15(2): 145-51.
39. Durcan L PM. Epidemiology of the Antiphospholipid Syndrome. 17-30.
40. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, et al. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1992; 117(12): 997-1002.
41. Andreoli L, Chighizola CB, Banzato A, et al. Estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: a critical review of the literature. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013; 65(11): 1869-73.
42. Sevim E, Zisa D, Andrade D, et al. Characteristics of Antiphospholipid Antibody Positive Patients in AntiPhospholipid Syndrome Alliance for Clinical Trials and InternatiOnal Networking. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2020.
43. Radin M, Foddai SG, Barinotti A, et al. Reducing the diagnostic delay in Antiphospholipid Syndrome over time: a real world observation. *Orphanet J Rare Dis* 2021; 16(1): 280.
44. Cervera R, Conti F, Doria A, et al. Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist? *Autoimmun Rev* 2012; 11(8): 581-4.
45. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, et al. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(8): 1358-67.
46. Misasi R, Longo A, Recalchi S, et al. Molecular Mechanisms of "Antiphospholipid Antibodies" and Their Paradoxical Role in the Pathogenesis of "Seronegative APS". *Int J Mol Sci* 2020; 21(21).
47. Persijn L, Decavele AS, Schouwers S, et al. Evaluation of a new set of automated chemiluminescence assays for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2011; 128(6): 565-9.
48. Zhang S, Wu Z, Li P, et al. Evaluation of the Clinical Performance of a Novel Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Anticardiolipin and Anti-Beta2-Glycoprotein 1 Antibodies in the Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(46): e2059.
49. Abstracts for the 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (ICAPA). *Lupus* 2019; 28(1_suppl): 3-63.
50. Cabrera-Marante O, Rodriguez de Frias E, Serrano M, et al. The Weight of IgA Anti-beta2glycoprotein I in the Antiphospholipid Syndrome Pathogenesis: Closing the Gap of Seronegative Antiphospholipid Syndrome. *Int J Mol Sci* 2020; 21(23).

51. Martinez-Flores JA, Serrano M, Perez D, et al. Circulating Immune Complexes of IgA Bound to Beta 2 Glycoprotein are Strongly Associated with the Occurrence of Acute Thrombotic Events. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23(10): 1242-53.
52. Kaburaki J, Kuwana M, Yamamoto M, et al. Clinical significance of anti-annexin V antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 1997; 54(3): 209-13.
53. Salle V, Maziere JC, Smail A, et al. Anti-annexin II antibodies in systemic autoimmune diseases and antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol* 2008; 28(4): 291-7.
54. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81(10): 2618-25.
55. Sorice M, Arcieri P, Griggi T, et al. Inhibition of protein S by autoantibodies in patients with acquired protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1996; 75(4): 555-9.
56. Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72(2): 512-9.
57. Maneta-Peyret L, Bessoule JJ, Geffard M, et al. Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine. *J Immunol Methods* 1988; 108(1-2): 123-7.
58. Colaco CB, Male DK. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol* 1985; 59(2): 449-56.
59. Koike T, Sueishi M, Funaki H, et al. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1984; 56(1): 193-9.
60. Alessandri C, Bombardieri M, Di Prospero L, et al. Anti-lysobisphosphatidic acid antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(1): 173-80.
61. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, et al. Vimentin/cardiolipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116(16): 2960-7.
62. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9): 1982-93.
63. Perez D, Tincani A, Serrano M, et al. Antiphospholipid syndrome and IgA anti-beta2-glycoprotein I antibodies: when Cinderella becomes a princess. *Lupus* 2018; 27(2): 177-8.
64. Bertolaccini ML, Atsumi T, Escudero Contreras A, et al. The value of IgA antiphospholipid testing for diagnosis of antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28(12): 2637-43.
65. A L. Prothrombin as a co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus? *Thromb Diath Haemorrh* 1959; 3: 237-56.
66. Arvieux J, Darnige L, Caron C, et al. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74(4): 1120-5.
67. Bevers EM, Galli M, Barbui T, et al. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66(6): 629-32.

68. Galli M, Beretta G, Daldossi M, et al. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 77(3): 486-91.
69. Sciascia S, Sanna G, Murru V, et al. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost* 2014; 111(2): 354-64.
70. Bertolaccini ML, Sciascia S, Murru V, et al. Prevalence of antibodies to prothrombin in solid phase (aPT) and to phosphatidylserine-prothrombin complex (aPS/PT) in patients with and without lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 2013; 109(2): 207-13.
71. Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, et al. Phosphatidyl serine-dependent antiprothrombin antibody is exclusive to patients with lupus anticoagulant. *Br J Rheumatol* 1996; 35(6): 589-91.
72. Hoxha A, Mattia E, Tonello M, et al. Antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies as biomarkers to identify severe primary antiphospholipid syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(6): 890-8.
73. Chinnaraj M, Planer W, Pengo V, et al. Discovery and characterization of 2 novel subpopulations of aPS/PT antibodies in patients at high risk of thrombosis. *Blood Adv* 2019; 3(11): 1738-49.
74. Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, et al. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *Br J Haematol* 2006; 135(2): 214-9.
75. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, et al. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* 2009; 60(8): 2457-67.
76. RPL EGGo, Bender Atik R, Christiansen OB, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open* 2018; 2018(2): hoy004.
77. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977; 56(3): 247-53.
78. Santos TDS, Ieque AL, de Carvalho HC, et al. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *J Reprod Immunol* 2017; 123: 78-87.
79. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009; 2(2): 76-83.
80. Vomstein K, Feil K, Strobel L, et al. Immunological Risk Factors in Recurrent Pregnancy Loss: Guidelines Versus Current State of the Art. *J Clin Med* 2021; 10(4).
81. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989; 299(6698): 541-5.
82. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006; 368(9535): 601-11.
83. Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, et al. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(2): 397-400; discussion -2.
84. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012; 98(5): 1103-11.

85. Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. *Obstet Gynecol* 2019; 133(6): e377-e84.
86. Nielsen HS, Steffensen R, Varming K, et al. Association of HLA class II alleles with pregnancy outcome in patients with recurrent miscarriage subsequent to a firstborn boy. *Hum Mol Genet* 2009; 18(9): 1684-91.
87. Christiansen OB. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum Reprod Update* 1996; 2(4): 271-93.
88. Lee SK, Na BJ, Kim JY, et al. Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2013; 70(5): 398-411.
89. Lashley EE, Meuleman T, Claas FH. Beneficial or harmful effect of antipaternal human leukocyte antibodies on pregnancy outcome? A systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* 2013; 70(2): 87-103.
90. Bradley LA, Palomaki GE, Bienstock J, et al. Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes?: Results from a targeted evidence-based review. *Genet Med* 2012; 14(1): 39-50.
91. Opatrny L, David M, Kahn SR, et al. Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis. *J Rheumatol* 2006; 33(11): 2214-21.
92. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 2006; 4(2): 295-306.
93. Toth B, Wurfel W, Bohlmann M, et al. Recurrent Miscarriage: Diagnostic and Therapeutic Procedures. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k-Level, AWMF Registry Number 015/050). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2018; 78(4): 364-81.
94. Arachchilage DR, Machin SJ, Mackie IJ, et al. Diagnosis and management of non-criteria obstetric antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2015; 113(1): 13-9.
95. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, et al. Comparative study of obstetric antiphospholipid syndrome (OAPS) and non-criteria obstetric APS (NC-OAPS): report of 1640 cases from the EUROAPS registry. *Rheumatology (Oxford)* 2020; 59(6): 1306-14.
96. van Dijk MM, Kolte AM, Limpens J, et al. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2020; 26(3): 356-67.
97. Jaslow CR, Carney JL, Kutteh WH. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertil Steril* 2010; 93(4): 1234-43.
98. van den Boogaard E, Cohn DM, Korevaar JC, et al. Number and sequence of preceding miscarriages and maternal age for the prediction of antiphospholipid syndrome in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2013; 99(1): 188-92.
99. Rai R, Cohen H, Dave M, et al. Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* 1997; 314(7076): 253-7.
100. Cowchock FS, Reece EA, Balaban D, et al. Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166(5): 1318-23.

101. De Wolf F, Carreras LO, Moerman P, et al. Decidual vasculopathy and extensive placental infarction in a patient with repeated thromboembolic accidents, recurrent fetal loss, and a lupus anticoagulant. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142(7): 829-34.
102. Roubey RA. Heparin and aspirin versus aspirin alone for prevention of recurrent pregnancy loss. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12(1): 1-3.
103. Fouda UM, Sayed AM, Abdou AM, et al. Enoxaparin versus unfractionated heparin in the management of recurrent abortion secondary to antiphospholipid syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2011; 112(3): 211-5.
104. Harenberg J, Schneider D, Heilmann L, et al. Lack of anti-factor Xa activity in umbilical cord vein samples after subcutaneous administration of heparin or low molecular mass heparin in pregnant women. *Haemostasis* 1993; 23(6): 314-20.
105. Jiang F, Hu X, Jiang K, et al. The role of low molecular weight heparin on recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2021; 60(1): 1-8.
106. Liu Y, Shan N, Yuan Y, et al. The efficacy of enoxaparin for recurrent abortion: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2021; 34(3): 473-8.
107. Viall CA, Chamley LW. Histopathology in the placentae of women with antiphospholipid antibodies: A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 2015; 14(5): 446-71.
108. Di Simone N, Di Nicuolo F, D'Ippolito S, et al. Antiphospholipid antibodies affect human endometrial angiogenesis. *Biol Reprod* 2010; 83(2): 212-9.
109. Di Simone N, Meroni PL, de Papa N, et al. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1): 140-50.
110. D'Ippolito S, Meroni PL, Koike T, et al. Obstetric antiphospholipid syndrome: a recent classification for an old defined disorder. *Autoimmun Rev* 2014; 13(9): 901-8.
111. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 2014; 28(1): 14-38.
112. Taylor E, Gomel V. The uterus and fertility. *Fertil Steril* 2008; 89(1): 1-16.
113. Makrakis E, Pantos K. The outcomes of hysteroscopy in women with implantation failures after in-vitro fertilization: findings and effect on subsequent pregnancy rates. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22(4): 339-43.
114. Oliveira FG, Abdelmassih VG, Diamond MP, et al. Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2004; 81(3): 582-7.
115. Raga F, Bauset C, Remohi J, et al. Reproductive impact of congenital Mullerian anomalies. *Hum Reprod* 1997; 12(10): 2277-81.
116. Azem F, Many A, Ben Ami I, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Hum Reprod* 2004; 19(2): 368-70.
117. Mekinian A, Cohen J, Alijotas-Reig J, et al. Unexplained Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: Is There a Place for Immunomodulation? *Am J Reprod Immunol* 2016; 76(1): 8-28.
118. Makrigiannakis A, Petsas G, Toth B, et al. Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2011; 90(1): 96-104.
119. Devroey P, Godoy H, Smits J, et al. Female age predicts embryonic implantation after ICSI: a case-controlled study. *Hum Reprod* 1996; 11(6): 1324-7.

120. Gamiz P, Rubio C, de los Santos MJ, et al. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18(11): 2413-9.
121. Benkhalifa M, Demirel A, Sari T, et al. Autologous embryo-cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized study. *Zygote* 2012; 20(2): 173-80.
122. Camus E, Poncelet C, Goffinet F, et al. Pregnancy rates after in-vitro fertilization in cases of tubal infertility with and without hydrosalpinx: a meta-analysis of published comparative studies. *Hum Reprod* 1999; 14(5): 1243-9.
123. Simon C, Cano F, Valbuena D, et al. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod* 1995; 10(9): 2432-7.
124. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001; 76(5): 863-70.
125. Azem F, Geva E, Amit A, et al. High levels of anticardiolipin antibodies in patients with abnormal embryo morphology who attended an in vitro fertilization program. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39(3): 161-3.
126. Smith SK. Angiogenesis and reproduction. *BJOG* 2001; 108(8): 777-83.
127. Beltagy A, Trespidi L, Gerosa M, et al. Anti-phospholipid antibodies and reproductive failures. *Am J Reprod Immunol* 2020: e13258.
128. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Maziotis E, et al. The Impact of Autoantibodies on IVF Treatment and Outcome: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 2019; 20(4).
129. Chighizola CB, de Jesus GR, Branch DW. The hidden world of anti-phospholipid antibodies and female infertility: A literature appraisal. *Autoimmun Rev* 2016; 15(6): 493-500.
130. Mahdian S, Pirjani R, Favaedi R, et al. Platelet-activating factor and antiphospholipid antibodies in recurrent implantation failure. *J Reprod Immunol* 2021; 143: 103251.
131. Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, et al. Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163(1 Pt 1): 210-6.
132. Holers VM, Girardi G, Mo L, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002; 195(2): 211-20.
133. Chighizola CB, Pregnolato F, Raschi E, et al. Antiphospholipid Antibodies and Infertility: A Gene Expression Study in Decidual Stromal Cells. *Isr Med Assoc J* 2016; 18(3-4): 146-9.
134. Tan X, Ding J, Pu D, et al. Anti-phospholipid antibody may reduce endometrial receptivity during the window of embryo implantation. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2020: 101912.
135. Nayeem SB, Arfuso F, Dharmarajan A, et al. Role of Wnt signalling in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 2016; 28(5): 525-44.
136. Liu S, Wang J, Qin HM, et al. LIF upregulates poFUT1 expression and promotes trophoblast cell migration and invasion at the fetal-maternal interface. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1396.
137. Chung TW, Park MJ, Lee H, et al. Enhancement of Endometrial Receptivity by *Cnidium officinale* through Expressing LIF and Integrins. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019; 2019: 7560631.

138. Dixon WS. Processing data for outliers. *Biometrics* 1953; 9: 74-89.
139. Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 1971; 17(4): 275-84.
140. Pignatelli P, Ettore E, Menichelli D, et al. Seronegative antiphospholipid syndrome: refining the value of "non-criteria" antibodies for diagnosis and clinical management. *Haematologica* 2020; 105(3): 562-72.
141. Pleguezuelo DE, Cabrera-Marante O, Abad M, et al. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies in Healthy Women with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *J Clin Med* 2021; 10(10).
142. Proietta M, Ferrero S, Del Porto F. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with sterility undergoing 'in vitro' fertilization. *Lupus* 2014; 23(7): 724-5.
143. Kovacs M, Hartwig M, Aleksza M, et al. Antiphospholipid antibodies in relation to sterility/infertility. *Hum Immunol* 2012; 73(7): 726-31.
144. Sauer R, Roussev R, Jeyendran RS, et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies among women experiencing unexplained infertility and recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2010; 93(7): 2441-3.
145. Mekinian A, Bourrienne MC, Carbillon L, et al. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: Prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin Arthritis Rheum* 2016; 46(2): 232-7.
146. Abisror N, Nguyen Y, Marozio L, et al. Obstetrical outcome and treatments in seronegative primary APS: data from European retrospective study. *RMD Open* 2020; 6(2): 0.
147. Radin M, Foddai SG, Cecchi I, et al. Antiphosphatidylserine/Prothrombin Antibodies: An Update on Their Association with Clinical Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. *Thromb Haemost* 2020; 120(4): 592-8.
148. Sciascia S, Sanna G, Murru V, et al. Validation of a commercially available kit to detect anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies in a cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Thromb Res* 2014; 133(3): 451-4.
149. Zhu L, Li C, Liu N, et al. Diagnostic value of antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex for antiphospholipid syndrome in Chinese patients. *Clin Rheumatol* 2017; 36(2): 401-6.
150. Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, et al. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: a nationwide prospective study. *Lupus* 2014; 23(14): 1468-76.
151. Pengo V, Ruffatti A, Del Ross T, et al. Confirmation of initial antiphospholipid antibody positivity depends on the antiphospholipid antibody profile. *J Thromb Haemost* 2013; 11(8): 1527-31.
152. Egri N, Bentow C, Rubio L, et al. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies at Two Points: Correlation With Lupus Anticoagulant and Thrombotic Risk. *Front Immunol* 2021; 12: 754469.
153. Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(11): 2828-39.
154. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983; 287(6399): 1088-9.

155. Pregolato F, Chighizola CB, Encabo S, et al. Anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies: an additional diagnostic marker for APS? *Immunol Res* 2013; 56(2-3): 432-8.

8. ANEXOS

8.1. Artículo original publicado en *Journal of Clinical Medicine* con la siguiente
signatura: Pleguezuelo DE, Cabrera-Marante O, Abad M, Rodriguez-Frias EA,
Naranjo L, Vazquez A, Villar O, Gil-Etayo FJ, Serrano M, Perez-Rivilla A, de la
Fuente-Bitaine L, Serrano A. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies in
Healthy Women with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *J Clin Med*. 2021
May 13;10(10):2094. doi: 10.3390/jcm10102094. PMID: 34068095; PMCID:
PMC8152729.

Article

Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies in Healthy Women with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss

Daniel E. Pleguezuelo ^{1,*}, Oscar Cabrera-Marante ¹, Magdalena Abad ², Edgard Alfonso Rodriguez-Frias ¹, Laura Naranjo ¹, Alicia Vazquez ², Olga Villar ², Francisco Javier Gil-Etayo ¹, Manuel Serrano ³, Alfredo Perez-Rivilla ⁴, Laura de la Fuente-Bitaine ² and Antonio Serrano ¹

- ¹ Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; oscar.cabrera@salud.madrid.org (O.C.-M.); edgardalfonso.rodriguezde@salud.madrid.org (E.A.R.-F.); lauranaranjo92@gmail.com (L.N.); fgile@salud.madrid.org (F.J.G.-E.); aserrano@h12o.es (A.S.)
- ² Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; mabadgran@gmail.com (M.A.); aliciaavazsaran@gmail.com (A.V.); olga.villar@salud.madrid.org (O.V.); lauradlfb@gmail.com (L.d.l.F.-B.)
- ³ Healthcare Research Institute, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; mserranobl@gmail.com
- ⁴ Department of Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; alfredo.perez@salud.madrid.org
- * Correspondence: dpleguezuelo@salud.madrid.org; Tel.: +34-917792756



Citation: Pleguezuelo, D.E.; Cabrera-Marante, O.; Abad, M.; Rodriguez-Frias, E.A.; Naranjo, L.; Vazquez, A.; Villar, O.; Gil-Etayo, F.J.; Serrano, M.; Perez-Rivilla, A.; et al. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies in Healthy Women with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2094. <https://doi.org/10.3390/jcm10102094>

Academic Editor: Jacek Malejczyk

Received: 9 April 2021
Accepted: 10 May 2021
Published: 13 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Recurrent pregnancy loss (RPL) affects up to 6% of couples. Although chromosomal aberrations of the embryos are considered the leading cause, 50% of cases remain unexplained. Antiphospholipid Syndrome is a known cause in a few cases. Antiphospholipid antibodies (aPL) anticardiolipin, anti-Beta-2-Glycoprotein-I and Lupus Anticoagulant (criteria aPL) are recommended studies in RPL workup. We tested healthy women with unexplained RPL for criteria aPL and anti-Phosphatidylserine/Prothrombin antibodies (aPS/PT). Patients were classified into three groups according to the number and pregnancy week of RPL: Extra-Criteria (EC), with 2 miscarriages, Early Miscarriage (EM), with ≥ 3 before pregnancy at week 10 and Fetal Loss (FL), with ≥ 1 fetal death from pregnancy at week 10. Circulating criteria aPL were absent in 98.1% of EM, 90.9% of FL and 96.6% of EC groups. In contrast, aPS/PT were positive in 15.4% of EM, 15.1% of FL, 16.6% of EC patients and 2.9% in controls. aPS/PT posed a risk for RPL, with an odds ratio of 5.96 (95% confidence interval (CI): 1.85–19.13. $p = 0.002$) for EM, 7.28 (95% CI: 2.07–25.56. $p = 0.002$) for FL and 6.56. (95% CI: 1.77–24.29. $p = 0.004$) for EC. A successful live birth was achieved in all pregnant patients positive for aPS/PT who received treatment with heparin, aspirin and/or hydroxychloroquine.

Keywords: recurrent pregnancy loss; miscarriage; antiphospholipid syndrome; reproductive immunology; anti-phosphatidylserine/prothrombin; anticardiolipin; anti-beta-2-glycoprotein-I; lupus anticoagulant; heparin; hydroxychloroquine

1. Introduction

It is estimated that up to 6% of women suffer from recurrent pregnancy loss (RPL) [1–3]. The World Health Organization defined this condition in 1976 [4] as three or more consecutive pregnancy losses before the 20th week of pregnancy. The European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) recently updated this definition as the loss of two or more pregnancies [5]. The factors influencing such reproductive failure are usually found in 50% of cases [6,7], and include advanced age of the parents, genetic abnormalities of the products of conception [1], chronic endometritis, endometrial polyps, uterine synechiae, uterine anomalies, myomas, hydrosalpinx, endocrinological disorders, thyroid abnormalities, thrombophilia, sperm quality and life-style issues [8]. Within these causes, sporadic chromosomal anomalies in the embryos affect 60% of early pregnancy losses, mostly due to trisomies related to ageing parents [7]. Antiphospholipid Syndrome

(APS) is estimated to affect 5% to 20% of women with recurrent pregnancy loss [7,9], with differing prevalence found in the literature according to the variable degree of morbidity of the population under study. For example, in Systemic Lupus Erythematosus (SLE), the prevalence of aPL increases up to 40% of patients [10].

APS is a systemic autoimmune disease which was first described in 1983 and characterized by arterial and venous thrombosis and obstetric morbidity [11,12]. It could present alone (primary), associated with other autoimmune diseases (SLE mainly) or in its catastrophic form (an acute and life-threatening condition with widespread thrombosis [13]). To date, there are no specific diagnostic criteria for APS. In order to identify patients with APS for research purposes, classification criteria (clinical and laboratory criteria) were established in Sapporo in 1998. The last revision of these classification criteria was carried out in Sydney in 2004 (published in 2006) [14]. These criteria are often used in clinical practice to describe patients with APS, but many do not fulfill the research-oriented definition due to their low sensitivity [15]. The classification criteria state that a patient with APS must meet at least one laboratory and one clinical criterion. Laboratory criteria include the presence of persistent antiphospholipid antibodies (aPL) such as lupus anticoagulant (LA), anticardiolipin (aCL) IgG/IgM or anti-beta-2-glycoprotein-I (aB2GPI) IgG/IgM [14]. Clinical criteria include vascular thrombosis (one or more clinical episodes of arterial, venous, or small vessel thrombosis, in any tissue or organ) and/or pregnancy morbidity (three or more consecutive miscarriages before week 10 of pregnancy when hormonal, anatomical or chromosomal aberrations are excluded; one pregnancy loss of a morphologically normal fetus beyond week 10; and premature birth before week 34 due to severe pre-eclampsia, eclampsia or placental insufficiency) [14].

It has been shown that aPL not only induce the formation of thrombi in arterial or venous vessels, but also affect placentation by interfering with trophoblast differentiation, extravillous cytotrophoblast invasion into the decidua [16] and syncytiotrophoblast apoptosis [17].

As a significant number of patients fulfilling the clinical criteria for APS do not carry detectable aPL included in the latest classification criteria (seronegative APS), an effort has arisen in the last decade to discover new aPL with clinical implications. Among these aPL, anti-Phosphatidylserine/Prothrombin antibodies (aPS/PT) were described in 2000 by Tatsuya Atsumi, Laura Bertolaccini and others [18]. These aPL, which were not included in the latest classification criteria set up in Sydney in 2004 [14], target the coagulation factor prothrombin when attached to the phospholipid phosphatidylserine [18]. These aPS/PT have been associated with many clinical manifestations of APS, such as thrombosis, ischemic cerebral events [19] and adverse pregnancy outcomes [20].

This study aimed to study whether aPS/PT are relevant or commonly found in patients with RPL.

2. Materials and Methods

This is a case–control study with the inclusion of patients from 2016 to 2018. Clinical data and serum samples were collected and analyzed from 2016 to 2020, with a follow-up time of at least two years for each patient.

Patients were evaluated according to the ESHRE protocol for RPL after their latest pregnancy loss in the reproduction unit of our Center for gynecological (endometritis, myomas, hydrosalpinx), anatomical (endometrial polyps, uterine synechiae, malformations), genetic (abnormal karyotypes of progenitors or the product of conception) or endocrinological causes, obesity, hypertension, cardiac and renal disease. A total of 115 women without the previously mentioned causes for RPL were referred to the Immunology Clinic for further studies.

2.1. Laboratory Studies

Patients were studied for the presence of aPL, in accordance with the Sydney criteria: anticardiolipin (aCL) IgG and IgM, anti-beta-2-glycoprotein-I (aB2GPI) of IgG and IgM

isotypes, and lupus anticoagulant (LA). aCL and aB2GPI IgG/IgM were evaluated using a Bioplex-2200 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with our laboratory cutoffs (99th percentile). LA was measured using two methods, HemosIL dRVVT (cutoff ratio 1.20) and HemosIL Silica Clotting Time (cutoff ratio 1.30) assays (Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Italy). LA was performed in all patients without active anticoagulation therapy. Patients positive for aPL were studied for the presence of antinuclear antibodies (ANA) and anti-double stranded DNA (anti-dsDNA). ANA were tested by indirect immunofluorescence (IIF) on Hep2 cells and anti-dsDNA were studied using the Crithidia luciliae immunofluorescence test.

The QUANTA Lite ELISA (INOVA DIAGNOSTICS, San Diego, CA, USA) was used to evaluate aPS/PT IgG & IgM. We had previously described our calculated aPS/PT for our local population based on the 99th percentile, which resulted in 30 U/mL for IgG and 40 U/mL for IgM [21].

2.2. Patients and Groups

As seen in Figure 1, 85 of the 115 patients included in the study met the Sydney classification criteria for APS, and 30 did not. Patients who met the clinical criteria were divided into two major groups according to the pregnancy week at which the pregnancy loss took place. Fifty-two women (45.2%) who had three or more consecutive and unexplained miscarriages before pregnancy week 10 were included in the group called ‘Early Miscarriage’ (EM). Thirty-three patients (28.7%) who had one or more deaths of a morphologically normal fetus from pregnancy week 10 were included in the group called ‘Fetal Loss’ (FL). To facilitate the interpretation of the results, patients who had a history of miscarriages before pregnancy week 10, but also experienced some fetal deaths, were excluded.

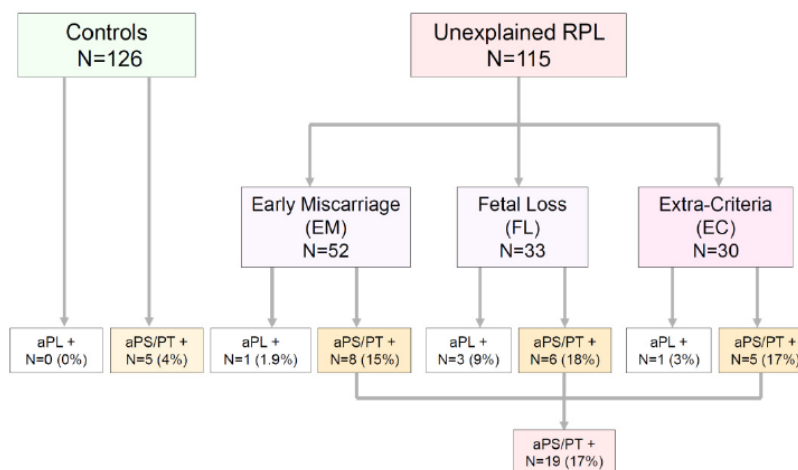


Figure 1. Positivities of criteria aPL (aPL) and aPS/PT among groups of patients and controls are shown. While positivity of criteria aPL did not surpass 10% in each one of the groups, aPS/PT was positive in 15–18% of patients.

As aPL are part of the ESHRE recommended studies for women with two consecutive and unexplained miscarriages before pregnancy week 10 [5], an additional group of 30 women (26%) who did not fulfill the Sydney classification criteria for APS (‘Extra-Criteria’ or EC) was formed.

The control group consisted of 126 patient-age-matched healthy women who had an uncomplicated pregnancy/labor and who delivered an alive newborn in 2017 in our Center.

2.3. Follow-Up and Treatment

Patients with positive aPL results were followed-up and treated with subcutaneous low molecular weight heparin (LMWH) in prophylactic doses (enoxaparin 40 mg/day or tinzaparin 4500 U/day) and acetylsalicylic acid (ASA) at 100 mg/day orally from the day of ovulation until the end of the cycle. It was maintained during pregnancy and puerperium, with the dose of LMWH adjusted to match an anti-Xa between 0.3 and 0.5 throughout the pregnancy. It was stopped during labor and was restarted after delivery for an additional period of six weeks. ASA was continued until pregnancy week 37. In five women positive for aPL previously treated with LMWH and ASA without success, Hydroxychloroquine (HCQ) was added to LMWH and ASA, starting preconceptionally at 200 mg/day orally. After a positive pregnancy test, it was increased to 200 mg/12 h orally. APS-related possible pregnancy morbidities such as miscarriage, fetal death, pre-eclampsia, intrauterine growth restriction, prematurity or stillbirth were registered during follow-up.

2.4. Ethics

This study adhered to the Declaration of Helsinki and received a favorable report from the Institutional Review Board (ECCR) of Hospital Universitario 12 de Octubre (Reference Numbers 18/182 and 13/405). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Clinical and analytical data were generated during the study and were stored in an anonymized database linked through a blind code.

2.5. Statistics

Qualitative variables were expressed as absolute values or percentages. Their associations were evaluated using Chi-Square or Fisher's exact tests. The relative measure of effects was expressed as the odds ratio. Continuous variables were expressed as medians with interquartile range (IQR), and the Mann-Whitney-U test was used for their comparison. Odds ratio calculations and Multivariate analyses were performed using a logistic regression model. Probabilities under 0.05 were considered significant. Data were analyzed using MedCalc version 18.9 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

3. Results

3.1. Demographics

As seen in Table 1, there were no statistically significant differences in age within the patient groups (median: 37, 95% confidence interval (CI): 35–38) or between the age of patients compared to the controls (median: 37, 95% CI: 35–38; $p = 0.510$). Although the more prevalent ethnicity of the participants in this study was white-Caucasic, the population gathered as controls was more diverse than the groups of patients. BMI and the prevalence of overweight (measured before pregnancy) were higher in healthy controls than in patients. Regarding previously treated patients, only 4.4% of patients received APS-related treatments such as LMWH and ASA before aPS/PT testing. None were treated with HCQ.

3.2. Levels and Prevalence of aPL in Patients and Controls

Median levels of criteria aPL resulted in non-statistically significant differences, as interquartile ranges overlapped among groups (See Table 2). Levels of aPS/PT IgG did not differ significantly between controls and the Early Miscarriage (EM) group ($p = 0.122$) or between controls and the Fetal Loss (FL) group ($p = 0.918$). Controls and the Extra-Criteria (EC) group displayed slightly different but significant median aPS/PT IgG levels ($p = 0.009$). Levels of aPS/PT IgM were similar between controls and FL ($p = 0.054$), and between controls and the EC group ($p = 0.127$).

Table 1. Demographics, cardiovascular risk factors and previous treatments.

	CONTROLS (126)	EM (52)	FL (33)	EC (30)	All RPL (115)
Age and cardiovascular risk factors					
Median age (IQR)	36 (35–37)	37 (34–39)	36 (29.5–39)	36 (33–38)	37 (33–39)
Median BMI (IQR)	27.1 (24.6–31.5)	24.1 (21.5–27.5)	25.6 (23.5–28.6)	24.7 (20.8–27.3)	24.4 (21.8–27.6)
Normal weight (%)	50 (39.7%)	39 (75%)	18 (54.5%)	19 (63.3%)	76 (66.1%)
Overweight (%)	50 (39.7%)	7 (13.4%)	11 (33%)	10 (33.3%)	28 (24.3%)
Obesity (%)	26 (20.6%)	6 (11.5%)	4 (12.1%)	1 (3.3%)	11 (9.5%)
Smoke (%)	13 (10.3%)	3 (5.7%)	2 (6%)	1 (3.3%)	6 (5.2%)
Alcoholism (%)	4 (3.1%)	1 (1.9%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.8%)
Ethnicity:					
African	3 (2.3%)	0 (0%)	2 (6%)	0 (0%)	2 (1.7%)
Arabic	9 (7.1%)	3 (5.7%)	2 (6%)	0 (0%)	5 (4.3%)
Chinese	11 (8.7%)	2 (3.8%)	1 (3%)	0 (0%)	3 (2.6%)
Caucasic	61 (48.4%)	41 (78.8%)	20 (60.6%)	27 (90%)	88 (76.5%)
Indian	2 (1.5%)	1 (1.9%)	1 (3%)	0 (0%)	2 (1.7%)
Hispanic	35 (27.7%)	5 (9.6%)	7 (21.2%)	3 (10%)	15 (13%)
Romani	5 (3.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Treatments:					
No previous treatment	-	50 (96.1%)	33 (100%)	27 (90%)	110 (95.6%)
ASA	-	2 (3.9%)	0 (0%)	3 (10%)	5 (4.4%)
LMWH	-	2 (3.9%)	0 (0%)	3 (10%)	5 (4.4%)
HCQ	-	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Cardiovascular risk factors such as age, Body Mass Index (BMI), overweight (BMI ≥ 25 and <30), obesity (BMI ≥ 30), smoking habit, alcoholism, normal weight, ethnicity and previous treatments are shown in the table above. A remarkable finding in our healthy control group is that a 60.3% of this cohort presented either overweight or obesity.

Table 2. Levels and prevalence of aPS/PT and criteria aPL.

aPL Levels (U/mL)	Median (IQR)				
aCL IgG	1.9 (1.9–1.9)	1.6 (1.6–1.6)	1.6 (1.6–1.6)	1.6 (1.6–1.6)	1.6 (1.6–1.6)
aCL IgM	1.9 (1.9–1.9)	1.4 (0.4–2)	0.7 (0.2–2.7)	1.4 (0.6–2.6)	0.9 (0.4–2.2)
aB2GPI IgG	1.9 (1.9–1.9)	1.4 (1.4–1.7)	1.4 (1.4–1.4)	1.4 (1.4–1.4)	1.4 (1.4–1.4)
aB2GPI IgM	1.9 (1.9–1.9)	1.4 (0.7–2.6)	0.8 (0.4–2.3)	1.4 (0.5–1.6)	1.4 (0.5–2.1)
aPS/PT IgG	7.4 (5.8–11.6)	7.5 (6.7–12.7)	7.4 (5.9–9.2)	10.7 (6.7–17.6)	7.8 (6.5–13)
aPS/PT IgM	12.3 (9.1–17.2)	19.1 (11.2–30.4)	16.4 (10.2–20.4)	14.8 (10.8–20.3)	17 (10.8–25.4)
aPL Prevalence	N (%)				
LA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Any criteria aPL	0 (0%)	2 (4%)	3 (9%)	1 (3%)	5 (4.3%)
Any aPS/PT	5 (3.9%)	8 (15%)	6 (18.1%)	5 (17%)	19 (17%)
aPS/PT IgG	2 (1.6%)	4 (7.7%)	0 (0%)	4 (13.3%)	8 (6.9%)
aPS/PT IgM	3 (2.4%)	4 (7.7%)	6 (18.1%)	1 (3.3%)	11 (9.5%)

While the prevalence of the antiphospholipid antibodies (aPL) criteria in the whole cohort of patients resulted in up to 5% of all patients with recurrent pregnancy loss (RPL), positive anti-Phosphatidylserine/Prothrombin (aPS/PT) were found in 17%. Differences in aPS/PT levels were observed for aPS/PT IgM between controls and the EM group ($p = 0.001$). aCL stands for anticardiolipin. aB2GPI stands for anti-Beta-2-Glycoprotein-I.

As shown in Figure 1, in the EM group, only one patient (1.9%) showed positive values for criteria aPL, whereas 51 (98.1%) were negative. Among the negative results, eight (16% of seronegative patients and 15.4% of the total EM group) had positive values for aPS/PT. In the FL group, three patients (9.1%) had positive criteria aPL, while 30 (90.9%) were negative. Among this latter group, five (16.6% of seronegative patients and 15.1% of the total FL group) resulted in positive values of aPS/PT. Only one patient in the group composed of 30 patients not fulfilling the Sydney criteria had a positive aCL IgM, whereas 29 were negative for any criteria aPL. Five of them (17.2%) had circulating aPS/PT. None of the controls had positive criteria aPL and five (2.9%) resulted in positive levels of aPS/PT. aPS/PT and overlapping aPL among patients are depicted in Figure 2.

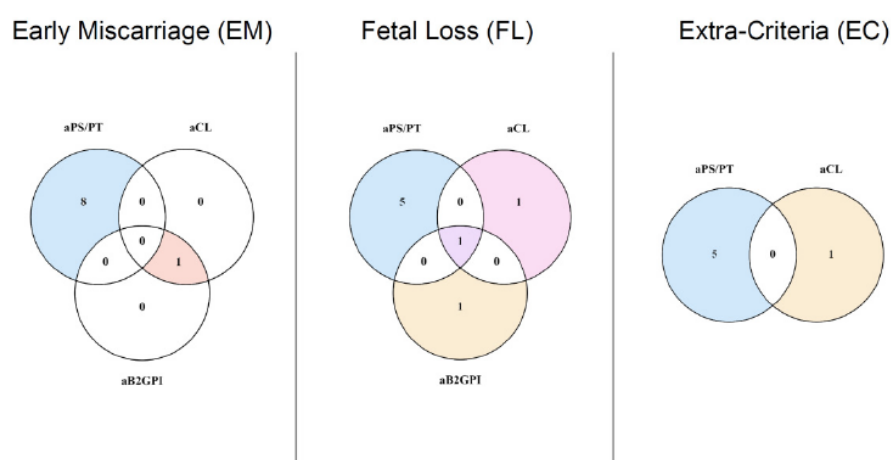


Figure 2. Venn diagrams of overlapping and isolated aPS/PT over criteria aPL. The number of women positive for aPS/PT, aCL and aB2GPI in each one of the groups in which patients were categorized is shown in this figure. LA is absent from this figure because none of our patients resulted in positive values. aPS/PT was mainly found in patients negative for criteria aPL.

3.3. Univariate Analysis of aPS/PT Risk for RPL

Positive aPS/PT resulted in a significant risk for EM (odds ratio (OR): 5.96. 95% CI: 1.85–19.13. $p = 0.002$), for FL (OR: 7.28. 95% CI: 2.07–25.56. $p = 0.002$) and for EC (OR: 6.56. 95% CI: 1.77–24.29. $p = 0.004$) at the univariate analysis.

3.4. Multivariate Analysis of aPS/PT and Criteria aPL Risk for RPL

A multivariate logistic regression analysis was performed to compare the risk posed by criteria aPL versus aPS/PT in our cohorts of patients. Women carrying positive aPS/PT had a greater risk for EM (OR: 6.24. 95% CI: 1.94–20.08. $p = 0.002$), while criteria aPL did not result in a statistically significant contribution ($p = 0.998$). A similar result was found for FL, with aPS/PT displaying a significant risk (OR: 6.56. 95% CI: 1.77–24.29. $p = 0.004$), and criteria aPL failing to pose a risk for the outcome ($p = 0.997$). Another multivariate analysis showed that positive aPS/PT posed a risk for miscarriage in the EC group (OR: 6.83. 95% CI: 1.84–25.36. $p = 0.004$), whereas criteria aPL did not contribute to the outcome ($p = 0.997$).

A further multivariate logistic regression analysis (see Table 3) explored the risk posed by aPS/PT, criteria aPL, age and known cardiovascular risk factors, such as obesity and smoking habit. In the EM group, only aPS/PT (OR: 4.44. 95% CI: 1.34–14.70. $p = 0.014$) resulted in a significant contribution for the outcome. In the FL group, aPS/PT (OR: 5.68. 95% CI: 1.54–20.88. $p = 0.008$) showed a statistical association with fetal loss. In the EC group, both obesity and aPS/PT were observed to influence the outcome. Whereas aPS/PT were shown to pose a risk (OR: 4.51. 95% CI; 1.14–17.73. $p = 0.031$), obesity performed a protective role in our cohorts (OR: 0.17. 95% CI; 0.03–0.78. $p = 0.022$). The differences in BMI were investigated between the EC group and controls, and we found a lower median in patients (24.71. 95% CI: 22.36–26.82) than in healthy controls (27.06. 95% CI: 26.35–28.01).

Table 3. Multivariate logistic regression analysis.

Variable	Early Miscarriage (EM) Group			Fetal Loss (FL) Group			Early Miscarriage (EM) Group		
	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value
Obesity	0.54	0.24–1.21	0.135	0.69	0.27–1.79	0.456	0.17	0.03–0.78	0.022
Smoking	0.45	0.11–1.80	0.264	0.46	0.08–2.37	0.355	0.30	0.03–2.60	0.275
aPS/PT	4.44	1.34–14.70	0.014	5.68	1.54–20.88	0.008	4.51	1.14–17.73	0.031

A multivariate logistic regression analysis comparing the influence of cardiovascular risk factors, such as obesity and smoking habit, in addition to aPS/PT and criteria aPL, was performed to weigh up the role of aPS/PT found in the univariate study. Smoking habit, obesity and criteria aPL did not pose a significant risk for any of the forms of RPL studied. In contrast, aPS/PT showed a contribution in risk of RPL in all groups. Obesity resulted in a protective factor for the EC group, probably led by the high prevalence of this particular cardiovascular risk factor among our healthy control cohort.

3.5. Response to Treatment and Patient Follow-Up

Table 4 shows the results, treatment and outcome after the intervention for all patients who tested positive for any of the studied aPL. Four patients with positive aPL received treatment in the EM group. Among them, three carrying aPS/PT IgG achieved a new and uncomplicated pregnancy, with the delivery of a healthy newborn. The remaining patient had positive aCL and aB2GPI of IgM isotype that resulted in a new miscarriage, despite targeted treatment. Four patients received treatment in the FL group. Two carried aPS/PT IgM, one aCL IgM and another aB2GPI IgG antibodies. All of them had a successful new pregnancy. There were four treated patients in the EC group who were positive for at least one of the aPL studied. Three of them carried aPS/PT IgG and one was positive for aCL IgM. All four had successful new pregnancies after treatment. None of the patients who achieved a new pregnancy experienced any of the APS-related obstetrical morbidities such as pre-eclampsia, intrauterine growth restriction, prematurity or stillbirth.

Table 4. Obstetrical history, aPL levels, treatment and outcome of patients carrying positive aPL.

Patient No	aPS/PT IgG	aPS/PT IgM	aCL IgG	aCL IgM	aB2GPI IgG	aB2GPI IgM	LA—dRVVT Ratio	LA—SCT Ratio	ANA	ANTI-DNA	Age	P	M	PW of PL before Treatment	Treatment	LMWH	ASA	HCQ	Outcome
EM1	30.6	12.2	1.6	0.2	1.4	0.9	1.03	0.98	N	N	34	4	3	6, 9, 6	Yes	Yes	Yes	Yes	Pregnancy and HN
EM2	47.3	23.3	1.6	4.1	1.5	5	0.99	1.08	N	N	40	4	3	6, 6, 8	Yes	Yes	Yes	No	Pregnancy and HN
EM3	42.1	15.2	1.6	0.7	1.4	0.6	1.14	1.17	N	N	39	5	4	VIP, 6, 5, 5, 6	Yes	Yes	Yes	No	Pregnancy and HN
EM4	13.5	40	1.6	0.2	2.18	1.4	0.84	1	N	N	35	4	4	9, 7, 9					
EM5	6.64	48	1.6	1.5	1.4	2.7	0.81	1.16	N	N	31	3	3	6, 8, 7					
EM6	33.2	23.4	1.6	5.8	1.4	5.6	0.96	1	N	N	39	4	4	8, 8, 6, 7					
EM7	12.5	59.5	1.6	0.2	1.4	0.3	0.98	0.94	N	N	40	4	3	Delivery, 6, 8, 9, 5					
EM8	6.06	42.5	1.6	2.4	1.4	2.8	0.95	0.93	N	N	4	4	4	6, 6, 9, 8					
EM9	8.05	38.2	14.5	52.4	12.6	56	1.03	1.09	N	N	35	6	6	6 PL < PW10	Yes	Yes	Yes	Yes	Miscarriage at PW 8
FL1	21.8	57.7	9.6	7.8	8.5	6.8	1.02	0.95	N	N	38	4	2	11, 13, 30	Yes	Yes	Yes	No	Pregnancy and HN
FL2	7.87	53.3	1.6	2.5	1.4	2.2	0.85	0.82	N	N	33	2	2	20, 40	Yes	Yes	Yes	No	Pregnancy and HN
FL3	11.3	71.6	1.6	0.5	1.4	0.5	1.13	1.27	N	N	31	5	4	12, 11, 12, 12					
FL4	21.6	64.3	73.7	22.2	87.7	23.2	1.05	1.26	N	N	41	3	3	18, 18, 18					
FL5	7.1	65.1	1.6	1.5	1.4	3.1	1.05	1.17	N	N	30	2	1	29 (Placental thrombi)					
FL6	7.47	74.8	1.6	8.6	1.4	8.6	0.99	1.13	N	N	38	5	3	12, 18, 15					
FL7	19	8.57	2.1	4.9	29.3	1.4	0.96	0.82	N	N	40	3	3	11, 11, 14	Yes	Yes	No	No	Pregnancy and HN
FL8	5.25	8.59	3.1	23.6	1.4	1.6	1	1.09	N	N	25	3	1	VIP, 16	Yes	Yes	No	No	Pregnancy and HN
EC1	40.1	20.3	1.6	0.2	1.4	0.2	0.87	0.96	N	N	32	2	2	7, 5	Yes	Yes	Yes	No	Pregnancy and HN
EC2	45.2	11.6	1.6	2	1.4	1.9	1.06	0.97	N	N	44	2	2	8, 6	Yes	Yes	Yes	Yes	Pregnancy and HN
EC3	53.5	33.8	1.6	1.6	1.4	2.5	1	1.1	N	N	38	2	2	8, 5	Yes	Yes	Yes	Yes	Pregnancy and HN
EC4	5.87	52.7	1.6	0.6	1.4	0.5	0.89	1.17	N	N	35	2	2	9, 6					
EC5	206	10.8	1.6	1.8	3.07	1.4	0.95	1.23	N	N	43	2	2	7, 8					
EC6	9.05	9.47	2.5	47.1	1.4	6.8	0.97	1.19	N	N	34	4	2	2 Deliveries, 9, 6	Yes	Yes	Yes	No	Pregnancy and HN

Rows start with the first column identifying the case number within each of the patients' groups (Early Miscarriage or EM, Fetal Loss or FL and Extra-Criteria or EC). Bold values in the first column indicate positive aPS/PT cases. All of them who received targeted treatment achieved a new pregnancy, with delivery of an alive newborn. All patients resulted negative in LA (dRVVT ratio and SCT ratio), ANA and anti-dsDNA testing. P stands for the number of pregnancies, M stands for the number of miscarriages, PW stands for pregnancy week, VIP stands for voluntary interruption of pregnancy, PL stands for pregnancy loss and HN stands for healthy newborn.

4. Discussion

In our cohort composed of infertile but otherwise healthy women with RPL, we found that aPS/PT antibodies were more prevalent than aCL, aB2GPI and LA. Furthermore, these antibodies were mostly detected in women negative for other aPL. Both univariate and multivariate logistic regression analyses compared to criteria aPL recognized aPS/PT as significant risk factors for RPL, regardless at which week of pregnancy the loss happened. A good response to treatment was observed for all women who were positive for aPS/PT, thus giving strength to the possible involvement of these antibodies in the pathogenesis of some women with RPL. Secondly, we found that the prevalence, the statistical association and the response to the treatment of women with RPL carrying aPS/PT were similar in patients with two and three or more consecutive and unexplained miscarriages before pregnancy week 10. The concept of recurrent miscarriages is a matter of debate, with many groups considering a less rigorous definition [22]. We think our findings could reinforce the current recommendation for aPL testing after two miscarriages made by the ESHRE. This would help avoid the requirement of having a third consecutive miscarriage, which is required by the current classification criteria for APS [14].

It needs to be mentioned that we designed our study to exclude patients with a history of thrombosis, or those who had a diagnosis or symptoms related to other systemic autoimmune diseases such as SLE. We think this exclusion criteria could explain why none of our patients had positive LA, which is associated with a high risk of thrombosis. We think that the characteristics of the included patients show a greater resemblance to the average patient seen in the reproductive medicine units than those with complex diseases with dysregulated immune responses frequently evaluated in immunology clinics. However, this strict patient selection could bias our results and contribute to the low prevalence of aB2GPI, aCL and LA, given that the population tested was infertile but otherwise healthy. Another explanation for the low frequency of criteria aPL among our cohorts of patients could be the absence of a clear role of these antibodies in the pathogenesis of early miscarriages [23]. This has been reported and discussed earlier by Branch et al. [24] and by Clark et al. [23], who suggested that the mechanisms of aPL-mediated early miscarriages might be different from those causing late pregnancy loss or placental infarction.

Since aPS/PT have been proposed as a surrogate marker for LA in many research studies, it is remarkable that we found patients who tested positive for aPS/PT and negative for LA. Our results differ highly from the previously described correlation between aPS/PT and LA [25,26]. These conflicting results could be explained by the nature of patients included in our cohort, composed of infertile but otherwise healthy women and without diagnosis of other systemic autoimmune diseases or thrombosis episodes. However, we [27] and others [28,29] have previously commented on the discrepancy of aPS/PT and LA results in different cohorts of patients.

More work needs to be performed to address the pathogenicity of these aPS/PT and their correlation, or lack thereof, with LA in women with only obstetric manifestations of APS. An interesting article on the identification of different populations of aPS/PT was published recently by Chinnaraj and coworkers. They described that aPS/PT are a family of different antibodies all targeting phosphatidylserine-prothrombin complex but with different binding epitopes [30]. Depending on the epitope they target, some aPS/PT can bind to open or closed forms of prothrombin [30]. As far as we know, this type of study has not yet been carried out in obstetric APS patients, but it would help to elucidate why some women with isolated aPS/PT develop miscarriages and others do not, and why some women develop miscarriages earlier than others.

Testing of aPS/PT has increased since it was described in 2000 [18], with many groups showing the potential value of these aPL, which currently fall outside the Sydney classification criteria [14]. A systematic review of their association with the clinical manifestations of APS was published recently by Radin et al. [31]. In the pregnancy morbidity setting, our results are in line with those achieved by Zigon et al., who found a similar prevalence of aPS/PT in women with RPL [20]. In contrast to this study, Zigon et al. included,

among women with RPL, 6% of patients with a history of thrombosis. Other groups have also tested aPS/PT in their patients with obstetrics manifestations. Among them, Mekinian et al. published a paper using the same aPS/PT detection kit but broader inclusion criteria. Their patients included women with at least three miscarriages before week 10, but also women with fetal loss, pre-eclampsia and prematurity due to placental insufficiency. In their study, 46% of patients presented concomitantly aPS/PT and other criteria aPL or LA, while isolated positives accounted only for 4.7% [32]. Other groups recently tested other Extra-Criteria aPL, with promising results such as anti-phosphatidylethanolamine antibodies [33,34].

Regarding treatment strategies and outcomes, previous works and a recent meta-analysis [35] have shown that LMWH in addition to ASA have improved the rate of successful pregnancies in women with obstetrical APS up to 80–85% [36]. Conversely, this benefit was not found in women with inherited thrombophilia, such as factor V Leyden, protein C, protein S or antithrombin deficiency [37]. Despite the progress achieved with LMWH and ASA in obstetric APS, there is still a 15–20% of cases refractory with this combination therapy [38,39]. The addition of HCQ, a drug possibly capable of restoring some of the damage exerted by aPL on trophoblasts in mice models [40,41], has been regarded as the next step in obstetrical APS treatment [42]. This drug has been reported to be safe in pregnancy and in women with obstetric APS pregnancies, with no [43,44] or minor side-effects [45], probably due to a limited duration of treatment [46]. However, we decided to be cautious and only prescribe HCQ to patients with a previously unsuccessful treatment regimen with LMWH and ASA. Moreover, HCQ has showed to reduce the incidence of early severe preeclampsia in patients with obstetric APS [47] and to improve birth rate [43,46,48].

Despite our encouraging results, we acknowledge that our study has several limitations. This is a single-center study with a low number of enrolled patients and a healthy control group whose ethnicity differed among patients. We also acknowledge that the prevalence of obesity among our healthy controls could be a bias within our data. In addition, the patients included in this study were mainly women without a known explanation for RPL. It would be interesting to test aPS/PT in a larger study that not only considers women with unexplained RPL but also patients with other identified causes in order to check for the additive effect of different variables. Along the same lines, more follow-up data and responses to treatment information would have been of interest to better address the role of aPS/PT in RPL. Further collaborative studies are needed to undertake these limitations.

5. Conclusions

The aPS/PT were the most prevalent aPL in healthy women with two or more consecutive miscarriages or one or more fetal deaths. Women carrying aPS/PT were mostly negative for other aPL. These antibodies acted as independent risk factors, both at the univariate and the multivariate logistic regression analysis compared to aCL and aB2GPI. All patients who had positive aPS/PT and received targeted treatment with heparin, aspirin and/or hydroxychloroquine achieved a new successful pregnancy in the follow-up.

Author Contributions: Conceptualization, D.E.P. and A.S.; Data Curation, D.E.P. and A.S.; Formal Analysis, D.E.P.; Funding Acquisition, D.E.P. and A.S.; Investigation, D.E.P., O.C.-M., M.A., A.V., L.N., O.V., F.J.G.-E., M.S., E.A.R.-F., L.d.l.F.-B. and A.S.; Methodology, D.E.P., A.S., A.P.-R. and L.d.l.F.-B.; Project Administration, D.E.P., L.d.l.F.-B. and A.S.; Resources, A.S., A.P.-R. and L.d.l.F.-B.; Software, D.E.P. and A.S.; Supervision, D.E.P., L.d.l.F.-B. and A.S.; Validation, D.E.P. and A.S.; Visualization, D.E.P. and A.S.; Writing—Original Draft, D.E.P.; Writing—Review and Editing, D.E.P., O.C.-M., M.A., E.A.R.-F. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant numbers PI17-00147 and PI20-01361 from “Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III” (Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, co-funded by European Regional Development Funds).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (ECCR) of Hospital Universitario 12 de Octubre (Reference Numbers 18/182 and 13/405).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data included in the article have been generated within our hospital and are included in this article. Further data available on request.

Acknowledgments: We would like to thank Margarita Sevilla and Carmen Caballero for their support and assistance in laboratory procedures, and Barbara Shapiro for her excellent translation work and English revision of this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ford, H.B.; Schust, D.J. Recurrent pregnancy loss: Etiology, diagnosis, and therapy. *Rev. Obstet. Gynecol.* **2009**, *2*, 76–83. [PubMed]
2. Vomstein, K.; Feil, K.; Strobel, L.; Aulitzky, A.; Hofer-Tollinger, S.; Kuon, R.J.; Toth, B. Immunological Risk Factors in Recurrent Pregnancy Loss: Guidelines Versus Current State of the Art. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 869. [CrossRef]
3. Hennessy, M.; Dennehy, R.; Meaney, S.; Devane, D.; O'Donoghue, K. A protocol for a systematic review of clinical practice guidelines for recurrent miscarriage. *HRB Open Res.* **2020**, *3*, 12. [CrossRef]
4. WHO. Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **1977**, *56*, 247–253.
5. RPL, E.G.G.o.; Bender Atik, R.; Christiansen, O.B.; Elson, J.; Kolte, A.M.; Lewis, S.; Middeldorp, S.; Nelen, W.; Peramo, B.; Quenby, S.; et al. ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss. *Hum. Reprod Open* **2018**, *2018*, hoy004.
6. Rai, R.; Regan, L. Recurrent miscarriage. *Lancet* **2006**, *368*, 601–611. [CrossRef]
7. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertil. Steril.* **2012**, *98*, 1103–1111. [CrossRef]
8. Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. *Obstet. Gynecol.* **2019**, *133*, e377–e384. [CrossRef] [PubMed]
9. Shetty, S.; Ghosh, K. Anti-phospholipid antibodies and other immunological causes of recurrent foetal loss—A review of literature of various therapeutic protocols. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2009**, *62*, 9–24. [CrossRef] [PubMed]
10. Ruiz-Irastorza, G.; Crowther, M.; Branch, W.; Khamashta, M.A. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* **2010**, *376*, 1498–1509. [CrossRef]
11. Harris, E.N.; Gharavi, A.E.; Boey, M.L.; Patel, B.M.; Mackworth-Young, C.G.; Loizou, S.; Hughes, G.R. Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* **1983**, *2*, 1211–1214. [CrossRef]
12. Cervera, R.; Serrano, R.; Pons-Estel, G.J.; Cervera, R.; Shoenfeld, Y.; de Ramon, E.; Buonaiuto, V.; Jacobsen, S.; Zeher, M.M.; Tarr, T.; et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: A multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 1011–1018. [CrossRef] [PubMed]
13. Asherson, R.A. The catastrophic antiphospholipid syndrome, 1998. A review of the clinical features, possible pathogenesis and treatment. *Lupus* **1998**, *7* (Suppl. 2), S55–S62. [CrossRef] [PubMed]
14. Miyakis, S.; Lockshin, M.D.; Atsumi, T.; Branch, D.W.; Brey, R.L.; Cervera, R.; Derksen, R.H.; PG, D.E.G.; Koike, T.; Meroni, P.L.; et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 295–306. [CrossRef]
15. Gardiner, C.; Hills, J.; Machin, S.J.; Cohen, H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice. *Lupus* **2013**, *22*, 18–25. [CrossRef] [PubMed]
16. Di Simone, N.; Meroni, P.L.; de Papa, N.; Raschi, E.; Caliandro, D.; De Carolis, C.S.; Khamashta, M.A.; Atsumi, T.; Hughes, G.R.; Balestrieri, G.; et al. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 140–150. [CrossRef]
17. Di Simone, N.; Castellani, R.; Caliandro, D.; Caruso, A. Monoclonal anti-annexin V antibody inhibits trophoblast gonadotropin secretion and induces syncytiotrophoblast apoptosis. *Biol. Reprod.* **2001**, *65*, 1766–1770. [CrossRef]
18. Atsumi, T.; Ieko, M.; Bertolaccini, M.L.; Ichikawa, K.; Tsutsumi, A.; Matsuura, E.; Koike, T. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 1982–1993. [CrossRef]
19. Sciascia, S.; Amigo, M.C.; Roccatello, D.; Khamashta, M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 548–560. [CrossRef]
20. Zigon, P.; Perdan Pirkmajer, K.; Tomsic, M.; Kveder, T.; Bozic, B.; Sodin Semrl, S.; Cucnik, S.; Ambrozic, A. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies Are Associated with Adverse Pregnancy Outcomes. *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, 975704. [CrossRef] [PubMed]

21. Serrano, M.; Espinosa, G.; Lalueza, A.; Bravo-Gallego, L.Y.; Diaz-Simon, R.; Garcinuno, S.; Gil-Etayo, J.; Moises, J.; Naranjo, L.; Prieto-Gonzalez, S.; et al. Beta-2-Glycoprotein-I Deficiency Could Precipitate an Antiphospholipid Syndrome-like Prothrombotic Situation in Patients With Coronavirus Disease 2019. *ACR Open Rheumatol.* **2021**, *3*, 267–276. [[CrossRef](#)]
22. Santos, T.D.S.; Ieque, A.L.; de Carvalho, H.C.; Sell, A.M.; Lonardon, M.V.C.; Demarchi, I.G.; de Lima Neto, Q.A.; Teixeira, J.J.V. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *J. Reprod. Immunol.* **2017**, *123*, 78–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Clark, C.A.; Laskin, C.A.; Spitzer, K.A. Anticardiolipin antibodies and recurrent early pregnancy loss: A century of equivocal evidence. *Hum. Reprod. Update* **2012**, *18*, 474–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Branch, D.W. What's new in obstetric antiphospholipid syndrome. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2019**, *2019*, 421–425. [[CrossRef](#)]
25. Rai, R.S.; Regan, L.; Clifford, K.; Pickering, W.; Dave, M.; Mackie, I.; McNally, T.; Cohen, H. Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: Results of a comprehensive screening approach. *Hum. Reprod.* **1995**, *10*, 2001–2005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bertolaccini, M.L. Antibodies to prothrombin. *Lupus* **2012**, *21*, 729–731. [[CrossRef](#)]
27. Serrano, A.; Cabrera-Marante, O.; Naranjo, L.; Diaz-Simon, R.; Pleguezuelo, D.E. Inclusion of anti-B2GPI-IgA and anti-Phosphatidylserine/Prothrombin in the classification criteria would double the diagnoses of APS. *Lupus* **2019**, *28*, 30.
28. Pengo, V. Additional laboratory tests to improve on the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18*, 1846–1848. [[CrossRef](#)]
29. Bertolaccini, M.L.; Sciascia, S.; Murru, V.; Garcia-Fernandez, C.; Sanna, G.; Khamashta, M.A. Prevalence of antibodies to prothrombin in solid phase (aPT) and to phosphatidylserine-prothrombin complex (aPS/PT) in patients with and without lupus anticoagulant. *Thromb. Haemost.* **2013**, *109*, 207–213.
30. Chinnaraj, M.; Planer, W.; Pengo, V.; Pozzi, N. Discovery and characterization of 2 novel subpopulations of aPS/PT antibodies in patients at high risk of thrombosis. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 1738–1749. [[CrossRef](#)]
31. Radin, M.; Foddai, S.G.; Cecchi, I.; Rubini, E.; Schreiber, K.; Roccatello, D.; Bertolaccini, M.L.; Sciascia, S. Antiphosphatidylserine/Prothrombin Antibodies: An Update on Their Association with Clinical Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. *Thromb. Haemost.* **2020**, *120*, 592–598. [[CrossRef](#)]
32. Mekinian, A.; Bourrienne, M.C.; Carbillon, L.; Benbara, A.; Noemie, A.; Chollet-Martin, S.; Tigaizin, A.; Montestruc, F.; Fain, O.; Nicaise-Roland, P. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: Prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin. Arthritis Rheum.* **2016**, *46*, 232–237. [[CrossRef](#)]
33. Yonezawa, M.; Kuwabara, Y.; Ono, S.; Ouchi, N.; Ichikawa, T.; Takeshita, T. Significance of Anti-Phosphatidylethanolamine Antibodies in the Pathogenesis of Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod. Sci.* **2020**, *27*, 1888–1893. [[CrossRef](#)]
34. Abisror, N.; Nguyen, Y.; Marozio, L.; Esteve Valverde, E.; Udry, S.; Pleguezuelo, D.E.; Billoir, P.; Mayer-Pickel, K.; Urbanski, G.; Zigon, P.; et al. Obstetrical outcome and treatments in seronegative primary APS: Data from European retrospective study. *RMD Open* **2020**, *6*, e001340. [[CrossRef](#)]
35. Hamulyak, E.N.; Scheres, L.J.; Marijnen, M.C.; Goddijn, M.; Middeldorp, S. Aspirin or heparin or both for improving pregnancy outcomes in women with persistent antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, *5*, CD012852. [[PubMed](#)]
36. Alijotas-Reig, J.; Esteve-Valverde, E.; Ferrer-Oliveras, R.; Saez-Comet, L.; Lefkou, E.; Mekinian, A.; Belizna, C.; Ruffatti, A.; Tincani, A.; Marozio, L.; et al. The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): A survey of 1000 consecutive cases. *Autoimmun. Rev.* **2019**, *18*, 406–414. [[CrossRef](#)]
37. Skeith, L.; Carrier, M.; Kaaja, R.; Martinelli, I.; Petroff, D.; Schleussner, E.; Laskin, C.A.; Rodger, M.A. A meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent pregnancy loss in women with inherited thrombophilia. *Blood* **2016**, *127*, 1650–1655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Schreiber, K.; Radin, M.; Sciascia, S. Current insights in obstetric antiphospholipid syndrome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2017**, *29*, 397–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bouvier, S.; Cochery-Nouvellon, E.; Lavigne-Lissalde, G.; Mercier, E.; Marchetti, T.; Balducchi, J.P.; Mares, P.; Gris, J.C. Comparative incidence of pregnancy outcomes in treated obstetric antiphospholipid syndrome: The NOH-APS observational study. *Blood* **2014**, *123*, 404–413. [[CrossRef](#)]
40. Albert, C.R.; Schlesinger, W.J.; Viall, C.A.; Mulla, M.J.; Brosens, J.J.; Chamley, L.W.; Abrahams, V.M. Effect of hydroxychloroquine on antiphospholipid antibody-induced changes in first trimester trophoblast function. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2014**, *71*, 154–164. [[CrossRef](#)]
41. Marchetti, T.; Ruffatti, A.; Wuillemin, C.; de Moerloose, P.; Cohen, M. Hydroxychloroquine restores trophoblast fusion affected by antiphospholipid antibodies. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 910–920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Meroni, P.L. Prevention & treatment of obstetrical complications in APS: Is hydroxychloroquine the Holy Grail we are looking for? *J. Autoimmun.* **2016**, *75*, 1–5. [[PubMed](#)]
43. Mekinian, A.; Lazzaroni, M.G.; Kuzenko, A.; Alijotas-Reig, J.; Ruffatti, A.; Levy, P.; Cinti, V.; Bremme, K.; Bezanahary, H.; Bertero, T.; et al. The efficacy of hydroxychloroquine for obstetrical outcome in anti-phospholipid syndrome: Data from a European multicenter retrospective study. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 498–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. De Carolis, S.; Botta, A.; Salvi, S.; di Pasquo, E.; Del Sordo, G.; Garufi, C.; Lanzone, A.; De Carolis, M.P. Is there any role for the hydroxychloroquine (HCQ) in refractory obstetrical antiphospholipid syndrome (APS) treatment? *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 760–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ruffatti, A.; Tonello, M.; Hoxha, A.; Sciascia, S.; Cuadrado, M.J.; Latino, J.O.; Udry, S.; Reshetnyak, T.; Costedoat-Chalumeau, N.; Morel, N.; et al. Effect of Additional Treatments Combined with Conventional Therapies in Pregnant Patients with High-Risk Antiphospholipid Syndrome: A Multicentre Study. *Thromb. Haemost.* **2018**, *118*, 639–646.
46. Ruffatti, A.; Tonello, M.; Favaro, M.; Del Ross, T.; Calligaro, A.; Ruffatti, A.T.; Gervasi, M.T.; Hoxha, A. The efficacy and safety of second-line treatments of refractory and/or high risk pregnant antiphospholipid syndrome patients. A systematic literature review analyzing 313 pregnancies. *Semin. Arthritis Rheum.* **2021**, *51*, 28–35. [[CrossRef](#)]
47. Latino, J.O.; Udry, S.; Aranda, F.; Wingeyer, S.P.; Romero, D.S.F.; Belizna, C.; Larranaga, G. Risk factors for early severe preeclampsia in obstetric antiphospholipid syndrome with conventional treatment. The impact of hydroxychloroquine. *Lupus* **2020**, *29*, 1736–1742. [[CrossRef](#)]
48. Tian, Y.; Xu, J.; Chen, D.; Yang, C.; Peng, B. The additional use of hydroxychloroquine can improve the live birth rate in pregnant women with persistent positive antiphospholipid antibodies: A systematic review and meta-analysis. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **2021**, *50*, 102121. [[CrossRef](#)]

8.2. Artículo original publicado en *RMD Open* con la siguiente signatura: Abisror N, Nguyen Y, Marozio L, Esteve Valverde E, Udry S, Pleguezuelo DE, Billoir P, Mayer-Pickel K, Urbanski G, Zigon P, De Moreuil C, Hoxha A, Bezanahary H, Carbillon L, Kayem G, Bornes M, Yelnik C, Johanet C, Nicaise-Roland P, Lambert M, Salle V, Latino OJ, Hachulla E, Benedetto C, Bourrienne MC, Benhamou Y, Alijotas-Reig J, Fain O, Mekinian A; European Forum on Antiphospholipid Antibodies. Obstetrical outcome and treatments in seronegative primary APS: data from European retrospective study. *RMD Open*. 2020 Aug;6(2):0. doi: 10.1136/rmdopen-2020-001340. PMID: 32848089; PMCID: PMC7507995.

Original research

Obstetrical outcome and treatments in seronegative primary APS: data from European retrospective study

Noemie Abisror,¹ Yann Nguyen ², Luca Marozio,³ Enrique Esteve Valverde,⁴ Sebastian Udry,⁵ Daniel Enrique Pleguezuelo,⁶ Paul Billoir,⁷ Karoline Mayer-Pickel,⁸ Geoffrey Urbanski,⁹ Polona Zigon,¹⁰ Claire De Moreuil,^{11,12} Ariela Hoxha,¹³ Holy Bezanahary,¹⁴ Lionel Carbillon ^{15,16}, Gilles Kayem,^{17,18} Marie Bomes,¹⁹ Cecile Yelnik,²⁰ Cathererine Johanet,²¹ Pascale Nicaise-Roland,²² Marc Lambert,²⁰ Valéry Salle,²³ Omar Jose Latino,⁵ Eric Hachulla ²⁰, Chiara Benedetto,³ Marie Charlotte Bourrienne,^{24,25} Ygal Benhamou,⁷ Jaume Alijotas-Reig,^{26,27} Olivier Fain,¹ Arsène Mekinian ¹ On behalf of European Forum on Antiphospholipid Antibodies

To cite: Abisror N, Nguyen Y, Marozio L, *et al.* Obstetrical outcome and treatments in seronegative primary APS: data from European retrospective study. *RMD Open* 2020;6:e001340. doi:10.1136/rmdopen-2020-001340

► Supplemental material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001340>).

Received 28 May 2020
Revised 27 June 2020
Accepted 23 July 2020



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Arsène Mekinian;
arsene.mekinian@aphp.fr

ABSTRACT

Objective To compare characteristics, pregnancies and treatments during pregnancies of seronegative and seropositive antiphospholipid syndrome (APS), to analyse factors associated with obstetrical outcome.

Patients and methods Inclusion criteria were: (1) thrombotic and/or obstetrical APS (Sydney criteria); (2) absence of conventional antiphospholipid antibodies (APL); (3) at least one persistent non-conventional APL among IgA anticardiolipin antibodies, IgA anti-β2GPI, anti-vimentin G/M, anti-annexin V G/M, anti-phosphatidylethanolamine G/M and anti-phosphatidylserine/prothrombin G/M antibodies. The exclusion criteria were: (1) systemic lupus erythematosus (SLE) or SLE-like disease; and (2) other connective tissue disease.

Results A total of 187 women (mean 33±5 years) with seronegative APS were included from 14 centres in Austria, Spain, Italy, Slovenia and France and compared with 285 patients with seropositive APS. Seronegative APS has more obstetrical rather than thrombotic phenotypes, with only 6% of venous thrombosis in comparison to seropositive APS. Cumulative incidence of adverse obstetrical events was similar in seronegative and seropositive APS patients, although higher rates of intrauterine deaths (15% vs 5%; $p=0.03$), of preeclampsia (7% vs 16%, $p=0.048$) and lower live birth term (36 ± 3 vs 38 ± 3 weeks of gestation; $p=0.04$) were noted in seropositive APS. The cumulative incidence of adverse obstetrical events was significantly improved in treated versus untreated seronegative APS (log rank <0.05), whereas there was no difference between patients who received aspirin or aspirin-low-molecular weight heparin combination.

Conclusion Several non-criteria APL can be detected in patients with clinical APS features without any conventional APL, with various rates. The detection of non-criteria APL and thus the diagnosis of seronegative APS could discuss the therapeutic management similar to seropositive APS, but well-designed controlled studies are necessary.

Key messages

What is already known about this subject?

► Several studies reported about seronegative APS mainly defined by clinical criteria and among them the series with clinical criteria and at least one positive non-criteria APL are lacking.

What does this study add?

► Several non-criteria APL can be detected in patients with clinical features consistent with APS without any conventional APL, with various prevalent rates.

How might this impact on clinical practice?

► The detection of non-criteria APL and thus the diagnosis of seronegative APS could discuss the therapeutic management similar to seropositive APS, but well-designed controlled studies are necessary.

INTRODUCTION

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterised by vascular thrombosis, various obstetrical adverse events and persistent antiphospholipid antibodies (APL). The conventional APL includes lupus anticoagulant (LA), IgG/M anticardiolipin antibodies (aCL) and IgG/M antibodies against β2GPI (anti-β2GPI) antibodies.¹ Seronegative APS has been recently defined in patients with obstetrical and thrombotic clinical APS features (Sydney criteria), but without detectable conventional APL.² In seronegative APS, the possibility of persistent non-criteria APL has been raised. Several non-criteria antiphospholipid antibodies, such as IgA aCL and

anti- β 2GPI, anti-phosphatidylethanolamine (anti-PE), anti-phosphatidylserine/prothrombin (anti-PS/PT), anti-vimentin and anti-annexin V and II antibodies can actually be tested.³⁻⁶ However, there is a paucity of studies evaluating the link between these autoantibodies and clinical status, in particular for obstetrical outcomes.⁷ Studies mostly evaluated the prevalence of these persistent non-criteria APL in thrombotic clinical subsets, showing 10–15% of prevalent among patients with unexplained venous thrombosis. Accurate identification of patients with APS is essential, as treatment during pregnancy significantly improves the fetal and maternal outcomes.⁸ Studies reporting pregnancy outcomes in seronegative clinical APS with presence of non-criteria APL, treatments and comparison of this condition to seropositive APS are still lacking. From this retrospective European study we aimed to (1) describe the clinical and laboratory features of seronegative clinical APS with detectable persistent non-criteria APL; (2) describe the fetal, maternal outcomes and the treatments during pregnancies; (3) compare seronegative APS to seropositive APS women and (4) analyse factors associated with adverse obstetrical outcomes in seronegative and seropositive APS.

PATIENTS AND METHODS

Patients' selection

A retrospective study was initiated with the European Forum on Antiphospholipid Antibodies from 2017 to 2019 and all practitioners were asked to fill a standardised excel form.

Inclusion criteria were: (1) arterial and/or venous thrombotic; and/or obstetrical primary clinical APS (Sydney criteria) (not explained by usual causes, p.e. chromosomal, uterine, hormonal, etc., abnormalities for recurrent miscarriages); (2) absence of conventional antiphospholipid antibodies; (3) presence of at least one persistent non-conventional APL among IgA aCL, IgA anti- β 2GPI, anti-vimentin G/M, anti-annexin V G/M, anti-PE G/M, anti-PS/PT G/M antibodies and (4) at least one pregnancy after the diagnosis of seronegative APS. The clinical APS criteria for thrombosis were otherwise unexplained thrombosis and for obstetrical events recurrent unexplained early miscarriages, unexplained intrauterine deaths and/or preeclampsia and prematurity from placental insufficiency otherwise unexplained.

The exclusion criteria were: (1) associated systemic lupus erythematosus (SLE) or SLE-like disease (SLE features and/or positive antinuclear autoantibodies) and (2) other systemic connective tissue disease (Sjogren's syndrome, systemic sclerosis, myositis, etc.).

Maternal age, characteristics of previous thrombosis and obstetrical features, associated thrombotic and cardiovascular factors (obesity, hypercholesterolaemia, tobacco use, diabetes mellitus, arterial hypertension, constitutional thrombophilia), course and outcome of previous pregnancies and treatments during the pregnancies were recorded. Adverse pregnancy outcomes included early

miscarriage (<10 weeks of gestation), fetal loss (\geq 10 weeks of gestation), intra-uterine growth restriction (IUGR), prematurity (<34 weeks of gestation), pre-eclampsia or eclampsia, hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count (HELLP) syndrome, placental abruption, gestational arterial hypertension and arterial and/or venous thrombosis during the pregnancy. All these data were included in standardised electronic files which were filled by the practitioner of each patient.

Non-criteria APL testing included anti- β 2GPI IgA, anti-annexin V antibodies, anti-PE IgG and IgM antibodies, anti-PS/PT IgG and IgM antibodies, IgA aCL or anti-vimentin antibodies. For patients with at least one positive non-criteria APL, non-criteria APL positivity was confirmed to be persistent at 12 weeks. Because of non-standardised tests for seronegative APL, APL were expressed as positives or negatives at 99^o percentiles, without considering the titers.

The control group was selected among women with primary seropositive APS (Sydney criteria), included in the French APS and Lupus Registry. This registry retrospectively included APS patients, mainly in two referral centres (Cochin and Lille hospitals). The exclusion criteria were the same as for the seronegative APS: (1) associated SLE or SLE-like disease (SLE features and/or positive antinuclear autoantibodies) and (2) other systemic connective tissue disease (Sjogren's syndrome, systemic sclerosis, myositis, etc.). For the first analysis comparing phenotypes among seropositive and seronegative APS patients, we selected all APS women included in the registry, including obstetrical and thrombotic APS phenotypes and excluding SLE-associated APS. For the comparison of subsequent pregnancies following APS diagnosis, we only selected women with seropositive APS (obstetrical and/or thrombotic phenotype), who had at least one registered pregnancy after the APS diagnosis similarly to the seronegative APS women.

Statistical analysis

Descriptive analyses were expressed as proportions (%) for categorical variables and means (SD) for continuous variables. First, we compared phenotypes from all seronegative and seropositive APS patients, using t-tests for continuous variables and Chi-squared tests for categorical variables. Then, we compared the pregnancy outcomes occurring after APS diagnosis. To study obstetrical outcomes, we chose the following outcomes: fetal loss <10 weeks, fetal loss \geq 10 weeks, premature birth <34 weeks of gestation, maternal complications (HELLP and/or preeclampsia, thrombosis) and the presence of any of these events. To assess the association between APL status and obstetrical outcomes, univariate analyses were performed using t-tests for continuous variables, and chi-squared tests for categorical variables. We subsequently used multivariate models using logistic regressions, with all variables associated with the outcome ($p < 0.2$) in univariate analyses. In those analyses, missing variables were imputed using multiple imputations. Kaplan–Meier

curves and log-rank tests were used to compare the cumulative incidence of adverse obstetrical events first according to the treatment among seronegative APS, then comparing seronegative and seropositive APS. All analyses were performed using R software, version 3.4.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

A total of 187 women (mean age 33±5 years) with seronegative APS were included from 14 centres in Austria, Spain, Italy, Slovenia and France and compared with 285 patients with seropositive APS (table 1). Seronegative APS had mostly obstetrical phenotypes rather than venous thrombosis, with only 6% having experienced a venous thrombosis. Non-criteria APL in seronegative APS were anti-β2GPI IgA antibodies (n=3/127), anti-annexin V antibodies (n=43/185), anti-PE IgG (n=19/124) and IgM antibodies (n=43/124), anti-PS/PT IgG (n=66/186) and IgM antibodies (n=69/186), without any IgA aCL (n=0/53) or anti-vimentin antibodies

Table 1 Characteristics of seronegative and seropositive APS women

	Seronegative APS (n=187)	Seropositive APS (n=285)
General characteristics		
Caucasian (n; %)	150 (82)	188 (66)
Age (years)	33±5	36±5†
Obesity (n; %)	15 (9)	32 (11)
Arterial hypertension (n; %)	3 (2)	54 (19)†
Diabetes mellitus (n; %)	1 (1)	18 (6)†
Tobacco use (n; %)	12 (7)	33 (12)†
Hypercholesterolaemia (n; %)	0	69 (24)†
Protein S deficiency/V Leiden (n; %)	0/1 (1)	8 (3)/10 (4)†
APS features		
Thrombotic APS		
Arterial APS (n; %)	0	105 (37)†
Venous APS (n; %)	9 (6)	154 (54)†
Obstetrical APS (n; %)	168 (89)	89 (31)†
Mix APS (n; %)	8 (4)	16 (6)
Non-criteria features (n; %)	16 (9)	141 (49)†
Obstetrical history		
Miscarriages (n; %)	66 (35)	18 (6)†
Intrauterine deaths (n; %)	60 (32)	46 (16)†
Prematurity <34 weeks of gestation (n; %)	43 (23)	31 (11)†

†p<0.05. Values are numbers with frequencies and means with SD. APS, antiphospholipid syndrome.

(n=0/65) (online supplemental table 1). A single non-criteria APL was noted in 131 women (70%), with double and triple positivity's in 50 (27%) and 6 cases (3%), respectively. Single-triple and double-triple positive seronegative APS have similar age and frequencies of obstetrical ad thrombotic APS features (data not shown). Comparing pregnancy outcomes of seronegative APS, women with double-positive non-criteria APL had significantly more frequent fetal loss than single-positive APS (13/28 (46%) vs 16/70 (23%); p=0.03) despite the use of similar frequencies of aspirin, low-molecular weighted heparin (LMWH) and additional therapies during the pregnancies.

The cumulative incidence of adverse obstetrical events was significantly improved in treated seronegative APS versus untreated ones (log rank <0.05), whereas there was no difference between patients who received aspirin or aspirin-LMWH combination (figure 1). The rates of live-birth pregnancies treated with aspirin-LMWH combination were significantly higher than pregnancies resulting in fetal loss (46/75 (61%) vs 16/43 (37%), p=0.002). Women with isolated recurrent miscarriages treated by aspirin and LMWH combination (n=48 pregnancies; 89%) have live birth pregnancies in 31 (57%), whereas those with prematurity related to placental insufficiency under aspirin and LMWH in 9 (45%) have live birth pregnancies in 18 (82%).

The control group of seropositive APS included 285 women with a mean age of 36±5 years. The APL were the LA (n=211; 74%), aCL (n=228; 80%) and anti-β2GPI antibodies (183 cases; 64%), with triple positivity

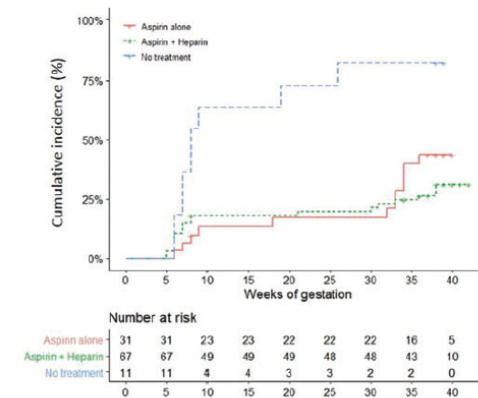


Figure 1 Adverse obstetrical events (fetal loss and/or premature birth before the 34 weeks of gestation because of eclampsia or severe preeclampsia or placental insufficiency) in 109 pregnancies of seronegative APS depending on treatment during the pregnancy and the type (aspirin or aspirin/LMWH combination). APS, antiphospholipid syndrome; LMWH, low-molecular weighted heparin.

observed in 134 women (47%). Seropositive APS women had significantly more venous and/or arterial thrombosis than seronegative APS women (table 1). Cardiovascular risk factors including arterial hypertension, dyslipidaemia, and/or diabetes mellitus were significantly more frequent in seropositive APS patients, and the latter have more non-criteria APS manifestations (livedo racemosa, thrombocytopenia and migraines). Seronegative APS women were more prone to have obstetrical phenotypes, with more frequent intrauterine deaths, miscarriages and early prematurity (table 1).

For the comparisons of subsequent pregnancies following APS diagnoses, we included 108 seronegative APS and 75 seropositive APS women, who had at least one pregnancy after APS diagnosis (table 2). The frequencies of treated pregnancies and rates of aspirin-LMWH combination, prednisone and hydroxychloroquine used during the pregnancy were not significantly different in seronegative and seropositive APS, except for higher rates of curative LMWH use in seropositive APS and of aspirin alone in seronegative APS. Cumulative incidence of adverse obstetrical events was similar in seronegative and seropositive APS patients (figure 2), although higher rates of intrauterine deaths (15% vs 5%; $p=0.03$), preeclampsia (7% vs 16%, $p=0.048$) and lower live birth term (36 ± 3 vs 38 ± 3 weeks of gestation; $p=0.04$) were noted in seropositive treated APS.

Then, we analysed factors associated with fetal loss (<10 weeks of gestation), intrauterine deaths (>10 weeks of gestation), premature birth (<34 weeks of gestation) and preeclampsia/HELLP syndrome considering all pregnancies of both seropositive and seronegative APS women. The factors analysed in univariate analysis for these different obstetrical outcomes included: age, seropositive or seronegative APS status, cardiovascular risk factors (obesity, arterial hypertension, diabetes, tobacco use, hereditary thrombophilia), clinical APS phenotype (thrombotic, obstetrical or mix), presence of non-criteria APS features (livedo, thrombocytopenia, headaches, Libman-Sachs endocarditis, etc.), type of therapies during the pregnancy (aspirin, LMWH and isocoagulant or curative amounts, prednisone, hydroxychloroquine), maternal adverse obstetrical events (preeclampsia/HELLP, thrombosis), fetal complication (IUGR, oligoamnios) and term of delivery. Considering the risk of fetal loss (<10 weeks of gestation), in multivariate analyses, no differences have been shown with regard to seropositive/seronegative APS status and the history of previous early miscarriage (OR 3.4 [1.34, 9.08] ($p=0.01$)) and smoking (OR 4.70 [1.07, 21.01] ($p=0.038$)) were associated with an increased risk of early fetal loss, while aspirin was associated with a lower risk (OR 0.25 [0.1, 0.61] ($p=0.003$)). Considering intrauterine deaths (>10 weeks of gestation), in multivariate analysis, only previous history of intra-uterine death was significant with OR 4.8 [1.6; 15.6] ($p=0.006$).

Considering preeclampsia and HELLP syndrome, in multivariate analysis, the age at the APS diagnosis and

Table 2 Pregnancy outcome and treatment in seronegative and seropositive APS

	Seronegative APS pregnancies (n=108)	Seropositive APS pregnancies (n=75)
APS features		
Thrombotic APS		
Arterial APS (n; %)	0	20 (27)†
Venous APS (n; %)	8 (7)	42 (56)†
Obstetrical APS (n; %)	93 (86)	36 (48)†
Mix APS (n; %)	6 (6)	18 (24)†
Non-criteria features (n; %)	18 (17)	34 (45)†
Previous obstetrical history		
Miscarriages (n; %)	49 (45)	8 (11)†
Intrauterine deaths (n; %)	29 (27)	16 (21)
Prematurity <34 weeks of gestation (n; %)	24 (22)	14 (19)
Subsequent pregnancy treatments		
Aspirin (n; %)/aspirin alone	95 (88)/32 (30)	57 (76)†/2 (3)†
LMWH isocoagulant amounts (n; %)	63 (58)	39 (52)
LMWH curative amounts (n; %)	2 (2)	33 (44)†
Aspirin-LMWH (n; %)	65 (60)	55 (73)
Prednisone (n; %)	10 (9)	4 (5)
Hydroxychloroquine (n; %)	10 (9)	8 (11)
Venous thrombosis (n; %)	0	1 (1)
Pregnancy outcome		
Preeclampsia/HELLP syndrome (n; %)	7 (7)	12 (16)†
Intrauterin growth restriction (IUGR) (n; %)	5 (5)	7 (10)
Oligoamnios (n; %)	2 (2)	1 (1)
Fetal loss (n; %)	33 (31)	22 (29)
miscarriage/intrauterine deaths	23 (21)/5 (5)	11 (15)/11 (15)†
Prematurity <34 weeks of gestation (n; %)	6 (6)	9 (12)
Term of fetal loss (weeks of gestation)	10±8	13±7
Live births (n; %)	75 (69)	53 (70)
Term of live birth (weeks of gestation)	38±3	36±3†

† $p<0.05$.

Values are numbers with frequencies and means with SD. APS, antiphospholipid syndrome; HELLP, hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low platelet count; LMWH, low-molecular weighted heparin.

the preventive use of LMWH were associated with decreased risk (OR at 0.89 [0.81, 0.98] ($p=0.007$) and 0.20 [0.03, 0.96] ($p=0.02$), respectively).

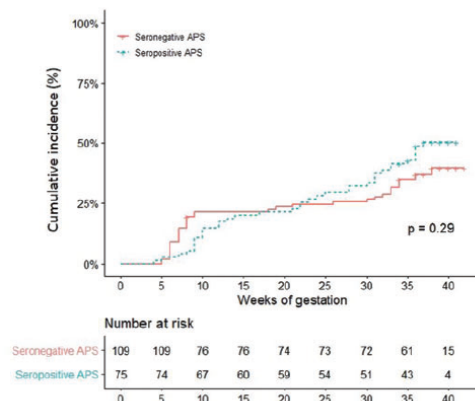


Figure 2 Adverse obstetrical events (fetal loss and/or premature birth before the 34 weeks of gestation because of eclampsia or severe preeclampsia or placental insufficiency) among 183 pregnancies depending on APS seropositive and seronegative status. APS, antiphospholipid syndrome.

Considering the occurrence of at least one adverse obstetrical events among early fetal loss, intrauterine deaths, premature birth and preeclampsia/HELLP syndrome, the multivariate analysis showed that aspirin use (OR at 0.29 [0.11, 0.69]; $p=0.003$) was associated with obstetrical outcomes, independently of seropositive or seronegative APL status.

DISCUSSION

In this large European case-series of seronegative APS with at least one detectable non-criteria APL, we described clinical APS features and compared them to seropositive APS. Seronegative APS have less frequent thrombotic and non-criteria features than seropositive APS. Pregnancy outcomes of seronegative APS were managed similarly to seropositive APS especially with a similar use of isoagglutinant LMWH and combined aspirin-LMWH treatment during the pregnancy and associated with better obstetrical outcomes in seronegative APS women than no treatment.

Patients with clinical features of APS considering Sydney criteria but with negative APL tests are quite usual, and the diagnosis of seronegative APS has been introduced for these patients by Hughes and Khamashta in 2003.^{9, 10} In this study, 67 patients with major clinical APS criteria and at least two additional non-criteria features without conventional APL were compared with seropositive APS ($n=87$).¹⁰ Thrombotic and obstetrical features were similar in both seronegative and seropositive APS patients, seronegative APS tended to have more pregnancy morbidity, and non-conventional APL have not been

tested in this study. Other studies described seronegative APS considering only major clinical APS criteria, without adding APS non-criteria features, with mainly clinical APS features and not all having at least one detectable non-criteria APL. Seronegative APS have been found to present more frequent obstetrical features, in particular recurrent miscarriages in another case-series, but only with 37% of patients that have detectable non-criteria APL.¹¹ A major limitation of seronegative APS studies is actually the heterogeneity of tested non-criteria APL, the clinical inclusion criteria, the absence of diagnostic criteria; studies of seronegative APS with at least one detectable non-criteria APL are lacking. Non-criteria APL have also been evaluated in seropositive APS patients, considering the potential use to define high-risk subgroups. Thus, anti-PS/PT antibodies have been shown to be associated to adverse pregnancy outcome,¹² and included in the GAPSS scale, defining the relapse risk for thrombotic APS.¹³ Among APS women seeking conception, anti-PS/PT antibodies have been found to be an interesting marker for APL-related complications, in particular for IUGR.¹⁴ The prevalence of different non-criteria APL in our study varied from 0% for anti-vimentin and IgA aCL antibodies to 37% for anti-PS/PT autoantibodies and could be useful to consider in routine screening of the seronegative APS.

In our case series, more than 80% of seronegative APS women have received aspirin and/or LMWH combination during the pregnancy, with a similar rate of combined aspirin-LMWH to seropositive APS. Seropositive APS seems to have poorer obstetrical outcome, despite more prevalent curative APS amounts. Moreover, whether combined aspirin-LMWH treatment significantly reduces placenta-mediated complications in women receiving low-dose aspirin for previous severe preeclampsia diagnosed before 34 weeks of gestation and no previously recognised APS has been challenged.^{15, 16} Data about the management of seronegative APS are quite scarce. We previously reported 65 patients with seronegative APS with at least one non-criteria APL, compared with 83 seropositive APS and to the control group without any APL.¹⁷ The conventional aspirin/heparin combination was significantly associated with live births in both seropositive and seronegative APS groups, at the difference of women without any detectable APL. Our study provides data about the management of seronegative APS during the pregnancy and shows the benefit of aspirin alone or combined with LMWH to prevent adverse obstetrical outcomes. Prospective studies are lacking to determine the value and the types of therapies for seronegative APS, in particular the need for prophylactic vitamin K antagonists therapies in thrombotic seronegative APS.

Some important limitations should be discussed such as the retrospective design, the possible inclusion of mainly obstetrical subtypes and the absence of

centralised screening of both conventional and non-criteria APL in our cases. Seronegative and seropositive APS were not matched which can account for the differences which have been noted between these groups. Even thrombotic and obstetrical APS should be included, the need for at least one pregnancy, more frequent non-criteria APL screening after adverse obstetrical event probably could biased the prevalence of thrombotic subtypes. APS is still a diagnostic challenge, as no international standardised laboratory tests are available, and it is also conceivable that positive APL becomes negative over the time. Despite these important limitations, one has to consider that, previously, anti-B2GPI have been added to the laboratory criteria of APS and that new autoantigens target antibodies could be an additional tool to help to the APS diagnosis.¹¹ According to the different prevalent of these non-criteria APL, in particular, for IgA and anti-vimentin antibodies, the screening of non-criteria APL could be organised in 'step by step' approach.

CONCLUSION

Several non-criteria APL can be detected in patients with clinical features consistent with APS without any conventional APL, with various prevalent rates. The detection of non-criteria APL and thus the diagnosis of seronegative APS could discuss the therapeutic management similar to seropositive APS, but well-designed controlled studies are necessary.

Author affiliations

- ¹Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Médecine Interne and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DMU 3iD), Paris, France
²Department of Internal Medicine, AP-HP Nord, Beaujon Hospital, Paris University, Clichy, France
³Department of Surgical Sciences, Obstetrics and Gynecology, University of Turin, Turin, Italy
⁴Department of Internal Medicine, Athaia Network Health, Manresa, Barcelona, Spain
⁵Autoimmune, Thrombophilic Diseases and Pregnancy Section, Acute Hospital "Dr Carlos G Durand", Buenos Aires, Argentina
⁶Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre and Research Institute, Madrid, Spain
⁷Department of Internal Medicine, Vascular and Thrombosis Unit, Rouen University Hospital, Normandie University, UNIROUEN, INSERM, Rouen, France
⁸Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Graz, Graz, Austria
⁹Service Department of internal medicine, CHU d'Angers, Angers, France
¹⁰Department of Rheumatology, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia
¹¹Département de Médecine Vasculaire, Médecine Inteme et Pneumologie, CHU de Brest, Hôpital La Cavale Blanche, Brest Cedex, France
¹²EA 3878, GETBO, Université Bretagne Loire, Brest Cedex, France
¹³Department of Medicine-DIMED, Rheumatology Unit, University of Padua, Padua, Italy
¹⁴Department of Internal Medicine, University Hospital of Limoges, Limoges, France
¹⁵Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Centers, Hôpitaux Universitaires Paris Seine Saint-Denis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bondy, France
¹⁶University of Paris 13, Sorbonne University, Bobigny, France
¹⁷Service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital Trousseau, AP-HP, Paris, France
¹⁸Sorbonne Université, Paris, France

- ¹⁹Department of Gynaecology and Obstetrics and Reproductive Medicine, Tenon Hospital, Assistance Publique – Paris Hospitals, Paris, France
²⁰Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre de Référence des Maladies Auto-Immunes Systémiques Rares du Nord et Nord-Ouest (CeRAINO), Univ. Lille, CHU Lille, Lille, France
²¹Department of Immunology, AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Paris, France
²²Immunology Department, Bichat Hospital, APHP, Paris, France
²³Department of Internal Medicine, University Hospital of Amiens, Amiens, France
²⁴Université de Paris, INSERM UMR_S1148, Paris cedex 18, France
²⁵Laboratoire d'Hématologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris cedex 18, France
²⁶Systemic Autoimmune Diseases Unit, Department of Internal Medicine-1, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain
²⁷Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Acknowledgements We thank the European Forum on Antiphospholipid Antibodies for his help in this study.

Contributors All authors were involved in drafting the article. NA and AM have full access to all data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of data analysis. Study conception and design: NA, YN, LM, EEV, CDM, PB, DEP, LC, GK, MB, CJ, PNR, GU, PZ, HB, KP, YB, JAR, OF, AM. Acquisition of data: NA, YN, LM, EV, CDM, PB, DEP, LC, GK, MB, CJ, PNR, GU, PZ, HB, KP, YB, JAR, OF, AM. Analysis and interpretation of data: NA, YN, MA, OF, AM.

Funding The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval Ethical committee not required for this observational study according to Helsinki law.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available in a public, open access repository.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iDs

Yann Nguyen <http://orcid.org/0000-0002-0866-3824>
 Lionel Carbillon <http://orcid.org/0000-0001-6367-4828>
 Eric Hachulla <http://orcid.org/0000-0001-7432-847X>
 Arsène Mekinian <http://orcid.org/0000-0003-2849-3049>

REFERENCES

- Mekinian A, Costedoat-Chalumeau N, Masseau A, *et al*. Obstetrical APS: is there a place for hydroxychloroquine to improve the pregnancy outcome? *Autoimmun Rev* 2015;14:23–9.
- Nayfe R, Uthman I, Aoun J, *et al*. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:1358–67.
- Alessandri C, Conti F, Pendolino M, *et al*. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2011;10:609–16.
- Litvinova E, Darnige L, Kirilovsky A, *et al*. Prevalence and significance of non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical APS criteria. *Front Immunol* 2018;9:2971.
- Zhu H, Wang M, Dong Y, *et al*. Detection of non-criteria autoantibodies in women without apparent causes for pregnancy loss. 2019:e22994.

- 6 Truglia S, Capozzi A, Mancuso S, *et al.* A monocentric cohort of obstetric seronegative anti-phospholipid syndrome. *Front Immunol* 2018;9:1678.
- 7 Conti F, Andreoli L, Crisafulli F, *et al.* Does seronegative obstetric APS exist? "pro" and "cons". *Autoimmun Rev* 2019;18:102407.
- 8 Alijotas-Reig J, Ferrer-Oliveras R, Ruffatti A, *et al.* The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): a survey of 247 consecutive cases. *Autoimmun Rev* 2015;14:387–95.
- 9 Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1127.
- 10 Rodríguez-García JL, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, *et al.* Clinical manifestations of antiphospholipid syndrome (APS) with and without antiphospholipid antibodies (the so-called 'seronegative APS'). *Ann Rheum Dis* 2012;71:242–4.
- 11 Zohoury N, Bertolaccini ML, Rodríguez-García JL, *et al.* Closing the serological gap in the antiphospholipid syndrome: the value of "non-criteria" antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 2017;44:1597–602.
- 12 Zigon P, Perdan Pirkmajer K, Tomic M, *et al.* Anti-phosphatidylserine /prothrombin antibodies are associated with adverse pregnancy outcomes. *J Immunol Res* 2015;2015:975704.
- 13 Sciascia S, Sanna G, Murru V, *et al.* GAPSS: the global anti-phospholipid syndrome score. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:1397–403.
- 14 Canti V, Del Rosso S, Tonello M, *et al.* Antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies in antiphospholipid syndrome with intrauterine growth restriction and preeclampsia. *J Rheumatol* 2018;45:1263–72.
- 15 Haddad B, Winer N, Chitrit Y, *et al.* Enoxaparin and aspirin compared with aspirin alone to prevent placenta-mediated pregnancy complications: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2016;128:1053–63.
- 16 Rodger MA, Hague WM, Kingdom J, *et al.* Antepartum dalteparin versus no antepartum dalteparin for the prevention of pregnancy complications in pregnant women with thrombophilia (TIPPS): a multinational open-label randomised trial. *Lancet (London, England)* 2014;384:1673–83.
- 17 Mekinian A, Bourienne MC, Carbillon L, *et al.* Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin Arthritis Rheum* 2016;46:232–7.

9. RESUMEN

9.1. RESUMEN EN CASTELLANO

Los anticuerpos anti-fosfatidilserina/protrombina (aPS/PT) son autoanticuerpos que forman parte de la familia de los anticuerpos anti-fosfolipídicos (aFL), descritos con posterioridad a los clásicos como anticoagulante lúpico, anti-Cardiolipina y anti-Beta-2-Glicoproteína-I y no incluidos en los últimos criterios de clasificación como criterio de laboratorio en Síndrome anti-fosfolipídico (SAF). Además de su utilidad en trombosis para la identificación de pacientes como afectados de este Síndrome cuando otros marcadores son negativos y como parámetro subrogado de anticoagulante lúpico, los trabajos presentados en esta tesis doctoral amplían el interés de la determinación de estos autoanticuerpos para mostrar utilidad en pacientes con abortos y fracaso de implantación recurrente. Encontramos una importante prevalencia de aPS/PT en pacientes sin otras enfermedades autoinmunes con excepción de alteraciones tiroideas tanto con criterios clínicos para SAF con manifestaciones obstétricas como sin ellos, como es la situación de mujeres con dos abortos consecutivos anteriores a la semana 10 y pacientes con fracaso de implantación recurrente. Además, en todos los fenotipos clínicos hallamos una asociación estadísticamente significativa, tanto en los análisis univariantes como en los multivariantes comparados con la edad y los aFL incluidos en los criterios de laboratorio del último consenso establecido en el congreso mundial de SAF en Sídney. El hallazgo de estos autoanticuerpos en las pacientes tratadas en nuestra consulta motivó la introducción de un esquema de tratamiento similar a cuando encontramos la presencia de otros aFL y conllevó una siguiente

gestación exitosa con recién nacido vivo con diferencias estadísticamente significativas con respecto a la abstención terapéutica cuando todas las intervenciones en pacientes positivas para aPS/PT fueron tenidas en cuenta como en los grupos de pacientes con abortos anteriores a la semana 10 de gestación.

9.2. ABSTRACT IN ENGLISH:

Anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies are autoantibodies that are part of the family of the anti-phospholipid antibodies (aPL). Contrary to lupus anticoagulant, anti-Cardiolipin and anti-Beta-2- Glycoprotein-I, aPS/PT are not included in the latest classification criteria as a laboratory criterion for Anti-Phospholipid Syndrome (APS). It is known that these antibodies could be present in patients with thrombosis who are negative for other aPL. The results found in this PhD thesis broaden the interest of aPS/PT determination to show utility in the field of recurrent miscarriages and implantation failure. We found a significant prevalence of aPS/PT and a statistically significant association with all the clinical phenotypes of obstetric morbidity within APS, both in the univariate and multivariate analysis compared to age and aPL included in the laboratory criteria. Patients positive for aPL including aPS/PT were treated with similar schemes to other aPL and led to a subsequent successful pregnancy with a live newborn with statistically significant differences compared to therapeutic abstention when the evolution of all aPS/PT patients was considered as a whole as well as in women with spontaneous miscarriages before pregnancy week 10.