



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

**Haplotipos del receptor endotelial de la proteïna C  
(EPCR) y acción sobre la hemostasia de las  
micropartículas circulantes en el síndrome  
antifosfolipídico y en el lupus eritematoso sistémico:  
Relación con la arteriosclerosis y la trombosis**

Miguel Ángel Plasín Rodríguez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

CLÍNICA  
BARCELONA  
Hospital Universitari

Programa de Doctorado “Medicina e Investigación Translacional”  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

## TESIS DOCTORAL

**Haplotipos del receptor endotelial de la proteína C (EPCR) y acción sobre la hemostasia de las micropartículas circulantes en el síndrome antifosfolipídico y en el lupus eritematoso sistémico:  
Relación con la arteriosclerosis y la trombosis**

Memoria de tesis doctoral presentada por

**Miguel Ángel Plasín Rodríguez**

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Mayo de 2021

Directores de Tesis:

**Dra. Dolors Tàssies Penella**

Servicio de Hemoterapia y Hemostasia

**Dr. Gerard Espinosa Garriga**

Servicio de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas



Los directores:

La Dra. **Dolors Tàssies Penella**, especialista en Hematología y Hemoterapia, Jefa de la Sección de Hemostasia, Servicio de Hemoterapia y Hemostasia, Institut Clínic de Malalties Hematològiques i Oncològiques (ICMHO), Hospital Clínic de Barcelona.

El Dr. **Gerard Espinosa Garriga**, especialista en Medicina Interna, Consultor 2 del Servicio de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Institut Clínic de Medicina Interna i Dermatologia (ICMiD), Hospital Clínic de Barcelona.

Certifican que el doctorando **Miguel Ángel Plasín Rodríguez** ha realizado la presente Tesis Doctoral titulada “*Haplotipos del receptor endotelial de la proteína C (EPCR) y acción sobre la hemostasia de las micropartículas circulantes en el síndrome antifosfolipídico y en el lupus eritematoso sistémico: Relación con la arteriosclerosis y la trombosis*” bajo su dirección y supervisión y que cumple los requisitos necesarios para presentarla como “compendio de artículos” delante del correspondiente Tribunal de Tesis y así poder optar el grado de Doctor en Medicina.



**Dra. Dolors Tàssies Penella**



**Dr. Gerard Espinosa Garriga**



*A mi mujer y a mis hijos*

*A mis padres*



## **AGRADECIMIENTOS**

Se podría decir que esta Tesis Doctoral empezó durante mi residencia, en el momento que decidí acercarme al Dr. Ricard Cervera para manifestarle mi interés por las Enfermedades Autoinmunes, al cual por cierto le agradezco la oportunidad que me ha dado de formar parte de este apasionante mundo de enfermedades tan complejas y a la vez tan interesantes. En seguida me mostró su satisfacción y me indicó que mi referente durante los siguientes años sería el Dr. Gerard Espinosa, con el cual ha sido un placer trabajar desde el principio. En esos años de residencia y en mi único año de becario, realmente pensaba, y aún comprendiendo su dificultad, que la tesis la podría realizar en pocos años. Sin embargo, justo en ese año de becario, me surgió un puesto de trabajo que no podía rechazar. Aquí, en el Hospital de Mollet, es donde actualmente sigo ejerciendo y donde conocí a la mujer que me hace feliz y con la que hemos sido padres de un precioso niño. Conciliar la vida familiar, laboral y formativa con la actividad investigadora y la tesis doctoral es mucho más complicado de lo que uno pueda imaginar. Eso ha hecho que la tesis se alargara más de lo esperado aunque al mismo tiempo ha conseguido que aún me sienta más orgulloso de haberla finalizado. Pero esto no ha sido sólo mérito mío, por lo que me gustaría agradecerlo a las personas que han estado ahí todos estos años.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. Gerard Espinosa y la Dra. Dolors Tàssies, por acompañarme y guiarme en este largo camino, a través del cual me han enseñado todo lo necesario para llevar a cabo este proyecto. Dolors me ha enseñado que siempre se puede ver todo desde otra perspectiva dando “giros” en sus correcciones y aunque eso podría suponer un mayor esfuerzo, también iba de la mano de una mayor recompensa. Gerard por su parte me ha enseñado a ser práctico a la vez que meticuloso y a pesar de la dificultad que esto entraña, creo que ha conseguido que lo ponga en práctica. Siempre recordaré como Gerard se “disculpaba” en sus correcciones con el argumento, “no es que esté mal, muchas veces es sólo una cuestión de estilo”, y lo cierto es que con la ayuda de ambos, siento que he desarrollado mi propio estilo al escribir en “lenguaje científico”. Gracias a los dos por todas estas enseñanzas y por muchas otras, y también por la paciencia, empeño y esfuerzo que habeis dedicado a este proyecto, mi tesis doctoral. Sin duda, no lo hubiera conseguido sin vuestra ayuda.

Quiero hacer una especial mención al Dr. Joan Carles Reverter, todo un referente en el mundo de la Hemostasia y de la Hemoterapia. Me gustaría transmitirle mi agradecimiento por “apadrinar” esta tesis aportando sus conocimientos y su esfuerzo, y colaborando de forma activa para que este proyecto saliera adelante.



Hago extensivo el agradecimiento a todos los compañeros que han colaborado en esta tesis, en especial al Dr. Rodríguez-Pintó, a la Dra. Patricio, al Dr. Monteagudo y a la Dra. García-Críado.

Seguidamente me gustaría dar las gracias a mis padres, Montse y Victor, por darme la vida y educarme según sus valores, destacando su honradez y humildad. Además, me contagiaron ese sentido de la responsabilidad tan necesario en todos los aspectos de la vida. Por esto y por mucho más, os debo gran parte del mérito de esta tesis. Así mismo, doy las gracias a mis hermanas Marta y Gloria y a mi hermano Jordi, por servirme de ejemplo ya desde bien pequeño, también a ellos les debo muchos de mis valores actuales. Y como no, a mis sobrinos Marcos, Esteban y Carlos, por hacerme reír con todas sus ocurrencias y travesuras y por despertarme aún más esas ganas de ser papá. No me olvido de mis cuñad@s, prim@s y ti@s, tod@s han estado a mi lado en un momento u otro. Por todo esto, no podría sentirme más orgulloso de mi familia, gracias a tod@s.

No quiero dejar pasar la oportunidad de darle las gracias también a mis suegr@s, Fuensanta y Luis, gracias por hacerme sentir como “un hijo más”. También a mis cuñadas, Sandra y Noemí y obviamente a mis sobrin@s y cuñados. Gracias a tod@s por esas comidas tan familiares y distendidas que me recuerdan a mi familia natal y al mismo tiempo me hacen sentir “como en casa”.

Y gracias a todas esas personas que forman parte de mi vida:

A los “Mandriles”, mis amigos de toda la vida, con los que gracias a la amistad que nos une, seguimos en contacto cada día contando nuestras aventuras y desventuras. Con ellos he podido compartir también cada uno de mis logros de esta tesis doctoral.

A los “Gallenistas”, y sobre todo a los “Piscina-Brunch-Barcelonetos”, por hacerme pasar esos buenos ratos de risas y fiestas, que me ayudaban a descansar de mis largas horas delante del ordenador.

Al “Hurgo’s Racó”, por esos ratitos de relax, donde disfrutamos de una buena guitarra y donde gracias a vosotros descubrí mi pasión por la NBA.

A “los de Velilla”, por vuestro cariño, amistad y generosidad incondicional, echo de menos esos viernes en el “Nou Capricho”, espero que pronto podamos recuperar esos momentos.

A mis “R-mayores”, en especial a Sergio, Jesús y Germán, por iniciarme en el arte de la medicina. No sólo fueron mis primeros profesores, sino que además se convirtieron en grandes amigos.

A “los de Mongolia”, por esos buenos momentos de comidas y casas rurales. Ah! y por enseñarme que se puede sobrevivir durmiendo en una tienda de campaña por debajo de cero grados.

A los “Black Hurgos”, mi equipo de baloncesto, gracias a esos intensos partidos pude liberar toda la adrenalina acumulada por el estrés y el trabajo, pero también me permitió disfrutar de una buena cerveza con amigos después de cada encuentro.

A mis “más que compañer@s” del Hospital de Mollet, por vuestra amistad, por hacerme más fácil el día a día en el trabajo y por intentar ayudarme siempre que lo he necesitado. También a nuestro Jefe de Servicio, el Dr. Francisco Muñoz (o Paco Muñoz como lo conocemos nosotros), del que considero que es un excelente profesional del que siempre puedes aprender. Y como no, gracias al “grupo de la hamburguesa”, por ese tan esperado *afterwork* de los viernes.

Dejo para el final, lo más importante que tengo actualmente en mi vida, MI FAMILIA. Empiezo por “mis chic@s”. Gracias Álex y Claudia, por permitirme formar parte de vuestra vida y por querer formar parte de la mía, por hacerme reír con vuestras cosas y hacerme cómplice de vuestros problemas, no podría sentirme más afortunado y orgulloso de tener unos hij@s como vosotr@s. Gracias a mi hijo Gabriel, mi pequeñito, esa personita de casi dos años y medio que no para de arrancarme sonrisas y carcajadas cada día, con el que estoy disfrutando de verlo crecer poquito a poquito con todas sus salidas y ocurrencias y supongo que hablo por tod@s los padres y madres, pero es que es indescriptible todo lo que te puede hacer sentir un hijo. Además, se podría decir que ha colaborado directamente en esta tesis, siendo una inmejorable compañía en mis madrugones de fin de semana para adelantar trabajo. Y reservo estas últimas líneas para la persona que quiero y que me enamoró desde el primer momento, esa persona que me hace feliz y por la que cada día cuando despierto, me siento afortunado de tenerla a mi lado. Gracias Cristina por tu paciencia y por estar siempre ahí, animandome y apoyandome cuando más lo necesito y por ayudarme a superar mis días malos. Obviamente también por estar conmigo para celebrar, compartir y disfrutar juntos de los buenos momentos. Sin duda, tú también has dedicado mucho tiempo y esfuerzo para que yo pudiera sacar adelante este proyecto por lo que además de agradecerlo quiero dedicarte esta tesis, nuestra tesis doctoral. Esto va por ti cariño.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	17
2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	21
2.1. Las enfermedades autoinmunes sistémicas. Definición de síndrome antifosfolipídico y de lupus eritematoso sistémico	23
2.2. Arteriosclerosis y <i>continuum</i> arteriosclerótico. La utilidad de la ecografía carotídea y el concepto de “carga de arteriosclerosis”	24
2.3. Síndrome antifosfolipídico y trombosis. Importancia de los anticuerpos antifosfolipídicos	28
2.4. Lupus eritematoso sistémico, arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular	30
2.4.1. Lupus eritematoso sistémico, arteriosclerosis subclínica y ecografía carotídea	30
2.4.2. Lupus eritematoso sistémico y enfermedad cardiovascular	31
2.5. Fisiología de la coagulación	34
2.5.1. La visión inicial de la coagulación: de los primeros descubrimientos a la cascada de la coagulación	34
2.5.2. El modelo celular de la coagulación	37
2.5.2.1. Fase de iniciación	38
2.5.2.2. Fase de amplificación	39
2.5.2.3. Fase de propagación	40
2.5.3. Anticoagulantes naturales	41
2.6. El sistema anticoagulante de la proteína C	42
2.6.1. El receptor endotelial de la proteína C	43
2.6.2. Regulación genética del receptor endotelial de la proteína C: los haplotipos <i>PROCR</i>	45

2.7. Las micropartículas circulantes y el balance hemostático	46
2.7.1. Función protrombótica de las micropartículas	46
2.7.2. Potencial anticoagulante de las micropartículas	48
2.7.3. Las micropartículas circulantes en las trombosis de las enfermedades autoinmunes sistémicas	48
3. HIPÓTESIS	51
4. OBJETIVOS	55
4.1. Objetivo global	57
4.2. Objetivos específicos	57
5. METODOLOGÍA Y RESULTADOS (ARTÍCULOS)	59
5.1. Primer estudio	61
5.2. Segundo estudio	75
6. DISCUSIÓN	91
7. CONCLUSIONES	101
7.1. Conclusiones del primer estudio	103
7.2. Conclusiones del segundo estudio	104
8. BIBLIOGRAFÍA	105

## ABREVIATURAS

AAF: anticuerpos antifosfolipídicos.

a $\beta$ 2GPI: anticuerpos anti- $\beta$ 2 glicoproteína-I.

aCL: anticuerpos anticardiolipina.

AL: anticoagulante lúpico.

ANA: anticuerpos antinucleares.

AT: antitrombina.

$\beta$ 2GPI:  $\beta$ 2 glicoproteína-I.

CV: cardiovascular.

EA: enfermedades autoinmunes.

EAS: enfermedades autoinmunes sistémicas.

EB: enfermedad de Behçet.

ECV: enfermedad cardiovascular.

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*.

EPCR: receptor endotelial de la proteína C.

EULAR: *European League Against Rheumatism*.

F: factor.

FRCV: factores de riesgo cardiovascular.

FS: fosfatidilserina.

FT: factor tisular.

FvW: factor de von Willebrand.

GIM: grosor íntima-media.

LES: lupus eritematoso sistémico.

MPs: micropartículas.

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno.

PC: proteína C.

PCa: proteína C activada.

*PROCR*: gen del receptor endotelial de la proteína C.

SAF: síndrome antifosfolipídico.

sEPCR: forma soluble del receptor endotelial de la proteína C.

SLICC/ACR: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology*.

TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular.

TM: trombomodulina.

TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado.

## ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS QUE COMPONEN LA TESIS

### Tesis en formato de compendio de artículos.

#### Primer artículo.

**Plasín-Rodríguez MA**, Rodríguez-Pintó I, Patricio P, Monteagudo J, Cervera R, Reverter JC, Espinosa G, Tàssies D. *The H1 haplotype of the endothelial protein C receptor protects against arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome*. Thromb Res. 2018 Sep;169:128-134.

doi: 10.1016/j.thromres.2018.07.006. Epub 2018 Jul 4. PMID: 30048851.

**Objetivo:** Analizar la relación entre las manifestaciones trombóticas, los niveles plasmáticos del sEPCR y los polimorfismos del *PROCR* en los pacientes con síndrome antifosfolipídico y con lupus eritematoso sistémico.

Factor de impacto de la revista: 2.869

Segundo Cuartil (Q2) del Área de Hematología

#### Segundo estudio.

**Plasín-Rodríguez MA**, Patricio P, Monteagudo J, García-Criado A, Cervera R, Reverter JC, Espinosa G, Tàssies D. *Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic lupus erythematosus*. J Thromb Thrombolysis. 2020 Oct 3.

doi:10.1007/s11239-020-02295-1. Epub ahead of print. PMID: 33011897.

**Objetivo:** Estudiar la actividad procoagulante de las micropartículas circulantes y analizar su relación con la presencia de arteriosclerosis o de trombosis en el lupus eritematoso sistémico y en el síndrome antifosfolipídico.

Factor de impacto de la revista: 2.054

Segundo Cuartil (Q2) del Área de Hematología





# **1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



Las enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS) son un conjunto de enfermedades caracterizadas por la generación de autoanticuerpos y por la afectación de varios órganos o sistemas. Su fisiopatología es compleja y en ella participan procesos inflamatorios, inmunitarios y, en ocasiones, también hemostáticos. Algunas de las EAS, como el síndrome antifosfolipídico (SAF) o el lupus eritematoso sistémico (LES) poseen, además de una base autoinmune e inflamatoria, una mayor frecuencia de alteraciones cardiovasculares (CV). Los mecanismos exactos por los cuales se desarrollan trombosis en el SAF y patología CV en el LES no se conocen con certeza.

En este sentido, se sabe que en el desarrollo de la arteriosclerosis y de las trombosis colaboran mediadores inflamatorios y que existe una estrecha relación entre los fenómenos inflamatorios y las alteraciones de la hemostasia. Así pues, algunos mecanismos de la coagulación podrían estar especialmente implicados en el desarrollo de la arteriosclerosis acelerada o trombosis en estas enfermedades.

Entre ellos, el sistema de la proteína C (PC) que es uno de los mecanismos más importantes encargados de regular la formación del coágulo, podría jugar un papel ya que hay evidencias de que los anticuerpos antifosfolipídicos (AAF) inducen una resistencia adquirida a la PC activada (PCa). Esto podría ser uno de los mecanismos patogénicos de las trombosis en el SAF. En concreto, el receptor endotelial de la PC (EPCR) es crucial para potenciar la activación de ésta, mientras que existe una forma soluble del EPCR (sEPCR) que parece alterar su correcto funcionamiento, y sus niveles elevados se han relacionado con un mayor riesgo de trombosis. Los niveles de sEPCR parecen estar condicionados por polimorfismos del gen EPCR (*PROCR*), los cuales definen una serie de haplotipos que se han relacionado con la ausencia o presencia de trombosis.

Por otro lado, también se han estudiado las micropartículas (MPs) circulantes, que son fragmentos de membrana de menos de 1  $\mu\text{m}$  que se desprenden de las células sanguíneas tras su activación celular. Las MPs poseen en su superficie fosfolípidos aniónicos, proteínas y receptores de las células de las que proceden, que tienen la capacidad de soportar el anclaje de factores de la coagulación y por lo tanto modular la misma. Estas MPs se han relacionado con el desarrollo de arteriosclerosis y trombosis.

En relación con las EAS, se han detectado niveles más elevados de sEPCR y mayor prevalencia de alguno de los haplotipos *PROCR* en el LES. También se ha objetivado un aumento del número de MPs en los pacientes con SAF y LES y en el caso del LES, las MPs se han relacionado con la presencia de enfermedad CV (ECV).

Por todo esto, parece razonable suponer que, tanto en el SAF como en el LES, existen varios mecanismos que pueden modular la hemostasia y acelerar la aparición de arteriosclerosis y patología trombótica. Entre ellos, los niveles de sEPCR, regulados genéticamente por los haplotipos *PROCR*, podrían ser un marcador procoagulante al interferir con el correcto funcionamiento de la vía de la PC. Por su parte, las MPs podrían estar implicadas en el desarrollo de arteriosclerosis subclínica acelerada y de ECV en el SAF y en el LES. De hecho, algunos autores piensan que las MPs podrían explicar la relación entre inflamación, autoinmunidad y trombosis. El estudio de todos estos factores puede ser determinante para comprender la fisiopatología de la arteriosclerosis y de la trombosis en los pacientes con SAF y LES.

## **2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA**



## **2.1. Las enfermedades autoinmunes sistémicas. Definición de síndrome antifosfolipídico y de lupus eritematoso sistémico.**

Las EA engloban una serie de trastornos en los que, a raíz de una alteración en el sistema inmunitario, se generan autoanticuerpos que pueden reconocer y dañar estructuras de un solo órgano del cuerpo, o bien pueden afectar a varios órganos o sistemas lo que provoca, por tanto, un daño más extenso. A este segundo grupo de enfermedades se les conoce como EAS. El SAF y el LES son dos ejemplos de este grupo de enfermedades.

El SAF es la trombofilia adquirida más frecuente. Se caracteriza por la presencia de trombosis arteriales, venosas o de la microcirculación junto a morbilidad obstétrica en forma de abortos o pérdidas fetales recurrentes, en presencia de AAF. Todos estos elementos forman parte de los criterios clasificatorios que se emplean en la práctica clínica para su diagnóstico (*Tabla 1*). El SAF puede aparecer asociado a otras EAS (SAF asociado), sobre todo al LES, aunque también puede presentarse en pacientes sin otra patología autoinmune subyacente (SAF primario) (1,2).

Por su parte, el LES es el paradigma de las EAS. Se trata de una enfermedad compleja, que puede producir una sintomatología muy diversa y afectar a prácticamente cualquier órgano, con un curso evolutivo y pronóstico muy variable. Debido a esta complejidad, se utilizan unos criterios clasificatorios para su diagnóstico (*Tabla 2*). Su curso se caracteriza, en la mayoría de pacientes, por la aparición de brotes y remisiones y las manifestaciones clínicas se asocian a la presencia de autoanticuerpos y a la formación de inmunocomplejos (3–5). Una de las principales características del LES es su relación con la patología CV (6–9).



**Tabla 1.** Criterios clasificatorios revisados para el SAF (*modificado de Miyakis et al. 2006 (2)*).

---

**Criterios clínicos**

---

**1.- Trombosis vascular**

Uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de la microcirculación, diagnosticados por métodos objetivos (estudios de imagen o histopatológicos). La confirmación histopatológica requiere de la ausencia de inflamación significativa en la pared del vaso.

**2.- Morbilidad obstétrica**

Al menos uno de los siguientes:

a) Una o más muertes inexplicables de un feto morfológicamente normal durante o después de la décima semana de gestación.

b) Uno o más nacimientos prematuros de un neonato morfológicamente normal antes de la semana 34 de gestación debido a eclampsia, pre-eclampsia grave o datos compatibles con insuficiencia placentaria.

c) Tres o más abortos espontáneos consecutivos inexplicables antes de la décima semana de gestación. Se excluyen alteraciones anatómicas u hormonales maternas o causas cromosómicas paternas o maternas.

---

**Criterios de laboratorio**

---

Requiere la presencia de cualquiera de los tres siguientes AAF, en 2 o más ocasiones, separados entre sí al menos 12 semanas, y dentro de los 5 primeros años desde que se produce la manifestación clínica:

**1.- AL:** detectado según las guías clínicas de la “*International Society on Thrombosis and Haemostasis*” (*Scientific Subcommittee on LA/phospholipid-dependent antibodies*)

**2.- aCL:** IgG o IgM a título medio (>40 GPLo MPL) o alto (>percentil 99)

**3.- aβ2GPI:** IgG o IgM a título >percentil 99

---

**El diagnóstico de SAF precisa al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio**

Abreviaturas: AAF: anticuerpos antifosfolipídicos; aβ2GPI: anticuerpos anti-β2-glicoproteína-I; aCL: anticuerpos anticardiolipina; AL: anticoagulante lúpico; IgM: inmunoglobulina M; IgG: inmunoglobulina G; SAF: síndrome antifosfolipídico.

**2.2. Arteriosclerosis y *continuum* arteriosclerótico. La utilidad de la ecografía carotídea y el concepto de “carga de arteriosclerosis”.**

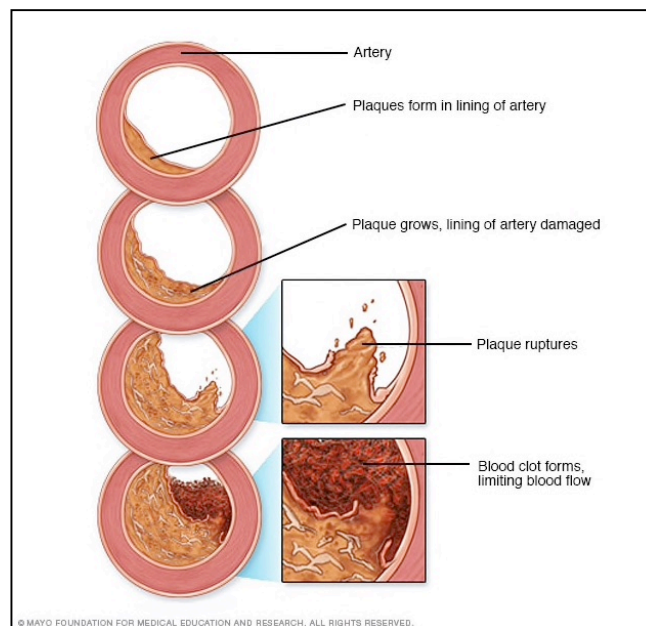
La arteriosclerosis consiste en la formación de placas de ateroma en la íntima de arterias de gran y mediano calibre lo que produce una estenosis crónica progresiva de la luz vascular arterial y cuando estas placas se rompen desencadenan trombosis agudas o subagudas. De esta manera, la enfermedad arteriosclerótica representa un *continuum* fisiopatológico cuya máxima expresión es la trombosis arterial (10), por lo que el diagnóstico precoz de la arteriosclerosis subclínica en sus etapas iniciales es especialmente importante (*Figura 1*).

**Tabla 2.** Criterios clasificatorios para el LES (modificado de Aringer et al. 2019 (4)).

<b>Criterio de entrada:</b>			
ANA a título $\geq$ 1:80 sobre HEp-2 o una prueba equivalente positiva			
↓			
Si está ausente, no se clasifica como LES			
Si está presente, aplicar los criterios aditivos			
↓			
<b>Criterios aditivos:</b>			
El criterio no es válido si hay explicación más probable que el LES			
Es suficiente si el criterio aparece al menos en una ocasión			
El diagnóstico de LES requiere al menos un criterio clínico y $\geq$ 10 puntos			
No es necesario que los criterios estén presentes de forma simultánea			
Dentro de cada dominio, sólo se cuenta el criterio de mayor peso en la puntuación final (no se contarán los criterios adicionales dentro del mismo dominio)			
<b>Dominios y criterios clínicos</b>	<b>Peso</b>	<b>Dominios y criterios inmunológicos</b>	<b>Peso</b>
<b>Constitucional</b>		<b>Anticuerpos antifosfolipídicos</b>	
Fiebre	2	aCL, a $\beta$ 2GPI o AL	2
<b>Hematológico</b>		<b>Complemento</b>	
Leucopenia	3	C3 o C4	3
Trombocitopenia	4	C3 y C4	4
Hemólisis autoinmune	4		
<b>Neuropsiquiátrico</b>		<b>Anticuerpos específicos de LES</b>	
Delirio	2	Anti-dsDNA o Anti-Smith	6
Psicosis	3		
Convulsiones	5		
<b>Mucocutáneo</b>			
Alopecia no cicatricial	2		
Úlceras orales	2		
LCS o lupus discoide	4		
Lupus cutáneo agudo	6		
<b>Seroso</b>			
Derrame pleural o pericárdico	5		
Pericarditis aguda	6		
<b>Musculoesquelético</b>			
Afectación articular	6		
<b>Renal</b>			
Proteinuria >0,5g/24h	4		
Nefritis lúpica Clase II o V	8		
Nefritis lúpica Clase III o IV	10		
<b>Puntuación total</b>			
↓			
<b>Clasificar como LES con una puntuación de 10 o más si cumple el criterio de entrada</b>			

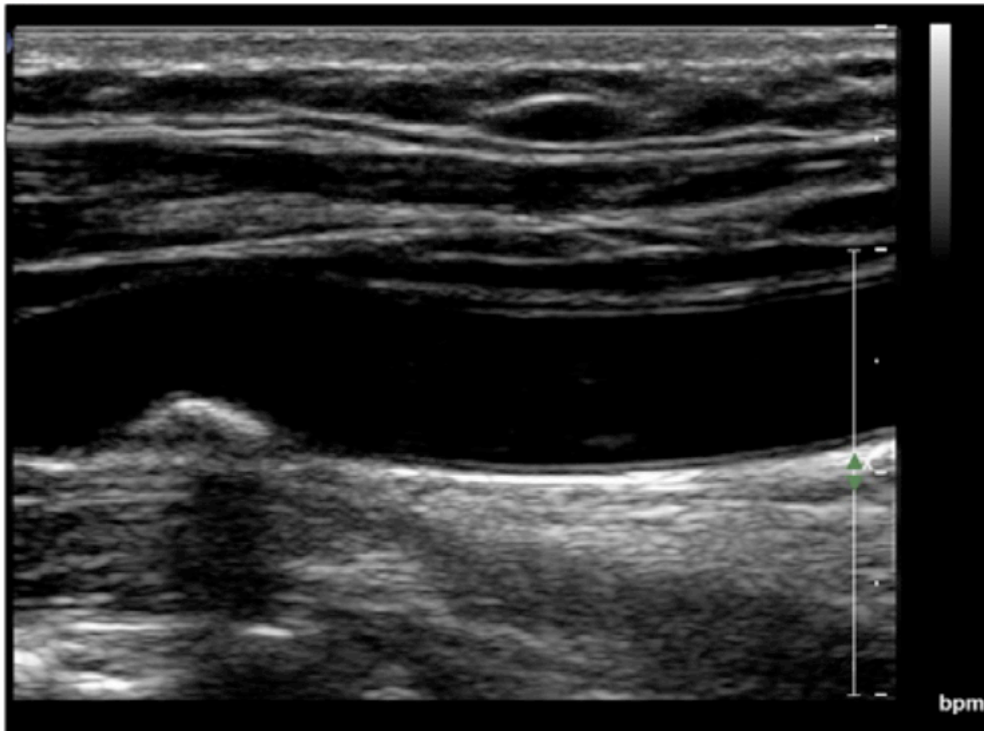
Abreviaturas: AAF: anticuerpos antifosfolipídicos; a $\beta$ 2GPI: anticuerpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I; aCL: anticuerpos anticardiolipina; AL: anticoagulante lúpico; ANA: anticuerpos antinucleares; dsDNA: DNA de doble cadena; LCSA: lupus cutáneo subagudo; LES: lupus eritematoso sistémico.

**Figura 1.** *Continuum* fisiopatológico de la enfermedad arteriosclerótica, desde la mera presencia de una placa hasta la trombosis arterial (incluye el momento en el que existe una mayor carga de arteriosclerosis antes de la ruptura de la placa y la posterior trombosis) (obtenida de Mayo Foundation for Medical Education and Research ©, accesible en el siguiente enlace: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/arteriosclerosis-atherosclerosis/symptoms-causes/syc-20350569#dialogId54004690>).



La ecografía carotídea es una técnica validada, no invasiva y de relativo bajo coste, que permite valorar la arteriosclerosis subclínica (6,9,11–13). Mediante esta técnica se pueden determinar diferentes parámetros, como el grosor íntima-media (GIM) de la arteria carótida o la presencia y número de placas de ateroma (*Figura 2*), que son marcadores aceptados de la existencia de arteriosclerosis y permiten predecir el riesgo CV (11–14). Tanto el GIM como la placa carotídea se han utilizado en grandes estudios para evaluar la arteriosclerosis carotídea (11,13) y en este sentido, el GIM carotídeo probablemente ha sido el método más utilizado hasta el momento para valorar la existencia de arteriosclerosis subclínica (6,12). La valoración de la placa carotídea parece ofrecer un poder predictivo mayor respecto al riesgo CV (11,13).

**Figura 2.** Detalle de una placa de ateroma detectada mediante ecografía carotídea (obtenida de Naqvi et al. 2014 (15)).



Cabe mencionar que en los últimos años ha cobrado mucha importancia el concepto de “carga de arteriosclerosis” como una manera más precisa de evaluar el riesgo CV. Se considera que la carga de arteriosclerosis sería un punto intermedio en el mencionado “*continuum* arteriosclerótico”, que va desde la presencia de una sola placa hasta la aparición de manifestaciones clínicas en forma de trombosis arterial (Figura 1). Su definición es muy variable, desde algunos estudios que la valoran en grados (leve, moderada o grave) hasta otros que utilizan medidas más cuantitativas como el número de placas, el grosor de la placa y el área de la placa (15). El protocolo que ha utilizado nuestro grupo para definir la carga arteriosclerótica es similar al de otros autores (14,16), y consiste en determinar el número de placas carotídeas y considerar que existe una mayor carga de arteriosclerosis cuando se documentan 2 o más placas en cualquiera de los territorios explorados. La importancia de la

cuantificación de la carga de arteriosclerosis se debe sobre todo a dos motivos. Por un lado, parece predecir mejor el riesgo CV que la mera presencia de placa (15) y por otro, se ha relacionado con la lesión de órgano diana (14,16). En un estudio que analizó la obesidad, se detectó una asociación con la carga de arteriosclerosis y no con la simple presencia de placa. Los autores sugirieron que tal vez la obesidad participa más en la progresión que en el inicio de la placa (17).

### **2.3. Síndrome antifosfolípídico y trombosis. Importancia de los anticuerpos antifosfolipídicos.**

Como ya se ha comentado, el SAF se caracteriza por el desarrollo de trombosis y por la presencia de AAF. La mayoría de estas trombosis ocurren en forma de enfermedad tromboembólica venosa (trombosis venosa profunda, tromboflebitis superficial o tromboembolismo pulmonar) o de trombosis arterial en el territorio vascular cerebral (ictus o accidente isquémico transitorio) pero potencialmente pueden afectar a cualquier órgano o tejido. El diagnóstico de las trombosis debe realizarse de forma inequívoca mediante las exploraciones complementarias correspondientes ya que son consideradas criterios clasificatorios de la enfermedad. Junto a las trombosis, las complicaciones obstétricas también son consideradas criterios clínicos clasificatorios de SAF (*Tabla 1*). Otras manifestaciones clínicas asociadas a los AAF por su elevada prevalencia, pero no incluidos en los criterios clasificatorios son la trombocitopenia, la valvulopatía, la microangiopatía renal (o nefropatía asociada a AAF), la corea y la mielitis longitudinal. Existe una variante clínica del SAF muy poco frecuente, pero con una elevada mortalidad denominada SAF catastrófico. Se caracteriza por el inicio súbito de una trombosis, sobretodo microvascular, extensa que afecta a múltiples territorios y provoca un fracaso multiorgánico (18–23).

Los AAF son un grupo heterogéneo de anticuerpos que incluye el anticoagulante lúpico (AL), los anticuerpos anticardiolipina (aCL) y los anticuerpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína-I (a $\beta$ 2GPI). Cualquiera de estos 3 tipos de AAF son imprescindibles para el diagnóstico de SAF (*Tabla 1*). A pesar de la clara relación epidemiológica de los AAF con las trombosis, su papel fisiopatológico en el desarrollo de éstas no se conoce con certeza. Además, no todos los individuos portadores de AAF desarrollan trombosis. Ésta puede afectar a diferentes territorios vasculares (arterial, venoso o ambos) sin que se conozcan cuáles son los factores que influyen en esta variabilidad clínica. Se han propuesto numerosos mecanismos de acción de los AAF en el SAF y ninguno de ellos se ha mostrado capaz por si solo de explicar de forma satisfactoria las trombosis que aparecen en estos pacientes (1,18,22,24).

Las variaciones genéticas en los genes que regulan la hemostasia podrían ayudar a predecir el riesgo trombótico o qué territorio vascular se podría ver afectado en pacientes con AAF (25–30). En este sentido, nuestro grupo demostró que la variación genética en algunos componentes del sistema hemostático como las glicoproteínas plaquetarias o el inhibidor tipo 1 del activador tisular del plasminógeno (PAI-1, por sus siglas en inglés), puede modular la expresión clínica de la trombosis arterial en pacientes con SAF (31,32).

Por otro lado, en estudios previos nuestro grupo ha demostrado que los AAF de los pacientes con SAF trombótico son capaces de incrementar la expresión de factor tisular (FT) en monocitos y a la vez estos pacientes tienen aumentada la formación basal de trombina (33). Otros autores han obtenido resultados similares y esto se ha relacionado con la presencia de arteriosclerosis y de manifestaciones trombóticas (33–38).

## **2.4. Lupus eritematoso sistémico, arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular.**

### **2.4.1. Lupus eritematoso sistémico, arteriosclerosis subclínica y ecografía carotídea.**

En pacientes con LES se ha descrito una arteriosclerosis acelerada que se ha relacionado con el riesgo y morbilidad CV (6–9,39,40). Para evaluar esta arteriosclerosis acelerada, en el LES también existe experiencia en el uso de la ecografía carotídea y parte de esta experiencia se ha originado en nuestro grupo de investigación (32,39,40). Gracias a la ecografía carotídea pudimos demostrar una mayor prevalencia y número de placas en pacientes con LES frente a aquellos con SAF primario y controles. Además, en el grupo de LES, los pacientes con SAF asociado también tuvieron mayor prevalencia y número de placas que aquellos con SAF primario. Dentro de los pacientes con SAF primario, el subgrupo con ictus de pequeño vaso presentó un mayor GIM que el resto de pacientes. La arteriosclerosis subclínica en los pacientes con LES se relacionó con un mayor daño crónico acumulado y con una mayor actividad de la enfermedad (39). La ecografía carotídea también nos permitió describir que aquellos pacientes con LES portadores de una determinada variante genética de las glicoproteínas plaquetarias tenían un mayor riesgo de desarrollar arteriosclerosis acelerada subclínica (32).

Otro grupo de investigadores utilizaron la ecografía carotídea para demostrar una progresión de la placa de ateroma más acelerada en mujeres afectas de LES que en mujeres sin LES (40). También detectaron tasas de progresión del GIM y de la placa de ateroma relacionadas tanto con los factores de riesgo CV (FRCV) tradicionales como con factores asociados al propio LES. Dado que esta relación fue independiente para cada uno de estos factores, se sospechó que podrían colaborar de forma conjunta para aumentar el riesgo CV. Finalmente, los autores de este trabajo recomendaron el

uso de la ecografía carotídea como herramienta para valorar la presencia de arteriosclerosis en pacientes con LES tanto en ensayos clínicos como en la práctica clínica diaria, considerando el seguimiento ecográfico de la placa carotídea el mejor marcador para monitorizar la progresión de la arteriosclerosis (40).

Desde entonces y hasta la actualidad, diferentes autores han recurrido a la ecografía carotídea para evaluar la presencia y el significado de la arteriosclerosis subclínica en pacientes con LES (7,41–43). Además, en los últimos años se han publicado una serie de revisiones sobre arteriosclerosis y riesgo CV en el LES en las que se resalta el valor de la ecografía carotídea (8,9,44) y una de ellas considera que la ecografía carotídea sería la prueba idónea por su bajo costo, por tratarse de una prueba segura y por la experiencia acumulada en los últimos años (9).

En lo que respecta a las guías clínicas, la última actualización del EULAR (*European League Against Rheumatism*) sobre el manejo del LES, reconoce que tanto el GIM como la placa carotídea son marcadores utilizados con frecuencia para identificar la arteriosclerosis subclínica en esta enfermedad (5).

#### **2.4.2. Lupus eritematoso sistémico y enfermedad cardiovascular.**

Los pacientes con LES tienen mayor riesgo de sufrir una ECV que la población general. Las ECVs más estudiadas en los pacientes con LES han sido la cardiopatía isquémica, la patología cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica y suponen la principal causa de muerte en estos pacientes, especialmente en la etapa tardía de la enfermedad, tal como ya describió Urowitz et al. en los años 70 (*Tabla 3*) (6,45,46).



**Tabla 3.** Prevalencia, morbilidad y FR de la ECV en pacientes con LES según diferentes estudios.

Estudio	n <sup>a</sup>	ECV	Hallazgos	FR de ECV asociados al LES
Abu-Shakra <i>et al.</i> 1995 (47)	665	ECV	Mortalidad atribuida a ECV, 15,4% y a muerte súbita, 6,5%.	Mayor tiempo de evolución.
Magder y Petri 2012 (48)	1874	ECV	Riesgo de ECV: 2,7 veces superior al riesgo esperado en la población general según el <i>Framingham risk score</i> .	Grado de actividad media del LES, niveles recientes de ds-DNA y uso actual de GC.
Manzi <i>et al.</i> 1997 (49)	498	EAC	Mayor riesgo de EAC prematura en mujeres jóvenes premenopáusicas con LES que en una muestra poblacional. Riesgo de IAM, 50 veces mayor en mujeres con LES entre 35 y 44 años que en una muestra poblacional.	Mayor edad al diagnóstico, mayor tiempo de evolución del LES, uso más prolongado de GC, hipercolesterolemia y estado postmenopáusico.
Petri <i>et al.</i> 1992 (50)	229	EAC	Prevalencia de EAC, 8,3%. Mortalidad atribuida a causa CV, 30%.	Se relacionó la EAC con edad al diagnóstico de LES, tiempo de uso de PDN, toma de antihipertensivos, nivel máximo de colesterol y obesidad.
Maksimowicz-Mckinnon <i>et al.</i> 2008 (51)	28	EAC	Al cabo de 1 año de un ICP, mayor probabilidad de IAM (15,6% vs 4,8%) y de repetir ICP (31,3% vs 11,8%) frente a pacientes sin LES.	Mayor edad y predominio de mujeres.
Tektonidou <i>et al.</i> 2016 (52)	31012 y 26144 <sup>b</sup>	EAC y ACVI	Aumento de las tasas de hospitalización por IAM y ACVI con el tiempo en pacientes con LES frente a la disminución en población general.	Mayor edad y predominio de mujeres.
Arkema <i>et al.</i> 2017 (53)	3390	ACVI	Riesgo de ACVI, 2 veces mayor que en población general. Mayor riesgo de ACVI en el primer año de seguimiento.	Edad inferior a 50 años y predominio en mujeres.
Wiseman <i>et al.</i> 2016 (54)	51	ACVI	Mayor enfermedad cerebrovascular de pequeño vaso frente a controles sanos y paciente con ictus menor.	Ninguna asociación.
Chuang <i>et al.</i> 2015 (55)	10144	ArPe	Riesgo de ArPe, 2 veces mayor que en controles sin LES. Mayor riesgo de ArPe en el primer año de seguimiento.	Edad inferior a 34 años.
Hassan <i>et al.</i> 2013 (56)	120	ArPe	Prevalencia de ArPe, 25% versus 6% en los controles.	Duración de la enfermedad, mayor BILAG score, mayor VSG, descenso de C3 y C4, uso prolongado de GC y mayor alteración de los parámetros de coagulación.
Erdozain <i>et al.</i> 2014 (57)	216	ArPe	Prevalencia de ArPe, 21%.	Edad.

<sup>a</sup> número de pacientes con LES en el estudio; <sup>b</sup> número de hospitalizaciones por IAM y ACVI en pacientes con LES durante el período 1996-2012, respectivamente.

Abreviaturas: ACVI: accidente cerebrovascular isquémico; ArPe: arteriopatía periférica; BILAG: siglas en inglés de la escala de actividad del LES “*British Isles Lupus Assessment Group*”; CV: cardiovascular; dsDNA: DNA de doble cadena; EAC: enfermedad arterial coronaria; ECV: enfermedad CV; FR: factores de riesgo; GC: glucocorticoides; IAM: infarto agudo de miocardio; ICP: intervencionismo coronario percutáneo; LES: lupus eritematoso sistémico; PDN: prednisona; VSG: velocidad de sedimentación globular.

Sin embargo, estas manifestaciones vasculares no se explican completamente por los FRCV tradicionales (*Tabla 4*) (6,58), y se han propuesto factores relacionados con la propia enfermedad, como son el tiempo de evolución, los diferentes tratamientos recibidos y el sustrato inflamatorio crónico (6,59–61).

**Tabla 4.** Relación entre las complicaciones vasculares observadas en el LES y las esperadas según los modelos de Framingham (*modificado de Esdaile et al. 2001* (58)).

Fenómenos vasculares	Número de fenómenos observados	Número de fenómenos esperados	Ratio fenómenos observados y esperados	IC 95%
IAM no fatal	17	1,7	10,1	5,8-15,6
Muerte atribuída a EAC	12	0,7	17,0	8,1-29,7
Eventos globales atribuídos a EAC	34	4,5	7,5	5,1-10,4
Ictus	16	2,0	7,9	4,0-13,6

Abreviaturas: EAC: enfermedad arterial coronaria; IC: intervalo de confianza; IAM: infarto agudo de miocardio; LES: lupus eritematoso sistémico.

La relación entre la inflamación crónica y la ECV arteriosclerótica se ha analizado en los últimos años. Se cree que la disfunción endotelial arteriosclerótica podría ser el resultado de la interacción entre diferentes componentes, como son los FRCV tradicionales, mecanismos inmunomediados y desencadenantes inflamatorios (62). Del mismo modo, también se ha aceptado el papel de la inflamación en el desarrollo de la trombosis y recientemente se han creado términos como inmunotrombosis o tromboinflamación para hacer referencia a esta interacción y los mecanismos que la sustentan (63). En este escenario de inflamación y daño vascular, propio de las EAS, las MPs circulantes pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo de trombosis (64–68).

## **2.5. Fisiología de la coagulación.**

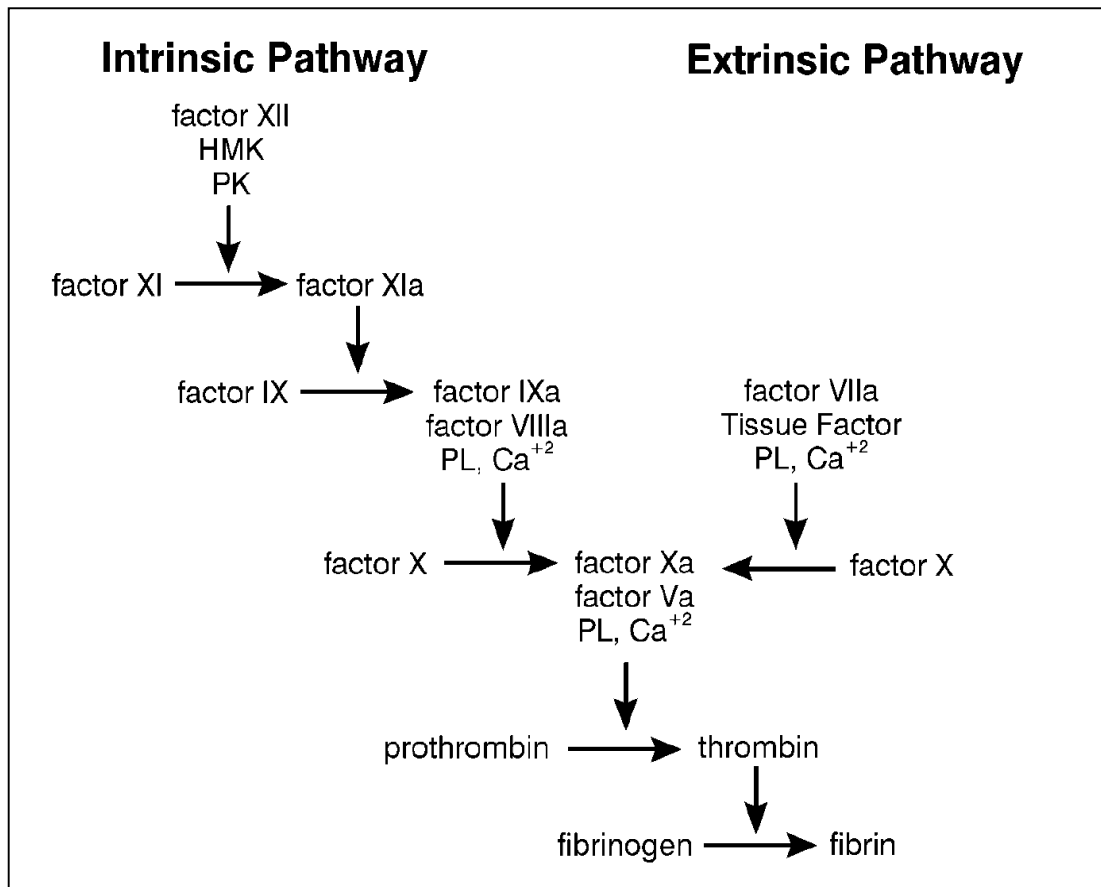
### **2.5.1. La visión inicial de la coagulación: de los primeros descubrimientos a la cascada de la coagulación.**

La coagulación siempre se ha considerado un proceso complejo. En un principio se pensaba que la exposición de la sangre al aire tras una lesión era la que activaba el proceso de coagulación pero ya a mediados del siglo XIX se sugirió que dicha activación dependía de algún componente específico de la sangre (69–71). A principio del siglo XX se propuso un modelo de 4 factores de la coagulación donde, en presencia de calcio y FT (entonces llamado tromboplastina), la protrombina se convertía en trombina y esta a su vez, convertía el fibrinógeno en fibrina (72,73). Sin embargo, el resto de los componentes no se descubrieron hasta mediados de dicho siglo (71–73). En 1957 ya se conocían la mayoría de los factores de la coagulación identificados con números romanos según el orden de su descubrimiento y a los cuales se les fue otorgando el nombre de su descubridor o el del primer paciente en el que se detectó su deficiencia (71,72). Entre estos factores estaban el factor (F) de von Willebrand (FvW), el FV, el FVII, el FVIII, el FIX, el FX y el FXI (72,73).

En 1964 dos grupos de investigadores independientes publicaron un modelo de “*waterfall*” o cascada de la coagulación (74,75). En este modelo cada factor de la coagulación se encontraba primero en una forma de proenzima y potencialmente podía convertirse en una forma enzimática activa; de esta manera, cada factor que se activaba conducía a la activación del siguiente hasta desencadenar una producción “explosiva” de trombina (71–73,76,77). En esta primera versión de la cascada, sólo se definió claramente la vía intrínseca, llamada así porque todos los componentes necesarios de esta vía estaban dentro del torrente circulatorio. Posteriormente el

modelo se fue revisando hasta describir también la vía extrínseca, definida así porque precisaba de un factor que en ese momento se creía que sólo estaba en el territorio extravascular, el FT (77). Por tanto, el modelo completo consistía en un esquema en forma de “Y” donde las 2 vías, intrínseca (iniciada por el FXII) y extrínseca (iniciada por el complejo FVIIa/FT), confluían en una vía común generando de forma paralela el complejo protrombinasa FXa/FVa que era el que desencadenaría la producción masiva de trombina (71–73,76,78). Durante todo este proceso de investigación también se descubrieron procofactores que se convertían en cofactores sin actividad enzimática y que colaboraban en diferentes pasos de la cascada (71). También se detectó que la mayoría de estas reacciones requerían calcio y ocurrían en una superficie membranosa de fosfolípidos, siendo el fosfolípido principal la fosfatidilserina (FS) (71,78,79). En la *Figura 3* queda representado el modelo de cascada de la coagulación.

**Figura 3.** Modelo desarrollado de la cascada de la coagulación (*obtenida de Hoffman et al. 2001 (79)*).



Este modelo de la coagulación supuso un gran avance para empezar a comprender como funciona la coagulación. Además, las actuales pruebas de coagulación, el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) y el tiempo de protrombina, se corresponden perfectamente con el funcionamiento de la vía intrínseca y extrínseca respectivamente (71,72,76,79). Sin embargo, aunque el modelo de la cascada representaba muy bien el desarrollo de la coagulación “in vitro” no conseguía explicar ciertas situaciones que ocurrían “in vivo”. Por ejemplo, la vía extrínseca no conseguía compensar el déficit de determinados factores de la vía intrínseca, concretamente el déficit de los factores VIII y IX responsables de las hemofilias A y B, respectivamente. Del mismo modo, en ausencia del FVII, la vía intrínseca no

conseguía compensar este déficit en la vía extrínseca. También se observó que la vía intrínseca se podía activar en ausencia del FXII o de sus cofactores, lo cual alargaba el TTPa pero no producía sangrado, y que el déficit del FXI no producía sangrados tan importantes como los detectados con los déficits de los factores FVIII y FIX. En cualquier caso, ninguna de las vías conseguía realizar una correcta coagulación cuando la otra vía fallaba, por lo que, de alguna manera, más que dos vías que funcionaran de manera paralela, independiente y redundante, parecía que cada una de las vías dependiera de la otra para la correcta formación del coágulo (71,72,76,78,79). De hecho se descubrió que el complejo FVIIa/FT podía activar el FIX y el FX y que la trombina podía activar directamente el FXI en las plaquetas activadas sin necesidad de FXII (72,79,80). Gracias al trabajo de múltiples investigadores, se consiguió desarrollar un modelo que explicaba gran parte de estas cuestiones, el llamado modelo celular (71,72,76–79).

### **2.5.2. El modelo celular de la coagulación.**

La investigación posterior se ha enfocado en el modelo celular de la coagulación, el cual sugiere que para comprender el funcionamiento de la hemostasia hay que incorporar el papel de las células en el control y coordinación de la coagulación. El objetivo del sistema hemostático es conseguir la formación de un tapón de fibrina y plaquetas impermeable en el sitio de la lesión, pero también que las sustancias procoagulantes no se diseminen por el torrente circulatorio y que permanezcan en el mismo sitio de la lesión. Uno de los mecanismos de control se basa en situar las reacciones procoagulantes en determinadas superficies celulares. Además, los diferentes tipos celulares desempeñan papeles distintos e incluso contrapuestos, como las plaquetas con función procoagulante o las células endoteliales con acciones

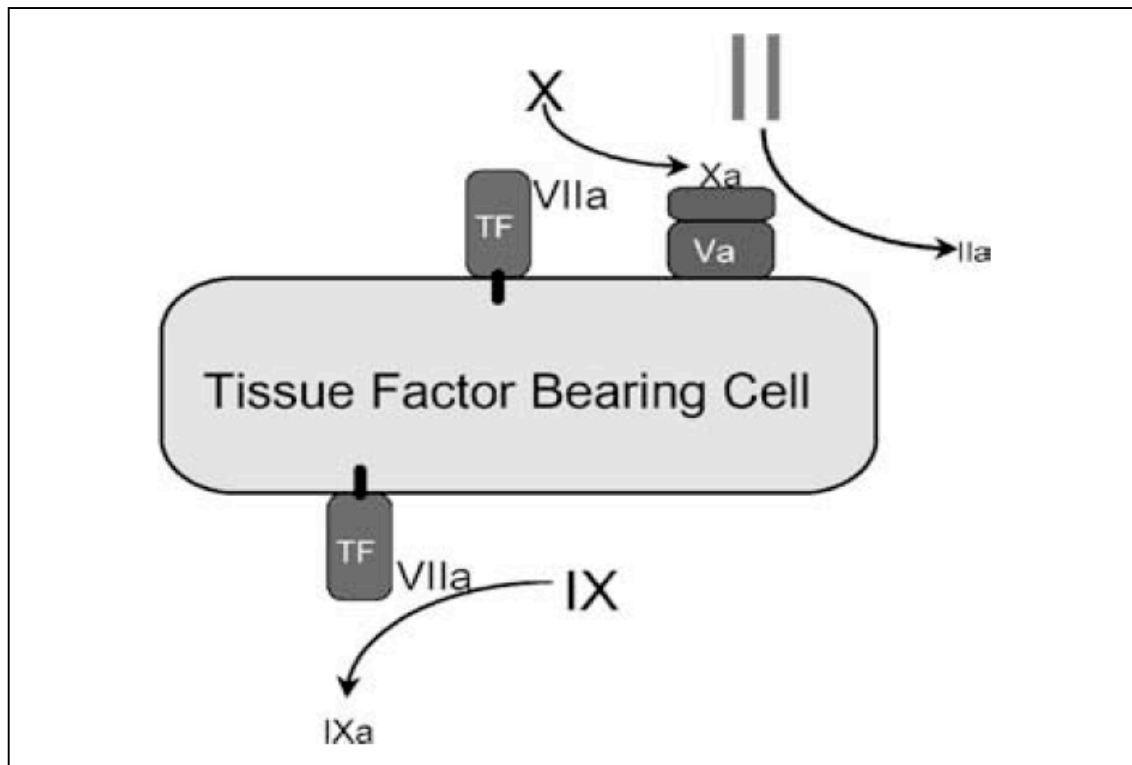
anticoagulantes. Por otro lado, los dos tipos celulares imprescindibles para el inicio de la coagulación, las células portadoras de FT y las plaquetas, se encuentran separadas hasta que una lesión hace que se pongan en contacto para iniciar el proceso. El modelo celular de la coagulación consiste en 3 pasos diferentes, los cuales a su vez se superponen: la fase de iniciación, la de amplificación y la de propagación (76,78).

#### **2.5.2.1. Fase de iniciación.**

En la fase inicial, la coagulación se activa mediante las células portadoras de FT, normalmente localizadas en el espacio extravascular y que quedan expuestas tras una lesión vascular. El FT forma un complejo con el FVIIa (FVIIa/FT) que a su vez activa al FIX por un lado, y al FX por otro, generando pequeñas cantidades de FIXa y de FXa. En paralelo, las plaquetas que comienzan a adherirse en el sitio de la lesión, se activan parcialmente y liberan FV de sus gránulos alfa. Este FV se activa por el FXa o por otras proteasas. La unión del FXa con el FVa da lugar al complejo protrombinasa (FXa/FVa) en la superficie de estas células portadoras de FT, que genera una pequeña cantidad de trombina (*Figura 4*) (71,73,76,78).

El FXa que permanece en la superficie de las células portadoras de FT está suficientemente protegido de los inhibidores plasmáticos de las proteasas. Sin embargo, el que se libera es rápidamente inhibido por el inhibidor de la vía del FT (TFPI, por sus siglas en inglés) y por la antitrombina (AT). Esto hace que el FXa sólo pueda ejercer su función procoagulante sobre la superficie celular en la que se ha formado. En cambio, el FIXa sí que puede liberarse y llegar a través del plasma hasta las plaquetas u otras células cercanas, ya que sólo es inhibido y de forma lenta por la AT (71,73,76,78).

**Figura 4.** Esquema de la fase de iniciación (*obtenida de Hoffman et al. 2003 (76)*).



#### **2.5.2.2. Fase de amplificación.**

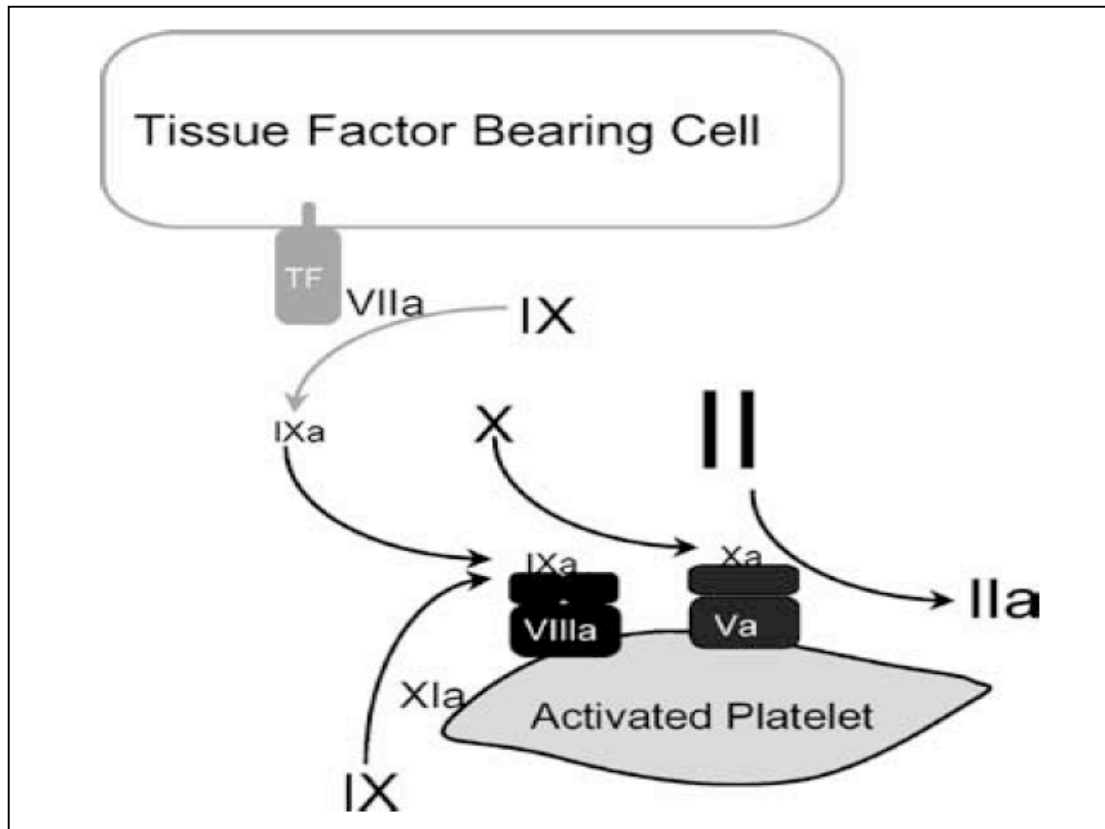
Posteriormente se lleva a cabo la fase de amplificación, donde la pequeña cantidad de trombina producida en la fase de iniciación ejerce varias funciones. Primero activa completamente a las plaquetas que se habían activado solo parcialmente al unirse al sitio de la lesión y, tras esta activación, las plaquetas modifican sus fosfolípidos de membrana aumentando la concentración de FS para crear una superficie procoagulante. En paralelo, escinde el FXI para generar FXIa sobre la superficie plaquetaria. Además, la trombina activa al cofactor FVIII (tras escindirlo del FvW) y al FV sobre la superficie plaquetaria (*Figura 5*).

Al final de esta fase, las plaquetas se han convertido en el soporte necesario para los factores FIXa y FXa y de esta manera, todo está preparado para la producción de trombina a gran escala en la siguiente fase (71,73,76,78).





**Figura 6.** Esquema de la fase de propagación (obtenida de Hoffman et al. 2003 (76)).



### 2.5.3. Anticoagulantes naturales.

La cascada de coagulación explicada causa una respuesta hemostática rápida y localizada, pero si no se controla puede causar trombos. En condiciones fisiológicas, al mismo tiempo que se desarrolla la fase de amplificación y propagación de la coagulación, ésta se ve contrarrestada por la activación de los anticoagulantes naturales en parte por la propia trombina. Estos anticoagulantes naturales al final se imponen y finalizan la formación de fibrina. Además, la propia fibrina y la trombina promueven la fibrinólisis, con la formación de plasmina que degrada el coágulo (81).

Los principales factores reguladores son la AT, el sistema anticoagulante de la PC y el TFPI. La AT es el principal inhibidor de la trombina y del FXa y, además, neutraliza a los factores IXa, XIa y XIIa. El sistema anticoagulante de la PC inhibe la formación

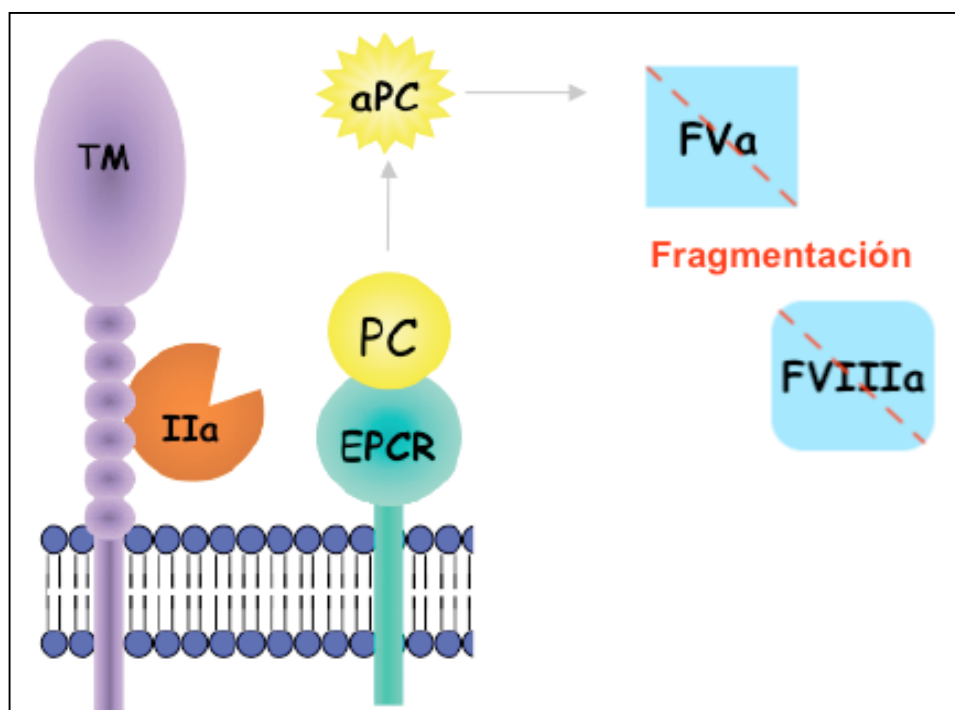
de trombina mediante la degradación proteolítica de FVa y FVIIIa. Finalmente, el TFPI, inhibe al FVIIa que está unido al FT.

## **2.6. El sistema anticoagulante de la proteína C.**

Uno de los más importantes mecanismos encargados de controlar la coagulación para evitar que se produzcan trombos en otros territorios diferentes al sitio de la lesión es el sistema anticoagulante de la PC (76). Está compuesto por la proteína C y la proteínas S y también participan en él la trombomodulina (TM) y el EPCR, así como la propia trombina.

La PC se activa gracias a la unión de la trombina con la TM. Parte de la trombina que se forma durante el proceso de coagulación, se difunde lejos del sitio de la lesión y llega a contactar con células endoteliales intactas. De esta manera se une a la TM de la superficie endotelial. La PC en su forma activada (PCa) y unida a su cofactor, la proteína S, ejerce una función anticoagulante al fragmentar los factores Va y VIIIa de la coagulación, cruciales para la formación de los complejos tenasa y protrombinasa de la fase de propagación (73,76,82). El EPCR tiene un importante papel en esta vía ya que la unión de la PC al EPCR incrementa hasta veinte veces la eficacia de la activación de la PC por el complejo trombina-TM (*Figura 7*) (73,82–84).

**Figura 7.** Esquema representativo de la activación de la proteína C y de la función de la proteína C activada (*obtenido y modificado de Gandrille et al. 2008 (84)*).



### 2.6.1. El receptor endotelial de la proteína C.

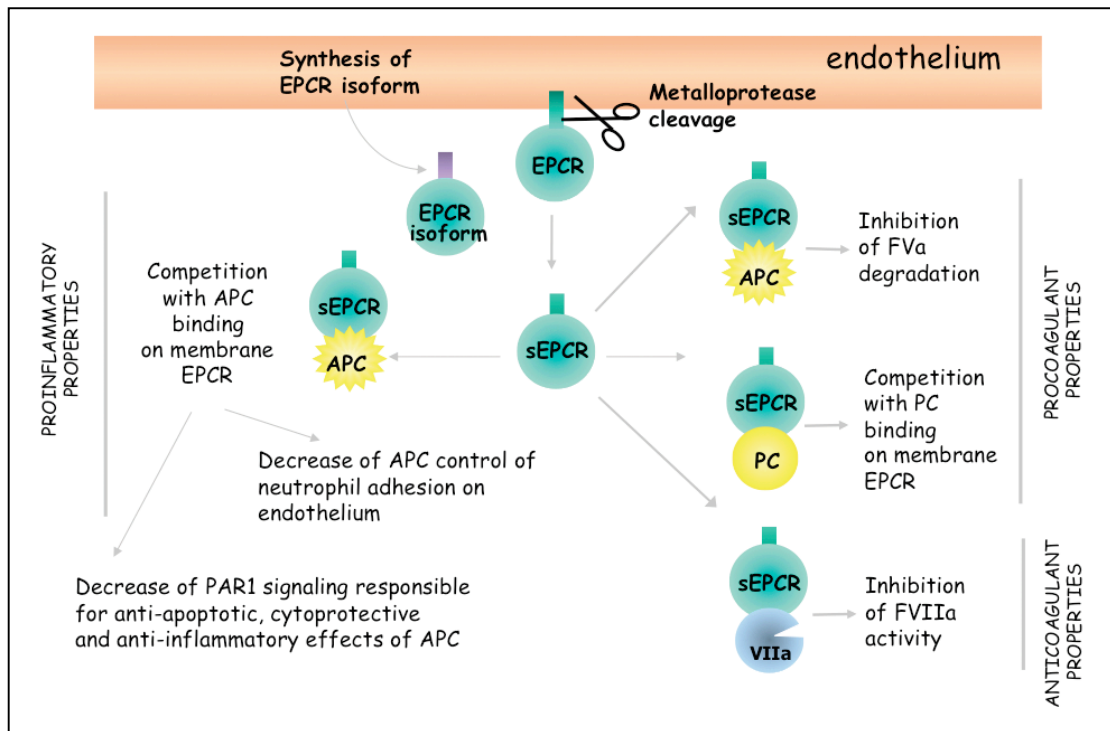
El EPCR es una proteína transmembrana de tipo I que se expresa sobre todo en las células endoteliales de los vasos arteriales y venosos de mediano y gran calibre y en el trofoblasto y disminuye paulatinamente al disminuir el tamaño de los vasos. Ya se ha comentado su importante papel al aumentar la activación de la PC a través del complejo trombina-TM favoreciendo por tanto, la acción anticoagulante de dicha proteína (73,82–84).

El EPCR se detecta también en el plasma en su forma soluble (sEPCR). Su significado fisiológico ‘in vivo’ no se conoce con certeza aunque se cree que puede inhibir la activación de la PC y la actividad anticoagulante de la PCa (84–89) por lo que aumentaría el riesgo de trombosis. Paralelamente, estudios ‘in vitro’ han

detectado que el sEPCR se puede unir al factor VIIa lo que reduce la acción procoagulante de éste (Figura 8) (90).

Por otro lado, se considera que el sEPCR juega un papel clave en los procesos inflamatorios (Figura 8) y se han encontrado niveles elevados de sEPCR en pacientes con EAS como es el caso del LES (84,91,92) y de la enfermedad de Behçet (EB) (93). Por tanto, el sEPCR podría colaborar en las manifestaciones tromboticas del LES y del SAF.

**Figura 8.** Esquema de las funciones conocidas de la forma soluble del receptor endotelial de la proteína C (sEPCR) (obtenida de Gandrille et al. 2008 (84)).



### **2.6.2. Regulación genética del receptor endotelial de la proteína C: los haplotipos *PROCR*.**

Los niveles plasmáticos de sEPCR parecen estar regulados genéticamente mediante los diferentes polimorfismos del gen EPCR (*PROCR*) (85,87,88,94–100). Se han descrito hasta 4 haplotipos del *PROCR* (H1, H2, H3 y H4) (85,95,96,98). Entre ellos, los haplotipos H1 y H3 han sido los más estudiados y se han relacionado con los niveles de sEPCR y con la trombosis.

El haplotipo H1 tiene varios polimorfismos identificativos, entre ellos están el 7014G/C o el 4678G/C (*PROCR* variante-rs9574 (98)). Este haplotipo se ha asociado con mayores niveles de PCa (96,98,101,102) y niveles reducidos de sEPCR (98,103) y, en este sentido, se ha descrito un efecto protector frente a la trombosis venosa (96,98,99,102,104) y arterial (101). Sin embargo, en un reciente metaanálisis, el haplotipo H1 no se relacionó con la trombosis venosa cuando sólo se tuvieron en cuenta aquellos estudios que incluían un grupo control emparejado según edad y sexo (105).

El haplotipo H3 se identifica también a través de sus correspondientes polimorfismos como el 1651C/G y el 6936A/G (*PROCR* variante-rs867186 (98,106)). Este último da lugar a una sustitución Ser→Gly en el residuo 219 de la proteína (219Gly), el cual está localizado en el dominio transmembrana del EPCR. Se han descrito al menos dos mecanismos que favorecen el aumento de los niveles de sEPCR. Uno de ellos es la proteólisis del EPCR desde las células endoteliales donde la sustitución Ser→Gly en el dominio transmembrana del EPCR, aumentaría la sensibilidad para su escisión mediante metaloproteasas y su liberación al plasma en forma soluble (97,98,106,107). El otro mecanismo consiste en la generación de una isoforma sEPCR, producida y secretada por un “ARNm truncado” (98,106,108). Teniendo en cuenta esto, el

haplotipo H3 se ha asociado con un aumento de los niveles plasmáticos de sEPCR (85,87,88,95–101,103) y en varios estudios se ha sugerido que es un factor de riesgo de trombosis venosa (85–88,98,99,106,107,109), aunque no todos han podido confirmar estos datos (95,96,102,110). Por otro lado, algunos autores han relacionado este haplotipo con un riesgo aumentado de trombosis arterial en pacientes diabéticos (111) y aunque otros investigadores no encontraron ninguna asociación (106,112), de forma paradójica también se ha descrito que el haplotipo H3 actúa como factor protector de la trombosis arterial y que se asocia a un aumento de los niveles de PCa (101,109).

En lo que respecta a las EAS, sólo se ha analizado el papel de los haplotipos *PROCR* en dos estudios. En el primero se describió una mayor prevalencia del haplotipo H3 en paciente con LES respecto a controles, pero no se halló relación con el daño vascular (92). En el segundo, se analizaron los haplotipos H1 y H3 en pacientes con EB. Se detectó que el haplotipo H1 actuaba como un factor protector frente a las trombosis venosas y esto se relacionó con unos niveles de PCa más elevados (102). Hasta el momento no se ha analizado el papel de los haplotipos *PROCR* en pacientes con SAF.

## **2.7. Las micropartículas circulantes y el balance hemostático.**

### **2.7.1. Función protrombótica de las micropartículas.**

Las células sanguíneas, concretamente las plaquetas, los leucocitos, los eritrocitos y las células endoteliales, en situaciones de inflamación o de activación son capaces de liberar fragmentos de sus membranas lo que da lugar a las MPs, de tamaño inferior a 1 µm. Éstas contienen en su superficie proteínas y lípidos de membrana de las células

de las que proceden y pueden actuar como vectores funcionales de dichas proteínas y lípidos (64–66,113). En el laboratorio, las MPs pueden detectarse mediante citometría de flujo o mediante ensayos funcionales (114).

En los últimos años se ha vinculado a las MPs con el modelo celular de la coagulación ya que se ha demostrado que pueden ejercer una acción procoagulante participando en las fases de iniciación y propagación. Esto se ha relacionado con la capacidad que tienen las MPs para expresar en su superficie por un lado FT, el elemento clave que desencadena la ya descrita fase de iniciación, y por otro lado FS, un fosfolípido necesario para el ensamblaje y funcionamiento óptimo de los complejos de la coagulación, cruciales en la fase de propagación (64–68,71,73,115–117). En este sentido, se ha comprobado que las MPs derivadas de plaquetas y eritrocitos desencadenan un aumento de la generación de trombina a través del FXIIa (118). Las MPs también pueden expresar en su superficie P-selectina o FvW, lo cual se ha relacionado con un aumento de la activación y agregación plaquetaria y con su adhesión al endotelio (64–66,71). En relación con todo lo previamente comentado, se han descrito niveles elevados de MPs en diferentes patologías y existe una clara asociación entre las MPs, el riesgo de trombosis y la ECV (68,71,77,117,119–124).

Sin embargo, en condiciones normales, el FT que circula unido a las MPs (y a otros elementos celulares) se encuentra en una forma inactiva o encriptada. Actualmente se desconoce el mecanismo exacto, pero se cree que se podría activar rompiendo algún tipo de enlace, o bien si la superficie de membrana expresara también FS convirtiéndola en una superficie procoagulante (67,71,73). En cualquier caso, este FT inactivo ligado a las MPs representa un “almacenamiento de FT circulante”, que en determinadas circunstancias podría activarse, y dar soporte en la generación de trombina durante la formación del coágulo (65).



### **2.7.2. Potencial anticoagulante de las micropartículas.**

Se ha constatado que las MPs no ejercen únicamente un papel procoagulante a través del FT y de la FS, sino que pueden expresar en su superficie los componentes necesarios para sustentar la activación de la vía de la PC. Se ha demostrado que las MPs presentan en su superficie PC y proteína S, adheridas desde el plasma, y, de forma constitutiva, el EPCR y la TM (115,125–129).

Por tanto, las MPs pueden tener una importante función anticoagulante al sustentar toda la maquinaria necesaria para la activación de la PC que contrarresta su acción procoagulante a través del FT y la FS. Esto podría controlar la formación de trombina, la extensión del trombo en formación y de esta manera, modular la expresión clínica trombótica.

### **2.7.3. Las micropartículas circulantes en las trombosis de las enfermedades autoinmunes sistémicas.**

En el caso de la patogenia de la arteriosclerosis y de la trombosis en las EAS como el LES y el SAF, se debe tener en cuenta el sustrato inflamatorio crónico. Actualmente se considera que dicho sustrato, junto con el sistema inmunológico, participan directamente en el inicio y progresión de la arteriosclerosis pudiendo desencadenar finalmente las diferentes manifestaciones de la ECV (6,62). Además, los procesos inflamatorios y la hemostasia tienen varias vías de activación y sistemas regulatorios comunes. En los procesos inflamatorios, el balance hemostático puede alterarse de manera que existe un incremento de los factores procoagulantes y una reducción de los mecanismos anticoagulantes (63,73). Por otro lado, en el LES se ha demostrado un mayor riesgo de padecer arteriosclerosis y ECV con respecto a la población

general (6,39,40,58–60) y en el SAF son características las manifestaciones trombóticas (1,2). Es posible que la actividad procoagulante de las MPs juegue un papel en este sentido y de hecho, se piensa que las MPs podrían explicar la relación existente entre inflamación, autoinmunidad y trombosis (64,65).

Las MPs actúan como moduladores en varios procesos fisiopatológicos tales como el daño endotelial (67), la inflamación crónica y las trombosis (68). Además, participan en los diferentes pasos de la arteriosclerosis (130) y se han relacionado específicamente con la carga de arteriosclerosis (131,132) y con la trombosis arterial (122–124) y venosa (119–121). En algunos de estos estudios no todos los subtipos de MPs se relacionaron por igual con la trombosis arterial (122,124).

En esta misma línea, varios estudios han detectado un aumento del número de MPs en los pacientes con LES (133–140) y SAF (134,140–143) aunque algunos de los resultados son contradictorios (136,138,140,143). Dicho aumento de MPs se ha relacionado con la presencia de AL, lo cual se ha atribuido a causas inflamatorias (140,141), y también se ha asociado a un mayor riesgo de trombosis (142). En pacientes con LES, los niveles elevados de MPs se han relacionado con un aumento de la generación de trombina (133), con disfunción endotelial (134) y también con ECV (138) y trombosis arterial (136).

Por otro lado, se ha demostrado que el plasma de los pacientes con SAF ó LES es capaz de incrementar la liberación de MPs ‘in vitro’ a partir de células endoteliales de cordón umbilical en cultivo. Sin embargo, solamente las MPs procedentes de células endoteliales incubadas con plasma de pacientes con SAF mostraron actividad procoagulante y no así las generadas por incubación con plasma de pacientes con LES (140). Estos hallazgos sugieren que los AAF pueden modificar el contenido y la acción procoagulante/anticoagulante de las MPs en el SAF, pero su mecanismo es

desconocido. Hay que señalar que las MPs expresan en su superficie  $\beta 2$  glicoproteína-I ( $\beta 2$ GPI), el cofactor de los AAF, adherida a fosfolípidos aniónicos (125) y por otro lado, ya hemos comentado la importancia de la PC en la regulación de la coagulación (73,76,82), la cual también está presente en las MPs (115,125–129). En este sentido, existe evidencia de una resistencia adquirida de la PC inducida por los AAF, que ha sido propuesto como mecanismo patogénico de las trombosis en el LES y en el SAF (144,145). La interacción de los AAF con la  $\beta 2$ GPI de las MPs podría dificultar la activación de la PC dependiente del EPCR y favorecer la expresión de FT, contribuyendo finalmente al desarrollo de trombosis venosas y arteriales. Por tanto, las MPs podrían ser un factor patogénico potencial de las manifestaciones trombóticas del SAF.

Por toda esta evidencia, se ha propuesto que las MPs podrían actuar como biomarcadores de riesgo CV e incluso como posibles dianas terapéuticas (68,130,146,147). En este sentido, se ha demostrado que tratamientos que incluyen fármacos como los antagonistas de los receptores de angiotensina II, estatinas, ácido acetilsalicílico o inmunodepresores, disminuyen los niveles de MPs (148–151), lo que apoyaría el papel de las MPs como posibles dianas terapéuticas para reducir el riesgo CV.

### **3. HIPÓTESIS**



Tanto el SAF como el LES poseen una base autoinmune e inflamatoria y una mayor frecuencia de ECV. Los mecanismos de la coagulación pueden estar especialmente implicados en el desarrollo de la arteriosclerosis acelerada o de las trombosis en estas enfermedades.

Entre los mecanismos de la coagulación potencialmente implicados, el EPCR, en concreto su forma soluble (sEPCR) y las alteraciones genéticas que determinan sus niveles (haplotipos del *PROCR*), pueden interferir con la activación de la PC y en la actividad de la PCa, lo que podría predisponer al desarrollo de trombosis en los pacientes con LES o SAF.

Por otra parte, las MPs circulantes, cuyos niveles están incrementados en procesos inflamatorios crónicos, ejercen su función procoagulante al incrementar la concentración local de FT y de FS en el trombo en formación y, por otro lado, poseen una actividad anticoagulante basada en soportar la activación de la PC a través del EPCR. En el LES y en el SAF, la función procoagulante de las MPs podría jugar un papel en la arteriosclerosis subclínica acelerada y en las manifestaciones trombóticas que presentan.

En el SAF, los efectos de las alteraciones en el EPCR y de las MPs circulantes, podrían ser aditivos a las restantes acciones de los AAF sobre la hemostasia, modulando de forma conjunta la expresión clínica trombótica. Esto supondría un nuevo mecanismo que ayude a explicar la fisiopatología de las trombosis en esta entidad.



## **4. OBJETIVOS**





#### **4.1. Objetivo global:**

- Investigar el papel de nuevos parámetros de la hemostasia, en concreto el del receptor endotelial de la proteína C (mediante la forma soluble de este receptor, el sEPCR y los polimorfismos del gen que lo codifica, el *PROCR*) y el de las micropartículas circulantes, en la patología cardiovascular de pacientes con síndrome antifosfolipídico o lupus eritematoso sistémico.

#### **4.2. Objetivos específicos:**

##### **Primer estudio:**

1. Analizar la relación entre las manifestaciones trombóticas y los niveles plasmáticos del sEPCR en los pacientes con síndrome antifosfolipídico y con lupus eritematoso sistémico.
2. Estudiar la relación entre las manifestaciones trombóticas y los polimorfismos del *PROCR* (1651C/G y 7014G/C; haplotipos H3 y H1, respectivamente) en los pacientes con síndrome antifosfolipídico y con lupus eritematoso sistémico.
3. Evaluar la relación entre los polimorfismos del *PROCR* (haplotipos H3 y H1) y los niveles plasmáticos del sEPCR en los pacientes con síndrome antifosfolipídico y con lupus eritematoso sistémico.

##### **Segundo estudio:**

1. Estudiar la actividad procoagulante de las micropartículas circulantes en los pacientes con lupus eritematoso sistémico y con síndrome antifosfolipídico.
2. Analizar la relación entre las micropartículas procoagulantes y la presencia de arteriosclerosis o de trombosis en el lupus eritematoso sistémico y en el síndrome antifosfolipídico.



## **5. METODOLOGÍA Y RESULTADOS (ARTÍCULOS)**



### **5.1. Primer estudio.**

***The H1 haplotype of the endothelial protein C receptor protects against arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome.***

Miguel Angel Plasín-Rodríguez, Ignasi Rodríguez-Pintó, Patricia Patricio, Joan Monteagudo, Ricard Cervera, Joan Carles Reverter, Gerard Espinosa, Dolors Tàssies.

Thromb Res. 2018 Sep;169:128-134.

doi: 10.1016/j.thromres.2018.07.006. Epub 2018 Jul 4.

**Objetivo:** Analizar la relación entre las manifestaciones trombóticas, los niveles plasmáticos del sEPCR y los polimorfismos del *PROCR* en los pacientes con síndrome antifosfolipídico y con lupus eritematoso sistémico.

Factor de impacto de la revista: 2.869

Segundo Cuartil (Q2) del Área de Hematología





Full Length Article

## The H1 haplotype of the endothelial protein C receptor protects against arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome



Miguel Angel Plasín-Rodríguez<sup>a</sup>, Ignasi Rodríguez-Pintó<sup>a</sup>, Patricia Patricio<sup>a</sup>, Joan Monteagudo<sup>b</sup>, Ricard Cervera<sup>a</sup>, Joan Carles Reverter<sup>b</sup>, Gerard Espinosa<sup>a</sup>, Dolors Tàssies<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Haemotherapy and Haemostasis, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
PROCR haplotypes  
EPCR gene  
sEPCR  
Antiphospholipid syndrome  
Thrombosis

### ABSTRACT

**Introduction:** Genetic variants in the endothelial protein C receptor gene (*PROCR*) may contribute to the thrombosis risk by regulating levels of the soluble form of this protein (sEPCR). We evaluated whether *PROCR* polymorphisms and sEPCR levels play a role in the thrombotic manifestations of antiphospholipid syndrome. **Materials and methods:** One hundred and seventy-five patients (62 with primary antiphospholipid syndrome, 30 with antiphospholipid syndrome associated with systemic lupus erythematosus, 40 with systemic lupus erythematosus without antiphospholipid antibodies and 43 with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies) and 66 healthy controls were included. *PROCR* H1 and H3 haplotypes were determined by genotyping 7014G/C and 1651C/G tag-polymorphisms, respectively. sEPCR levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** *PROCR* haplotype distribution was similar among groups of patients and controls. *PROCR* H1 and H3 haplotypes were less prevalent in antiphospholipid syndrome patients with arterial thrombosis than those without arterial thrombosis, but statistical significance was only reached for the H1 haplotype (58.0% vs. 85.7%,  $p = 0.003$ ; odds ratio: 0.23 [95% CI 0.08–0.65]). No relationship between the *PROCR* H1 and H3 haplotypes and venous thrombosis was found. sEPCR levels were higher in H3 than in H1 carriers (175.5 [95% CI 60.9–290.1] ng/ml vs. 69.1 [95% CI 61.5–76.9] ng/ml,  $p < 0.01$ ). No relationship of sEPCR with arterial or venous thrombosis was found. **Conclusion:** The *PROCR* H1 haplotype was less frequently found in APS patients with arterial thrombosis, suggesting a protective effect of *PROCR* H1 against arterial thrombosis in these patients. No relationship between sEPCR and thrombosis was found.

### 1. Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is the leading cause of acquired thrombophilia and is characterized by arterial or venous thrombosis or pregnancy morbidity and the persistence of antiphospholipid antibodies (aPL) [1]. Despite the clear epidemiological link between aPL and thrombosis, the pathogenic role of aPL in the development of thrombosis has not been fully elucidated. Furthermore, not all aPL carriers develop thrombosis and, when the thrombotic event appears, it may affect the arterial or venous vessels, or both. The factors influencing this variability in clinical manifestations are not clear. Genetic variations in haemostasis genes are interesting candidate markers that might help to predict which individuals with aPL will suffer thrombosis and, mainly,

which vascular territory will be affected [2–4]. In this regard, our group demonstrated that genetic variations in components of the haemostatic system may modulate the clinical expression of arterial thrombosis in APS patients [5, 6].

The protein C (PC) pathway is crucial for the regulation of clotting. There is evidence of an acquired resistance to activated PC (aPC) induced by aPL, which has also been proposed as a pathogenic mechanism of thrombotic events in APS [7, 8]. The endothelial PC receptor (EPCR) plays an important role in this pathway because the binding of PC to EPCR increases the activation of PC by the thrombin-thrombomodulin complex twenty-fold [9, 10]. EPCR is a transmembrane protein found in arterial and venous endothelium, but a soluble form (sEPCR) is found in plasma. The physiological significance of

**Abbreviations:** EPCR, endothelial cell protein C receptor; *PROCR*, EPCR gene; sEPCR, soluble EPCR

\* Corresponding author at: Department of Haemotherapy and Haemostasis, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail address: [dtassies@clinic.cat](mailto:dtassies@clinic.cat) (D. Tàssies).

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.006>

Received 25 April 2018; Received in revised form 15 June 2018; Accepted 3 July 2018

Available online 04 July 2018

0049-3848/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.



sEPCR in vivo is not well understood, but it has been hypothesized to increase the risk of thrombosis [10–14]. There is some evidence that it exerts a procoagulant action by inhibiting PC activation and the anticoagulant activity of aPC [15], although some in vitro studies have shown that sEPCR can bind to activated factor VII reducing its procoagulant activity [16]. On the other hand, sEPCR is also considered to play an important role in the inflammatory process and elevated sEPCR levels have been found in patients with autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) [10, 17, 18]. Therefore, sEPCR could play a role in thrombotic manifestations of APS. Plasma levels of sEPCR seem to be regulated by genetic polymorphisms in the EPCR gene (*PROCR*) [11, 13, 14, 19–25]. Several *PROCR* haplotypes have been described (H1, H2, H3 and H4) [11, 20, 21]. Among them, the H1 and H3 haplotypes have been related to sEPCR levels and thrombosis. The H3 haplotype has been associated with increased plasma sEPCR levels [11, 13, 14, 20–28] and has been suggested to be a risk factor for venous thrombosis in several studies [11–14, 23, 24, 29, 30], although other studies could not confirm this data [20, 21, 31]. Likewise, the H1 haplotype has been associated with increased levels of aPC [21, 23, 26], and reduced sEPCR levels [23, 27] and, therefore, a protective effect against venous thrombosis [21, 23, 24, 32] or myocardial infarction [26] has been reported.

Given this information, the aim of this study was to evaluate the relationship between *PROCR* haplotypes, sEPCR levels and thrombotic manifestations in APS patients.

## 2. Methods

### 2.1. Patients

Patients with APS and patients with SLE, according to the accepted classification criteria [33, 34], were consecutively recruited by the outpatient clinic of the Department of Autoimmune Diseases of Hospital Clinic of Barcelona, a tertiary hospital. Four groups of patients were established: primary APS patients (PAPS); APS patients with associated SLE (APS-SLE); SLE patients without aPL (SLE non-aPL), and SLE patients with persistent aPL but without clinical criteria of APS (SLE-aPL). A control group of healthy volunteers with age and sex similar to the patients and with no history of autoimmune disease, thrombosis or obstetric morbidity was also recruited. All patients and controls gave informed consent to participate in the study. The study was approved by the local ethics committee, and was conducted in compliance with the protocol for Good Clinical Practices and the Declaration of Helsinki principles.

### 2.2. Variables

Demographic data at APS or SLE diagnosis and at study inclusion were collected from medical record of each patient. Cardiovascular risk factors as previously defined [35] and clinical manifestations of SLE were recorded. With respect to APS, thrombotic manifestations and obstetric morbidity included in the revised APS classification criteria were collected [33]. The type of thrombosis (arterial, venous, and thrombotic microangiopathy) and location was recorded. Disease duration was defined as the time (in months) from the diagnosis of APS or SLE to study inclusion.

Immunosuppressive agents, immunomodulatory therapy, anti-platelet and anticoagulant treatment were recorded. In SLE patients, the activity and chronicity indices were evaluated using the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) [36] and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index [37].

### 2.3. Laboratory features

#### 2.3.1. Sampling

Venous blood samples were drawn from a clean antecubital venepuncture without venocclusion in the morning with the patient sitting and resting. Samples for coagulation studies were obtained in tubes containing 3.8% trisodium citrate (1:9, vol:vol) (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA) and platelet-free plasma was immediately obtained by double centrifugation: first at 2000g for 10 min at 22 °C, and then at 5000g for 10 min at 4 °C. Plasma was aliquoted, snapfrozen in a mixture of dry ice:ethanol (1:2, vol:vol) and stored. For genetic studies, samples were drawn in trisodium EDTA tubes (Becton Dickinson).

#### 2.3.2. Antiphospholipid antibodies

Lupus anticoagulant was detected according to the last update of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid-dependent Antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis guidelines [38]. The anticardiolipin (aCL) and anti- $\beta$ 2 glycoprotein I (a $\beta$ 2GPI) antibodies were measured using standardised ELISA (Cheshire-Diagnostics, Cheshire, UK) and results were expressed in GPL and MPL units. Titers higher than 40 GPL or MPL were considered positive for aCL and higher than the 99th percentile of the reference range for a $\beta$ 2GPI, respectively.

#### 2.3.3. Soluble EPCR assay

Plasma sEPCR levels were determined by a commercial ELISA (Asserachrom sEPCR, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France), according to the manufacturer recommendations. The assay was carried out manually by an experienced laboratory technician. The detection limit of the assay is 10 ng/ml of sEPCR. The intra-assay CV was 6% and the inter-assay CV 7%.

#### 2.3.4. *PROCR* haplotype identification

Genomic DNA was extracted from 100  $\mu$ l of whole blood by the silica gel column method (QIAamp DNA blood mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

**2.3.4.1. H1 haplotype.** As the tag-SNP for H1 haplotype, the 7104 G/C polymorphism (numbering according to GenBank accession number AF106202), was determined by PCR, according to the technique described by Uitte de Willige et al. [20] with minor modifications. The forward primer was 5'-GCT TCA GTC AGT TGG TAA AC-3' and the reverse primer was 5'-TCT GGC TTC ACA GTG AGC TG-3'. The substitution G/C created a restriction site for the enzyme *DdeI* (Roche Diagnostics). The expected size of the restriction fragments was a 314 bp band for the G allele, and two bands of 252 bp and 62 bp for the C allele.

**2.3.4.2. H3 haplotype.** As the tag-SNP for H3 haplotype, the 1651 C/G polymorphism (numbering according to GenBank accession number AF106202), was determined by PCR, according to the technique described by Simioni et al. [39]. The following oligonucleotides were used: Forward 5'-GCT GAA ATT TTG TAT TCT GTCC-3' and reverse 5'-CCA GTA TAA TGG CTA CAT TTT ACC-3'. The 293 bp PCR product was digested using the restriction enzyme *BstE* II (Roche Diagnostics), which recognized two restriction sites in the presence of the wild type allele, resulting in three fragments of 176, 75 and 42 bp, respectively. When the polymorphic 1651G allele is present, one of the restriction sites is abolished, and only two fragments of 251 and 42 bp are detected.

Patients and controls were classified as H1 haplotype (defined by the 7104C polymorphic allele) or H3 haplotype (defined by the 1651G polymorphic allele) [11].

### 2.4. Statistical analysis

Patient data were collected on an SPSS database (SPSS version 20

for MS Windows statistical package) with one record per patient or healthy control. The Student *t*-test was used to compare levels of sEPCR between cases and controls. The analysis of variance (ANOVA) test with Bonferroni's correction was used to compare sEPCR levels between haplotypes. A linear correlation analysis was used to evaluate the sEPCR levels according to the activity (SLEDAI-2K) and damage (SLICC/ACR Damage Index) scores. The Chi-square test was used to compare the frequency of clinical haplotypes between groups. Fisher's exact test was used when the expected frequency of each box was lower than 5. A logistic regression model was built to assess the relationship of each haplotype with each final clinical outcome (arterial thrombosis and venous thrombosis). An extensive set of clinical variables plausibly associated with the clinical outcome was used to adjust regression models. This set included age, sex, obesity, smoking, diabetes mellitus, hypertension and hypercholesterolemia. Co-variables that might act as a confounder or an effect modifier were included in the logistic model. A confounder was identified when its addition changed the OR > 10% without considering the statistical significance. The existence of a modifier was ruled out by the interaction of statistical significance with the treatment. The level of statistical significance was established as  $p = 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. General characteristics

Overall, 175 patients (151 [86.3%] women with a mean age of 44.6 [95% confidence interval (95% CI) 42.4–46.8] years) and 66 healthy controls (56 [84.8%] women with a mean age of 40.3 [95% CI 37.3–43.3] years) were included in the study. According to the diagnosis and the aPL status, 62 (35.4%) patients had PAPS; 30 (17.1%) APS-SLE; 40 (22.9%) SLE non-aPL and 43 (24.6%) patients had SLE-aPL, respectively. The mean disease duration was 114.2 [95% CI 102.0–126.4] months (range 0–471 months).

#### 3.2. Demographics, clinical manifestations and laboratory features

The main clinical manifestations of patients with SLE and APS, aPL status and treatment received are shown in Table 1. Patients with PAPS were older than SLE non-aPL or SLE-aPL patients. In all groups of patients, the predominant gender was female. The disease duration was shorter in patients with PAPS than in SLE non-aPL and SLE-aPL patients.

Patients with APS-SLE had the highest prevalence of arterial hypertension followed by SLE non-aPL patients ( $p = \text{NS}$ ), SLE-aPL patients ( $p = \text{NS}$ ), and patients with PAPS ( $p < 0.01$ ). No significant differences were found between the four groups for the other vascular risk factors (family history of cardiovascular disease, smoking, obesity, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertriglyceridemia) (Table 1). The prevalence of factor V Leiden and the prothrombin G20210A polymorphism was similar to that previously described by our group in healthy general population of our geographical area [40].

Forty-seven patients with PAPS and 27 with APS-SLE had a thrombosis. Eighty-six episodes of thrombosis were documented: Forty-one episodes of arterial thrombosis (34 strokes, 3 central retinal artery thrombosis, 2 acute myocardial infarctions, 1 renal arterial thrombosis and 1 renal thrombotic microangiopathy) and 45 venous thromboses (26 deep vein thrombosis, 12 pulmonary thromboembolisms, 5 thrombosis of the central retinal vein and 2 renal vein thrombosis) were documented. Considering APS patients, 53 (59.8%) of them were under anticoagulant treatment and 47 (51.1%) under antiplatelet treatment.

#### 3.3. PROCR haplotypes and sEPCR levels

The allelic distribution of PROCR haplotypes is shown in Table 2. There were no differences in allelic frequencies of the H1 and H3

haplotypes between groups of patients and controls. No homozygous subject for the H3 haplotype was detected.

No differences in sEPCR levels were found between patients and controls (73.4 [95% CI 60.7–86.1] ng/ml vs. 82.0 [95% CI 68.1–95.9] ng/ml,  $p = 0.31$ ). Patients with SLE-aPL had the highest levels of sEPCR (109.0 [95% CI 66.0–152.0] ng/ml). One patient with SLE-aPL had a sEPCR level well above the mean (724 ng/ml). When this patient was removed from the analysis, SLE-aPL patients still had the highest levels of sEPCR (89.8 [95% CI 71.3–108.3] ng/ml), which were significantly different compared with PAPS patients (Supplemental Table S1). Sixty (34.3%) patients were on anticoagulant treatment when tested for sEPCR (PAPS, 58.1%; SLE-APS, 63.3%; SLE non-aPL, 10.0%; and SLE-aPL, 2.3%). sEPCR levels were lower in patients receiving anticoagulant treatment (54.8 [95% CI 42.7–67.0] ng/ml vs. 74.4 [95% CI 64.4–84.4] ng/ml,  $p = 0.024$ ).

In SLE patients, no significant association was found between sEPCR levels and activity and damage scores (according to SLEDAI-2K [ $r = 0.005$ ;  $p = 0.965$ ] and SLICC/ACR Damage Index [ $r = -0.43$ ;  $p = 0.683$ ]).

In the whole series, sEPCR levels were higher in carriers of the H3 allele than in carriers of the H1 allele (175.5 [95% CI 60.9–290.1] ng/ml vs. 69.1 [95% CI 61.5–76.9] ng/ml,  $p < 0.01$ ). This difference was maintained despite withdrawing the anticoagulated patients from the analysis.

#### 3.4. Relationship between PROCR haplotypes, sEPCR and thrombosis in APS patients

In patients with APS, the prevalence of the PROCR H1 haplotype was lower in patients with arterial thrombosis than in those without (58.0% vs. 85.7%,  $p = 0.003$ ; odds ratio: 0.23 [95% CI 0.08–0.65]) (Table 3). In the multivariate analysis including other risk factors for thrombosis (vascular risk factors, sex, and age) the H1 haplotype remained associated with arterial thrombosis ( $p < 0.01$ ). Of the 29 patients with arterial thrombosis in the presence of H1 haplotype, 16 (55.2%) received antiplatelet treatment. When this variable was included in the multivariate analysis, it also did not modify the results. No association was found between the H1 haplotype and venous thrombosis.

A lower presence of the PROCR H3 haplotype was detected in patients with arterial thrombosis compared to those without such thrombosis, but this difference did not reach statistical significance (10.0% vs. 21.4%,  $p = 0.139$ ) (Table 3). In the multivariate analysis, these results were not modified. Three (60.0%) of the 5 patients who had suffered an arterial thrombosis in the presence of this haplotype, were taking antiplatelet treatment. This variable was not introduced in the multivariate analysis, due to the small number of patients. There was no association between the H3 haplotype and venous thrombosis in patients with APS.

In APS patients, sEPCR levels did not discriminate between patients with or without arterial or venous thrombosis (Supplemental Fig. S1). This result was maintained despite the withdrawal of anticoagulated patients from the analysis.

### 4. Discussion

The main finding of this study is that the H1 haplotype of PROCR is associated with a lower risk of arterial thrombosis in patients with APS. To our knowledge, this is the first study that has analysed the relationship between PROCR haplotypes and thrombosis in APS.

Previously, only two studies have evaluated the role of PROCR haplotypes in autoimmune diseases. In one of them Sesin et al. [18] analysed the H3 haplotype in 27 SLE patients and 29 controls and found a higher prevalence of H3 haplotype in SLE patients, but with no relationship with vascular damage. In the other, Navarro et al. [41] studied H1 and H3 PROCR haplotypes in 87 patients with Behçet's disease,

**Table 1**  
Demographic characteristics, cardiovascular risk factors, clinical manifestations, mean activity and chronicity index values, laboratory features and treatment received according to the four groups of patients.

	PAPS (n = 62)	APS-SLE (n = 30)	SLE non-aPL (n = 40)	SLE-aPL (n = 43)	p
Age (years)	49.2 [45.4–53.0]	44.3 [40.6–47.9]	41.4 [36.6–45.3]	41.7 [38.1–45.2]	0.019 <sup>†</sup>
Gender (F)	46 (74.2)	24 (80.0)	39 (97.5)	42 (97.7)	0.001
Disease duration (months)	75.1 [59.6–90.6]	117.5 [85.9–149.2]	150.4 [126.5–174.4]	134.5 [106.5–162.5]	
Current smoking	22 (35.5)	7 (23.3)	11 (27.5)	8 (18.6)	NS
Family history of CVD	8/51 (15.7)	3/24 (12.5)	4/37 (10.8)	1/34 (2.9)	NS
Hypertension	11 (17.7)	13 (43.3)	14 (35.0)	13 (30.2)	0.057 <sup>‡</sup>
Hypercholesterol	28 (45.2)	13 (43.3)	14 (35.0)	10 (23.3)	NS
Hypertriglycerid	20 (32.3)	12 (40.0)	10 (25.0)	9 (20.9)	NS
Diabetes mellitus	4 (6.5)	1 (3.3)	1 (2.5)	0 (0.0)	NS
Obesity	5 (8.0)	6 (20.0)	6 (15.0)	7 (16.3)	NS
Clinical manifestations					
Joint involvement	7 (11.3)	25 (83.3)	37 (92.5)	40 (93.0)	
Skin involvement	1 (1.6)	19 (63.3)	34 (85.0)	37 (86.0)	
Thrombocytopenia	12 (19.4)	16 (53.3)	8 (20.0)	9 (20.9)	
Renal involvement	3 (4.8)	14 (46.7)	26 (65.0)	15 (34.9)	
Serositis	1 (1.6)	8 (26.7)	15 (37.5)	10 (23.3)	
CNS involvement	18 (29.0)	9 (30.0)	4 (10.0)	2 (4.7)	
Haemolytic anaemia	3 (4.8)	6 (20.0)	9 (22.5)	14 (32.6)	
Arterial thrombosis	28 (45.2)	13 (43.3)	6 (15.0)	–	
Venous thrombosis	27 (43.5)	18 (60.0)	0 (0.0)	–	
Obstetric morbidity <sup>‡</sup>	22 (47.8)	10 (41.7)	5 (12.5)	–	
SLEDAI-2K	–	7.5 [4.7–10.3]	5.4 [3.2–7.6]	6.3 [4.6–8.0]	
SLICC/ACR-DI	–	1.6 [1.0–2.3]	1.4 [0.8–1.9]	1.0 [0.6–1.3]	
Laboratory features					
aPL	62 (100)	30 (100.0)	–	35 (81.4)	
LAC	36 (58.1)	24 (80.0)	–	20 (46.5)	
aCL	50 (80.6)	21 (70.0)	–	26 (60.5)	
IgG aCL	25 (40.3)	14 (46.7)	–	31 (72.1)	
IgM aCL	13 (21.0)	3 (10.0)	–	10 (23.3)	
aβ2GPI	19 (42.2) <sup>b</sup>	7 (35.0)	–	9 (32.1)	
IgG aβ2GPI	12 (26.7) <sup>b</sup>	5 (25.0)	–	9 (32.1)	
IgM aβ2GPI	12 (26.7) <sup>b</sup>	5 (25.0)	–	4 (14.3)	
aPL-TP	14 (31.1) <sup>b</sup>	5 (25.0)	–	5 (17.9)	
Treatment					
Antimalarial drugs	4 (6.5)	26 (86.7)	36 (90.0)	43 (100)	
Glucocorticoids	11 (17.7)	23 (76.7)	36 (90.0)	35 (81.4)	
ISS agents <sup>c</sup>	2 (3.2)	13 (43.3)	23 (57.5)	17 (39.5)	
IVIg	3 (4.8)	2 (6.7)	1 (2.5)	2 (4.7)	
Antiplatelet agents	35 (56.5)	12 (40.0)	11 (27.5)	19 (44.2)	
Anticoagulation	36 (58.1)	19 (63.3)	4 (10.0)	1 (2.3) <sup>d</sup>	

Values of categorical variables are expressed as number and percentage and those of continuous variables as means (95% confidence interval). Statistics: ANOVA and Chi-square.

Abbreviations: aβ2GPI: anti-β2 glycoprotein I; aCL: anticardiolipin antibodies; aPL: antiphospholipid antibodies; aPL-TP: triple aPL positivity; APS: antiphospholipid syndrome; APS-SLE: APS with associated SLE; CVD: cardiovascular disease; F: female; Hypercholesterol: hypercholesterolemia; Hypertriglycerid: hypertriglyceridemia; ISS: immunosuppressant; IVIg: intravenous immunoglobulins; LAC: lupus anticoagulant; PAPS: primary APS; SLE: systemic lupus erythematosus; SLE-aPL: SLE with aPL but without clinical criteria of APS; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000; SLE non-aPL: SLE without aPL; SLICC/ACR-DI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index.

<sup>†</sup> PAPS versus SLE non-aPL (p = 0.013); PAPS versus SLE-aPL: (p = 0.019).

<sup>‡</sup> PAPS versus APS-SLE (p = 0.007); PAPS versus SLE non-aPL (p = 0.019).

<sup>a</sup> Taking only women into account.

<sup>b</sup> Data on the presence of the aβ2GPI was available in 93 patients (45 PAPS patients; 20 APS-SLE patients; and 28 SLE-aPL patients).

<sup>c</sup> Cyclophosphamide, azathioprine, methotrexate, mycophenolate or others.

<sup>d</sup> One patient in SLE-aPL group was receiving anticoagulation therapy due to a mechanical valve (he did not suffer thrombotic events).

19 of whom had venous thrombosis, and found a protective effect of H1 against venous thrombosis related to higher levels of aPL in H1 carriers.

Outside the setting of autoimmune diseases, there are limited and inconclusive data on the role of *PROCR* polymorphisms on arterial thrombosis. In a case-control study an association was found between H1 and H3 haplotypes and reduced risk of myocardial infarction in patients younger than 51 years [26]. Recently, a large genotyping study using a targeted gene array for coronary artery disease identified the H3 haplotype as a protector factor for coronary artery disease with an OR of 0.93 [42]. These studies are in line with the results found in the

present study with a protective effect of H1 for arterial thrombosis. We also found a lower prevalence of H3 in arterial thrombosis patients, although non-statistically significant.

In contrast, other studies have found either an association of the H3 haplotype and higher risk of coronary heart disease particularly in diabetic patients [43], or no relationship between H3 haplotype and myocardial infarction in patients from the AtheroGene cohort [44]. Finally, in a meta-analysis including 13 genome-wide association studies and twelve candidate genes, no evidence for association of haplotype H3 with myocardial infarction was observed [29].

**Table 2**  
Allelic distribution of *PROCR* haplotypes in patients and controls.

	Patients (n = 173) <sup>a</sup>	PAPS (n = 62)	APS-SLE (n = 30)	SLE non-aPL (n = 38) <sup>a</sup>	SLE-aPL (n = 43)	Controls (n = 60) <sup>a</sup>
H1	0.463	0.410	0.552	0.437	0.500	0.540
H3	0.075	0.065	0.086	0.087	0.071	0.060

Abbreviations: aPL: antiphospholipid antibodies; APS: antiphospholipid syndrome; APS-SLE: APS with associated SLE; H1: *PROCR* H1 haplotype; H3: *PROCR* H3 haplotype; EPCR: endothelial cell protein C receptor; PAPS: primary APS; *PROCR*: EPCR gene; SLE: systemic lupus erythematosus; SLE-aPL: SLE with aPL but without clinical criteria of APS; SLE non-aPL: SLE without aPL.

<sup>a</sup> Data from genetic analysis were not available in 2 patients with SLE non-aPL and 6 controls. Statistics: Chi-square.

**Table 3**  
Relationship between thrombosis and *PROCR* haplotypes in patients with APS.

		<i>PROCR</i> H1 haplotype		
		Total APS H1 haplotype n (%)	Non-H1 haplotype n (%)	p
Arterial thrombosis	Yes	29 (58.0)	21 (42.0)	0.003 <sup>a</sup>
	No	36 (85.7)	6 (14.3)	
Venous thrombosis	Yes	30 (71.4)	12 (28.6)	0.832
	No	35 (70.0)	15 (30.0)	
		PAPS		
		H1 haplotype n (%)	Non-H1 haplotype n (%)	p
Arterial thrombosis	Yes	21 (55.3)	17 (44.7)	0.055
	No	19 (79.2)	5 (20.8)	
Venous thrombosis	Yes	17 (60.7)	11 (39.3)	0.570
	No	23 (67.6)	11 (32.4)	
		APS-SLE		
		H1 haplotype n (%)	Non-H1 haplotype n (%)	p
Arterial thrombosis	Yes	8 (66.7)	4 (33.3)	0.128
	No	17 (94.4)	1 (5.6)	
Venous thrombosis	Yes	13 (92.9)	1 (7.1)	0.330
	No	12 (75.0)	4 (25.0)	
		<i>PROCR</i> H3 haplotype		
		Total APS H3 haplotype n (%)	Non-H3 haplotype n (%)	p
Arterial thrombosis	Yes	5 (10.0)	45 (90.0)	0.139
	No	9 (21.4)	33 (78.6)	
Venous thrombosis	Yes	8 (19.0)	34 (81.0)	0.370
	No	6 (12.0)	43 (88.0)	
		PAPS		
		H3 haplotype n (%)	Non-H3 haplotype n (%)	p
Arterial thrombosis	Yes	5 (13.2)	33 (86.8)	0.725
	No	4 (16.7)	20 (83.3)	
Venous thrombosis	Yes	4 (14.3)	24 (85.7)	1.000
	No	5 (14.7)	29 (85.3)	
		APS-SLE		
		H3 haplotype n (%)	Non-H3 haplotype n (%)	p
Arterial thrombosis	Yes	0 (0.0)	12 (100.0)	0.126
	No	5 (27.8)	13 (72.2)	
Venous thrombosis	Yes	4 (28.6)	10 (71.4)	0.169
	No	1 (6.3)	15 (93.8)	

Abbreviations: APS: antiphospholipid syndrome; APS-SLE: APS with associated SLE; EPCR: endothelial cell protein C receptor; H1: H1 haplotype carrier; H3: H3 haplotype carrier; Non-H1: non-H1 haplotype carrier; Non-H3: non-H3 haplotype carrier; OR: odds ratio; PAPS: primary APS; *PROCR*: EPCR gene; SLE: systemic lupus erythematosus. Statistics: Chi-square.

<sup>a</sup> OR: 0.23 [95% CI 0.08–0.65].

Regarding to venous thrombosis, we found no association with *PROCR* haplotypes in APS patients. Outside the setting of autoimmune diseases, several studies have been carried out on the relationship between *PROCR* haplotypes and venous thrombosis, with inconclusive results. In concordance with the findings of the present study, a lack of association of *PROCR* haplotypes and venous thrombosis has been reported in several studies [21, 31]. In a series of 474 patients from the Leiden Thrombophilia Study cohort no association was found between *PROCR* haplotypes and venous thrombosis [20] and in a recent meta-analysis [45], the H1 haplotype had no relation to venous thrombosis when only studies that included an age and sex-matched control group, were analysed.

Conversely, other studies have found a relationship of *PROCR* haplotypes and higher risk of venous thrombosis [12, 13, 23]. Saposnik et al. [11] in a case-control study including 338 patients found a 1.8-fold greater risk of venous thrombosis with the H3 haplotype. In a meta-analysis including 11 studies on venous thrombosis an association between H3 and a higher risk of venous thrombosis was found, with an increase of the odds of VTE by a factor of 1.22 for every additional copy of the H3 allele [29]. More recently, Li et al. [30] in their meta-analysis of 13 individual studies, four on Chinese population, found a relationship of H3 haplotype with venous thrombosis under allelic (OR: 1.42), recessive (OR: 2.02), homozygous (OR: 2.24), and additive genetic models (OR: 1.63). Lastly, two studies of the same group have reported a protective effect of H1 for venous thrombosis in general population [21] and, as previously mentioned, in Behçet's disease [41].

The reason for the discrepancies between the different studies may rely in several factors. One of them might be the different study populations or the different study designs. Other causes may be due to the interaction of genetic polymorphisms. In this sense, Navarro et al. [12] found that in carriers of the prothrombin G20210A polymorphism, a common genetic thrombophilia, the H3 haplotype increased the risk of thrombosis. On the whole, published studies suggest that the H3 haplotype might have a modest prothrombotic effect and that the interaction between genetic polymorphisms might play a role in the associated thrombotic manifestations. It may be hypothesized that, in our series of APS patients, the presence of a very strong prothrombotic factor such as aPL may prevail over the prothrombotic effect of the H3 polymorphism and, therefore, may explain why no association between H3 and thrombosis was detected in our study.

In the literature, the protective effect of the H1 haplotype in thrombosis has been attributed to reduced levels of sEPCR, increased levels of membrane-bound EPCR and higher levels of aPC in plasma [21, 23]. In our study, the lower levels of sEPCR associated with the H1 haplotype are consistent with the findings described by other authors.

To date, no studies evaluating sEPCR levels have been performed in patients with APS. In other autoimmune diseases, such as Behçet's disease, higher levels of sEPCR have been detected but with no relationship with clinical manifestations [46] or thrombosis [41]. In SLE patients, sEPCR levels have been found to be higher than in controls and be related to renal disease [18].

We found no significant relationship between sEPCR levels and the presence of arterial or venous thrombosis in APS patients. Currently, the association between sEPCR levels and thrombotic phenomena remains a controversial issue and no clear consensus has yet been reached [10]. Our results in APS patients are in line with studies carried out in patients with non-autoimmune diseases [23, 31] that found lack of association of sEPCR levels and thrombosis. The lack of clear association between sEPCR levels and thrombosis may be explained in part by the time at which sEPCR levels were determined with respect to the acute thrombotic event [31]. Although we consider that this may be the main reason in our study, we cannot rule out that with a larger sample size we would have obtained a different result. Moreover, although the effect of *PROCR* polymorphisms in thrombosis through the increase of sEPCR levels mechanism is certainly a plausible explanation, it cannot be ruled out that other yet unknown mechanisms could be implicated.

#### 4.1. Strengths and limitations

The main strengths of the present study are the fact that it is the first to evaluate the relationship between, *PROCR* haplotypes, sEPCR levels and thrombosis in APS patients, and the inclusion of a group of SLE patients without thrombosis to assess specifically the effect of auto-immune background. Nevertheless, some limitations are recognized such as the potential bias from the retrospective design of the study, the relatively limited number of patients included and the fact that sEPCR levels were not determined at the same moment in relation to the thrombotic episode in APS patients.

#### 4.2. Future directions

Future research is necessary to confirm our results, including prospective studies with a larger number of patients. If so, H1 genotyping might help to identify subpopulations of APS patients with differing risks for arterial thrombosis and help to tailor antithrombotic prophylaxis in randomized and controlled studies.

#### 5. Conclusions

In conclusion, this study shows a lower prevalence of the *PROCR* H1 haplotype in APS patients with arterial thrombosis, suggesting a protective effect of *PROCR* H1 against arterial thrombosis in these patients. sEPCR levels were not associated with the risk of thrombosis. Further studies are warranted to confirm our findings and to assess the role of *PROCR* H1 haplotype in thrombotic manifestations in APS patients.

#### Declarations of interest

None.

#### Financial support

This study was supported in part by grants FIS 11/00977 and 05/0204 from the "Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)". MAPR received the Hospital Clinic Final Residence Award "Emili Letang" 2010.

#### Conflicts of interest

The authors declare that they don't have competing interests.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.006>.

#### References

- [1] M. Khamashta, M. Taraborelli, S. Sciascia, A. Tincani, Antiphospholipid syndrome, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 30 (2016) 133–148, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2016.04.002>.
- [2] J. Castro-Marrero, E. Balada, M. Vilardell-Tarrés, J. Ordi-Ros, Genetic risk factors of thrombosis in the antiphospholipid syndrome, *Br. J. Haematol.* 147 (2009) 289–296, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07831.x>.
- [3] G.D. Sebastiani, A. Juliano, L. Cantarini, M. Galeazzi, Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: an update, *Autoimmun. Rev.* 15 (2016) 433–439, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.005>.
- [4] J. Reverter, D. Tássies, Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: association with clinical manifestations, *Antiphospholipid Syndr. Syst. Autoimmune Dis.* 1st ed., Elsevier, 2009, pp. 91–103.
- [5] D. Tássies, G. Espinosa, F.J. Muñoz-Rodríguez, C. Freire, R. Cervera, J. Monteagudo, et al., The 4G/5G polymorphism of the type 1 plasminogen activator inhibitor gene and thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 2349–2358, [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200010\)43:10<2349::AID-ANR24>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200010)43:10<2349::AID-ANR24>3.0.CO;2-J).
- [6] S. Jiménez, D. Tássies, G. Espinosa, Á. García-Criado, J. Plaza, J. Monteagudo, et al., Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 67 (2008) 835–840, <https://doi.org/10.1136/ard.2007.077321>.
- [7] S. Liestøl, P.M. Sandset, M.C. Mowinckel, F. Wisloff, Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 2204–2210, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02734.x>.
- [8] F.-J. Muñoz-Rodríguez, J.-C. Reverter, J. Font, D. Tássies, G. Espinosa, R. Cervera, et al., Clinical significance of acquired activated protein C resistance in patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus* 11 (2002) 730–735, <https://doi.org/10.1191/0961203302lu256oa>.
- [9] D.J. Stearns-Kurosawa, S. Kurosawa, J.S. Mollica, G.L. Ferrell, C.T. Esmon, The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 10212–10216.
- [10] S. Gandrille, Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis, *Haematologica* 93 (2008) 812–816, <https://doi.org/10.3324/haematol.13243>.
- [11] B. Saposnik, J.L. Reny, P. Gaussem, J. Emmerich, M. Aiach, S. Gandrille, A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis, *Blood* 103 (2004) 1311–1318, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2520>.
- [12] S. Navarro, P. Medina, Y. Mira, A. Estellés, P. Villa, F. Ferrando, et al., Haplotypes of the EPCR gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation, *Haematologica* 93 (2008) 885–891, <https://doi.org/10.3324/haematol.12448>.
- [13] X. Chen, L. Tian, M. Li, W. Jin, H. Zhang, C. Zheng, Relationship between endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G polymorphisms and deep venous thrombosis, *Chin. Med. J.* 124 (2011) 72–75, <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2011.01.014>.
- [14] G. Yin, X. Jin, H. Ming, X. Zheng, D. Zhang, Endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G polymorphism is associated with venous thromboembolism, *Exp. Ther. Med.* 3 (2012) 989–992, <https://doi.org/10.3892/etm.2012.510>.
- [15] P. Liaw, P. Neunschwander, M. Smirnov, C. Esmon, Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 5447–5452, <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5447>.
- [16] J. Lopez-Sagasetta, R. Montes, C. Puy, N. Díez, K. Fukudome, J. Hermida, Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 1817–1824 (doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02648.x).
- [17] S. Kurosawa, D.J. Stearns-Kurosawa, C.W. Carson, A. D'Angelo, P. Della Valle, C.T. Esmon, Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes, *Blood* 91 (1998) 725–727.
- [18] C.A. Sesin, X. Yin, C.T. Esmon, J.P. Buyon, R.M. Clancy, Shedding of endothelial protein C receptor contributes to vasculopathy and renal injury in lupus: in vivo and in vitro evidence, *Kidney Int.* 68 (2005) 110–120, <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00385.x>.
- [19] R. Simmonds, D. Lane, Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains, *Blood* 94 (1999) 632–641.
- [20] S. Uitte de Willige, V. Van Marion, F.R. Rosendaal, H.L. Vos, M.C.H. De Visser, R.M. Bertina, Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 1305–1310, <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2004.00855.x>.
- [21] P. Medina, S. Navarro, A. Estellés, A. Vayá, B. Woodhams, Y. Mira, et al., Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk, *Thromb. Haemost.* 91 (2004) 905–911, <https://doi.org/10.1160/TH03-10-0657>.
- [22] D. Qu, Y. Wang, Y. Song, N.L. Esmon, C.T. Esmon, The Ser219-> Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 229–235, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01676.x>.
- [23] P. Medina, S. Navarro, E. Bonet, L. Martos, A. Estellés, R.M. Bertina, et al., Functional analysis of two haplotypes of the human endothelial protein C receptor gene, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (2014) 684–690, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302518>.
- [24] N. Zoheir, N. Eldanasouri, A.A. Abdel-Aal, K.A. Hosny, W.M. Abdel-Ghany, Endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G and 4678G/C polymorphisms as risk factors for deep venous thrombosis, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 27 (2016) 259–265, <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000402>.
- [25] A. Ulu, D. Gunal, S. Tiras, Y. Egin, G. Deda, N. Akar, EPCR gene A3 haplotype and elevated soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels in Turkish pediatric stroke patients, *Thromb. Res.* 120 (2007) 47–52, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.08.004>.
- [26] P. Medina, S. Navarro, J. Corral, E. Zorio, V. Roldán, A. Estellés, et al., Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction, *Haematologica* 93 (2008) 1358–1363, <https://doi.org/10.3324/haematol.13066>.
- [27] G. Anastasiou, M. Politou, L. Rallidis, E. Grouzi, P. Karakitsos, E. Merkouri, et al., Endothelial protein C receptor gene variants and risk of thrombosis, *Clin. Appl. Thromb.* 22 (2016) 199–204, <https://doi.org/10.1177/1076029614547261>.
- [28] B. Saposnik, E. Lesteven, A. Lokajczyk, C.T. Esmon, M. Aiach, S. Gandrille, Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene *PROCR* and generates a novel soluble form of EPCR in plasma, *Blood* 111 (2008) 3442–3451, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-104968>.

- [29] J. Dennis, C.Y. Johnson, A.S. Adediran, M. De Andrade, J.A. Heit, P.E. Morange, et al., The endothelial protein C receptor (PROC) Ser219Gly variant and risk of common thrombotic disorders: a HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies, *Blood* 119 (2012) 2392–2400, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-383448>.
- [30] Y.Y. Li, J.J. Wu, X.X. Yang, H.Y. Geng, G. Gong, H.J. Kim, EPCR gene Ser219Gly polymorphism and venous thromboembolism: a meta-analysis of 9,494 subjects, *Front. Physiol.* 8 (2017) 1–10, <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00339>.
- [31] K. Yamagishi, M. Cushman, S.R. Heckbert, M.Y. Tsai, A.R. Folsom, Lack of association of soluble endothelial protein C receptor and PROC 6936A/G polymorphism with the risk of venous thromboembolism in a prospective study, *Br. J. Haematol.* 145 (2009) 221–226, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07612.x>.
- [32] P. Medina, S. Navarro, A. Estellés, A. Vayá, R.M. Bertina, F. España, Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden, *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 389–394, <https://doi.org/10.1160/TH05-02-0089>.
- [33] S. Miyakis, M.D. Lockshin, T. Atsumi, D.W. Branch, R.L. Brey, R. Cervera, et al., International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS), *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 295–306, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>.
- [34] M. Petri, A.M. Orbai, G.S. Alarcón, C. Gordon, J.T. Merrill, P.R. Fortin, et al., Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, *Rheumatology (Oxford)* 44 (2005) 2677–2686, <https://doi.org/10.1002/art.34473>.
- [35] S. Jiménez, M. García-Criado, D. Tàssies, J. Reverter, R. Cervera, M. Gilabert, et al., Preclinical vascular disease in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, *Rheumatology (Oxford)* 44 (2005) 756–761, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh581>.
- [36] D.D. Gladman, D. Ibañez, M.B. Urowitz, Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 288–291, <https://doi.org/10.3899/jrheum.110550>.
- [37] D. Gladman, E. Ginzler, C. Goldsmith, P. Fortin, M. Liang, M. Urowitz, et al., The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 39 (1996) 363–369, <https://doi.org/10.1002/art.1780390303>.
- [38] V. Pengo, A. Tripodi, G. Reber, J.H. Rand, T.L. Ortel, M. Galli, et al., Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1737–1740, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x>.
- [39] P. Simioni, O. Morboeuf, G. Tognin, S. Gavasso, D. Tormene, B. Woodhams, A. Pagnan, Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels and venous thromboembolism in carriers of two dysfunctional protein C variants, *Thromb. Res.* 117 (2006) 523–528, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.04.029>.
- [40] H. Berman, M.F. Ugarte-Gil, G. Espinosa, D. Tàssies, J. Monteagudo, J.C. Reverter, et al., Can inherited thrombophilia modulate the clinical phenotype of patients with antiphospholipid syndrome? *Clin. Exp. Rheumatol.* 31 (2013) 926–932 <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84892468824&partnerID=40&md5=c227711b9c39acd8cd9b4e22ec69b97>.
- [41] S. Navarro, E. Bonet, P. Medina, L. Martos, J.M. Ricart, A. Vayá, et al., Haplotypes of the endothelial protein C receptor gene and Behçet's disease, *Thromb. Res.* 129 (2012) 459–464, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.07.032>.
- [42] J.M.M. Howson, W. Zhao, D.R. Barnes, W.K. Ho, R. Young, D.S. Paul, et al., Fifteen new risk loci for coronary artery disease highlight arterial-wall-specific mechanisms, *Nat. Genet.* 49 (2017) 1113–1119, <https://doi.org/10.1038/ng.3874>.
- [43] H. Ireland, C.J. Konstantoulas, J.A. Cooper, E. Have, S.E. Humphries, H. Mather, et al., EPCR Ser219Gly: elevated sEPCR, prothrombin F1 + 2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding in vitro, *Atherosclerosis* 183 (2005) 283–292, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.02.028>.
- [44] C. Kallel, W. Cohen, N. Saut, S. Blankenberg, R. Schnabel, H.J. Rupprecht, et al., Association of soluble endothelial protein C receptor plasma levels and PROC rs867186 with cardiovascular risk factors and cardiovascular events in coronary artery disease patients: the Athero Gene study, *BMC Med. Genet.* 13 (2012) 103, <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-103>.
- [45] J. Jiang, K. Liu, J. Zou, H. Ma, H. Yang, X. Zhang, et al., Associations between polymorphisms in coagulation-related genes and venous thromboembolism: a meta-analysis with trial sequential analysis, *Medicine (Baltimore)* 96 (2017) e6537, <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006537>.
- [46] F.N. Yağcıdağ, F. Batioğlu, O. Özdemir, E. Cansızoğlu, Y. Eğin, N. Akar, Soluble endothelial protein C receptor levels in Behçet patients with and without ocular involvement, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 246 (2008) 1603–1608, <https://doi.org/10.1007/s00417-008-0873-9>.



## **Resumen de la metodología y de los resultados del primer estudio.**

El objetivo del primer estudio fue evaluar la relación entre los haplotipos del *PROCR*, los niveles de sEPCR y la patología trombótica (tanto trombosis arteriales como venosas) en los pacientes con SAF.

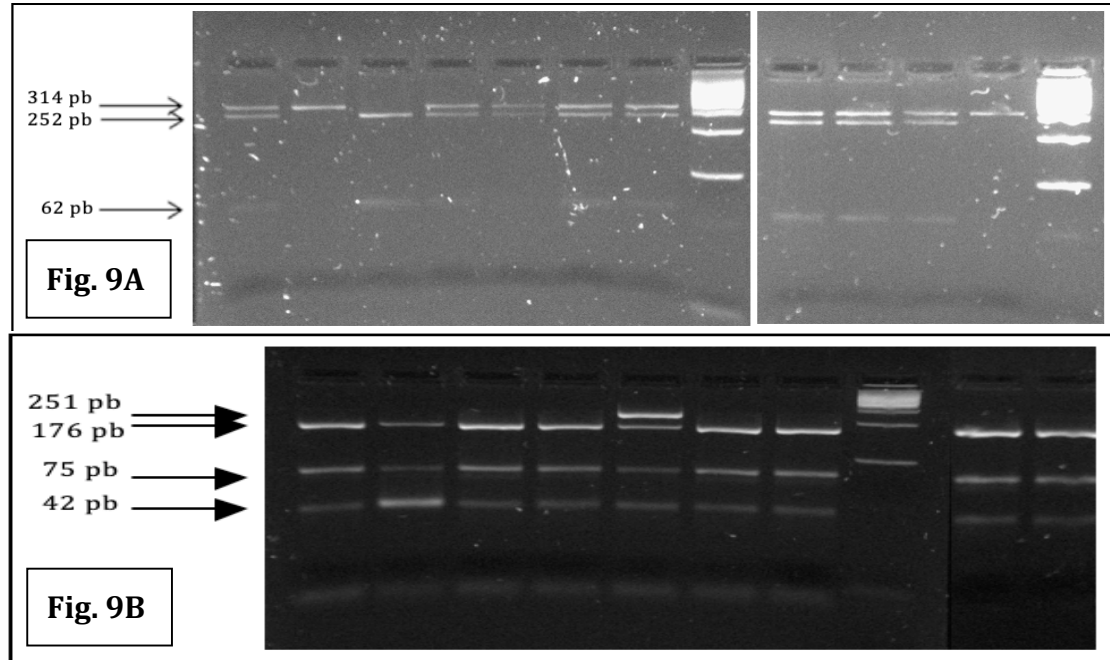
Se seleccionaron 175 pacientes, divididos en 4 grupos: 62 (35,4%) pacientes con SAF primario; 30 (17,1%) con SAF asociado a LES; 40 (22,9%) con LES sin AAF y 43 (24,6%) con LES y AAF pero sin criterios clasificatorios de SAF. Se incluyeron un total de 66 controles sanos. Se identificaron los haplotipos del *PROCR* por sus correspondientes polimorfismos: el haplotipo *PROCR* H1 fue reconocido por el polimorfismo 7014G/C y el H3 por el polimorfismo 1651C/G (*Figura 9*). Los niveles de sEPCR se determinaron por una técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Los fenómenos trombóticos se diagnosticaron mediante métodos objetivos.

Se documentaron 86 episodios de trombosis, de los cuales 41 fueron arteriales y 45 venosos. La frecuencia alélica de los haplotipos H1 y H3 fue similar entre los grupos de pacientes y controles. No se encontraron diferencias en los niveles de sEPCR entre pacientes y controles. En la serie completa, los portadores del alelo H3 presentaron unos niveles de sEPCR mayores que los portadores del alelo H1 [175,5 (IC 95% 60,9–290,1) ng/ml vs. 69,1 (IC 95% 61,5–76,9) ng/ml,  $p < 0,01$ ].

En los pacientes con SAF que presentaron una trombosis arterial, el haplotipo *PROCR* H1 tuvo una prevalencia inferior que en aquellos que no sufrieron trombosis arterial [58,0% vs. 85,7%,  $p=0,003$ ; odds ratio: 0,23 (IC 95% 0,08–0,65)]. En el análisis multivariante, que incluyó otros factores de riesgo para trombosis y el tratamiento con antiagregantes plaquetarios, se mantuvo esta asociación inversa entre el haplotipo H1 y la trombosis arterial ( $p < 0,01$ ).



**Figura 9.** Electroforesis que permiten identificar los polimorfismos representativos de los Haplotipos H1 (Fig. 9A) y H3 (Fig. 9B) del gen *PROCR*, pertenecientes a sujetos del presente estudio.



**Fig. 9A.** Electroforesis representativa del Haplotipo *PROCR* H1, identificando el polimorfismo 7014G/C según la técnica descrita por *Uitte de Willge et al.* (95). El alelo C (alelo mutado) da lugar a dos bandas de 252 y 62 pares de bases (pb) en los sujetos homocigotos, respectivamente; mientras que el alelo G (alelo salvaje) muestra sólo una banda de 314 pb. Los sujetos heterocigotos muestran las tres bandas diferentes (314, 252 y 62 pb, respectivamente). **Fig. 9B.** Electroforesis representativa del Haplotipo *PROCR* H3, identificando el polimorfismo 1651C/G según la técnica descrita por *Simioni et al.* (152). El alelo G (alelo mutado) da lugar a dos bandas de 251 y 42 pb en el caso de sujetos homocigotos, respectivamente; mientras que el alelo C (alelo salvaje) muestra tres bandas de 176, 75 y 42 pb, respectivamente. Los sujetos heterocigotos muestran las cuatro bandas diferentes (251, 176, 75 y 42 pb, respectivamente).

La prevalencia del haplotipo H3 fue inferior en los pacientes con SAF y trombosis arterial, sin alcanzar significación estadística (10,0% vs. 21,4%,  $p=0,139$ ). En el análisis multivariante no se halló relación del haplotipo H3 con la trombosis arterial.

No hubo asociación entre los haplotipos H1 o H3 con la trombosis venosa.

Los niveles de sEPCR fueron similares en los pacientes con y sin trombosis arterial o con y sin trombosis venosa.

Los resultados del presente estudio sugieren que en los pacientes con SAF, la presencia del haplotipo *PROCR* H1 se comporta como un factor protector frente a la trombosis arterial. Por otro lado, aunque los niveles de sEPCR fueron inferiores en el haplotipo *PROCR* H1, no se relacionaron de forma directa con el riesgo trombótico.



## **5.2. Segundo estudio.**

***Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic lupus erythematosus.***

Miguel Angel Plasín-Rodríguez, Patricia Patricio, Joan Monteagudo, Angeles García-Criado, Ricard Cervera, Joan Carles Reverter, Gerard Espinosa, Dolors Tàssies.

J Thromb Thrombolysis. 2020 Oct 3.

doi:10.1007/s11239-020-02295-1. Epub ahead of print.

**Objetivo:** Estudiar la actividad procoagulante de las micropartículas circulantes y analizar su relación con la presencia de arteriosclerosis o de trombosis en el lupus eritematoso sistémico y en el síndrome antifosfolipídico.

Factor de impacto de la revista: 2.054

Segundo Cuartil (Q2) del Área de Hematología



Author's personal copy

Journal of Thrombosis and Thrombolysis  
https://doi.org/10.1007/s11239-020-02295-1



## Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic lupus erythematosus

Miguel Angel Plasín-Rodríguez<sup>1</sup> · Patricia Patricia<sup>1</sup> · Joan Monteagudo<sup>2</sup> · Angeles García-Criado<sup>3</sup> · Ricard Cervera<sup>1</sup> · Joan Carles Reverter<sup>2</sup> · Gerard Espinosa<sup>1</sup> · Dolores Tàssies<sup>2</sup>

Accepted: 26 September 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

### Abstract

Microparticles (MPs) have been associated with inflammatory and thrombotic disease. High levels of MPs have been identified in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and associated with cardiovascular disease. We analyzed the procoagulant activity of MPs and its correlation with arteriosclerosis and arterial thrombosis in SLE patients. Eighty-seven patients with SLE were included: 22 (25.3%) with associated antiphospholipid syndrome (APS), 32 (36.8%) without antiphospholipid antibodies (aPL) and 33 (37.9%) with aPL but without APS. Subclinical arteriosclerosis, defined as the presence and number of plaques, was evaluated by ultrasonography of carotid arteries. Thrombotic events were confirmed by objective methods. The procoagulant activity of MPs was determined by a functional assay with annexin V. Subclinical arteriosclerosis was found in 19 (21.8%) patients. Thirteen episodes of arterial thrombosis and eight of venous thrombosis were recorded. The procoagulant activity of MPs was greater in patients with arterial thrombosis ( $17.28 \pm 8.29$  nM vs  $12.96 \pm 7.90$  nM,  $p < 0.05$ ). In patients without arterial thrombosis, greater procoagulant activity of MPs was identified in patients with multiple ( $\geq 2$ ) carotid plaques ( $17.26 \pm 10.63$  nM vs  $12.78 \pm 7.15$  nM,  $p = 0.04$ ). In the multivariate analysis, the procoagulant activity of MPs was independently associated with multiple ( $\geq 2$ ) carotid plaques and arterial thrombosis [OR = 1.094 (95%CI 1.010–1.185),  $p = 0.027$  and OR = 1.101 (95%CI 1.025–1.182),  $p = 0.008$ ; respectively]. In conclusion, the procoagulant activity of MPs is associated with arteriosclerosis burden and arterial thrombosis in patients with SLE.

**Keywords** Systemic lupus erythematosus · Microparticles · Procoagulant activity · Subclinical arteriosclerosis · Arteriosclerosis burden · Arterial thrombosis

### Abbreviations

MPs      Microparticles  
NS      No significant  
nM PS eq    Nanomolar phosphatidylserine equivalent

### Highlights

- Systemic lupus erythematosus (SLE) patients have a higher risk of cardiovascular (CV) disease (CVD) compared with the general population, which is not fully explained by traditional CV risk factors.
- Microparticles (MPs) have been associated with inflammatory and thrombotic disease, so we analyzed the relationship between the procoagulant activity of MPs and CVD in SLE patients.
- The procoagulant activity of MPs was associated with arteriosclerosis burden and arterial thrombosis in patients with SLE.
- If the role of MPs as a biomarker of CV risk in SLE patients is confirmed, early arteriosclerosis prophylaxis could be initiated in these patients.

✉ Dolores Tàssies  
dtassies@clinic.cat

<sup>1</sup> Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Department of Hemostasis and Hemotherapy, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Department of Radiology, Centre de Diagnòstic per la Imatge, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Published online: 03 October 2020

Springer

## Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is the paradigm of the systemic autoimmune diseases. It affects half a million people in Europe and a quarter of a million in the United States [1]. CV involvement is a principal clinical characteristic of SLE. Accelerated subclinical arteriosclerosis occurs in SLE patients [2–4], and arteriosclerotic disease follows a pathophysiological continuum whose maximum expression is arterial thrombosis [5]. Carotid ultrasound is the most widely used method for evaluating arteriosclerosis due to its relative low cost and because it is a non-invasive test [4]. This is a validated technique, in which both the carotid intima-media thickness and the presence of carotid plaque measured by ultrasound are considered surrogate markers for arteriosclerosis and are capable of predicting CV events [6]. Carotid ultrasound has been previously used to assess subclinical arteriosclerosis in SLE [2, 3, 7]. In recent years, the concept of arteriosclerotic burden has become very important, since it seems to better predict CV risk than the mere presence of plaque [8] and it has been linked to target organ damage [6, 9]. The concept of arteriosclerotic burden could represent an intermediate point in the aforementioned arteriosclerotic continuum, from the mere presence of single plaque to arterial thrombosis. In this sense, SLE patients also have a higher risk of acute CVD compared with the general population. Coronary artery disease, stroke and peripheral arterial disease are leading causes of death in SLE patients, especially in advanced stages [4, 10]. However, in these patients, CVD is not fully explained by traditional CV risk factors [4, 11], genetic markers [7, 12, 13], or disease-related factors such as the disease duration, treatments received and the chronic inflammatory substrate [14, 15].

Arteriosclerosis is now considered the result of an interaction between different factors, such as traditional CV risk factors, immune-mediated mechanisms, and inflammatory triggers [16]. Likewise, the role of inflammation in thrombosis is very important and terms such as immunothrombosis or thromboinflammation are used to designate this interaction [17].

In this scenario of inflammation and vascular damage, the role of circulating MPs has been investigated [18–22]. MPs are small cell membrane vesicles measuring < 1 micron released from cells upon cellular activation and contain proteins and lipids on their surface membrane and nucleic acids inside from the cells which they originated [18]. It has been suggested that MPs represent the link between inflammation, autoimmunity and thrombosis [19, 20]. MPs are involved as modulators in several pathophysiological mechanisms such as endothelial damage [21], chronic inflammation and thrombosis [22]. They

participate in the different steps of arteriosclerosis [23], and have also been associated with arterial thrombosis [24]. This evidence has led to MPs being proposed as CV risk biomarkers and even as possible therapeutic targets [22, 23, 25, 26]. Independently of their cellular origin, most MPs have functional procoagulant activity mainly related to the surface expression of phosphatidylserine and/or tissue factor [21, 22, 24–27]. In SLE patients, an increase in MPs related to increased thrombin generation [28] and endothelial dysfunction [29] has been reported in some studies [30–33] although not in others [31, 33].

Therefore, the aim of the present study was to analyze the procoagulant activity of MPs and its correlation with arteriosclerosis and arterial thrombosis in patients with SLE.

## Patients and methods

### Patients

Patients with SLE were selected at the outpatient clinic of the Department of Autoimmune Diseases of a tertiary hospital (Hospital Clinic of Barcelona) and consecutively enrolled. All patients fulfilled the 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology (EULAR/ACR) classification criteria for SLE [34]. With the intention of covering the entire spectrum of SLE and avoid confounding factors, three profiles of SLE patients were included: Group 1 (SLE–APS) consisted of patients with SLE who were also diagnosed with antiphospholipid syndrome (APS) according to the Sidney classification criteria [35], including patients with thrombotic and obstetric symptoms. Group 2 (SLE non-aPL) was made up of patients with SLE and persistently negative antiphospholipid antibodies (aPL). Thrombotic events were detected in this group, but in the absence of aPL, they did not meet the APS classification criteria. Group 3 (SLE–aPL) included patients with SLE, and persistently positive aPL who did not experience thrombotic events and therefore could not be classified as APS.

The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic de Barcelona (linked to the University of Barcelona), it was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki and informed consent was obtained from all participants.

### Variables

Demographic data at SLE diagnosis and study inclusion were collected from the medical record. CV risk factors, considered as previously defined [2], were recorded. Disease duration was defined as the time (in months) from the diagnosis of SLE to study inclusion. Immunosuppressive agents, immunomodulatory therapy, antiplatelet and anticoagulant

Author's personal copy

Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic...

treatment were recorded. In SLE patients, the activity and chronicity indices were evaluated using the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) [36] and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index [37], respectively.

#### Arteriosclerosis assessment by carotid ultrasound

The study of arteriosclerosis was performed using a carotid ultrasound. The presence of atheroma plaques in this vascular territory was assessed. Carotid ultrasound was performed, according to the protocol of the Hospital Clinic of Barcelona, with a Siemens scanner (Antares model) using a multifrequency duplex Doppler transducer of 7.5–10 MHz for the real time imaging and 3.75 MHz for the Doppler study. All scans were performed by the same sonographer, who had extensive experience with carotid ultrasound. The scanning was performed at right and left carotid territories. Three predetermined segments of the arteries from both sides were examined: the common carotid artery (1 cm proximal to the carotid bulb), the bulb (1–2 cm), and the origin of the internal carotid artery (1 cm distal to the bifurcation). For each location, the sonographer imaged the vessel in longitudinal and transverse planes, with 45° of neck rotation to the contralateral side. The presence and number of plaques were evaluated in each study. Intima-media thickness (IMT) was defined as the distance between the carotid light-intima interface and the media-adventitia interface. Carotid plaque was considered as IMT focal or diffuse thickening with a height  $\geq 1.2$  mm.

#### Subclinical arteriosclerosis

Subclinical arteriosclerosis was defined by the presence of one or more plaques at any of the carotid territories explored in the absence of clinical manifestations of arteriosclerotic disease (i.e. cerebrovascular ischemic episodes or myocardial infarctions).

#### Multiple carotid plaques

To evaluate the arteriosclerosis burden, the number of plaques was taken into account. The existence of  $\geq 2$  carotid plaques at any of the carotid territories explored was defined as multiple carotid plaques. Multiple carotid plaques as the indicator of arteriosclerosis burden was analyzed only in the group of patients with subclinical arteriosclerosis.

#### Thrombosis diagnosis

Thrombotic events (cerebrovascular ischemic episodes, myocardial infarctions, deep venous thrombosis and pulmonary

embolism) were recorded. The clinical diagnosis was confirmed by objective methods (computed tomography scanning, magnetic resonance imaging, electrocardiographic studies and elevated levels of cardiac enzymes, Doppler ultrasonographic scan, ventilation-perfusion scanning and pulmonary angiography).

#### Laboratory methods

##### Blood sampling

Venous blood samples were drawn by clean antecubital venous puncture without venocclusion, in the morning, with the patient sitting and resting. Samples for coagulation and fibrinolysis studies were obtained in tubes containing 3.8% trisodium citrate (1:9, vol:vol) (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA) and platelet-free plasma was immediately obtained by double centrifugation: first at 2000 g for 10 min at 22 °C, and then at 5000 g for 10 min at 4 °C. Plasma was aliquoted, snap frozen in a mixture of dry ice:ethanol (1:2, vol:vol) and stored at  $-80$  °C.

##### General hemostasis studies

Prothrombin and activated partial thromboplastin time were determined in an automated analyzer (Siemens, Marburg, Germany) using standard reagents (Siemens) and were expressed as ratios (patient time/control time). Fibrinogen was measured by the Clauss technique.

##### Antiphospholipid antibodies

Lupus anticoagulant (LAC) was detected according to the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid-dependent Antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis guidelines [38]. Anticardiolipin (aCL) and anti- $\beta 2$  glycoprotein I antibodies were measured using standardized ELISAs (Aesku, Wendelsheim, Germany) and the results were expressed in GPL and MPL units. Titers  $> 40$  GPL or MPL were considered positive for aCL and higher than the 99th percentile of the reference range for anti- $\beta 2$  glycoprotein I antibodies, respectively.

##### Microparticles

The total procoagulant activity of MPs was tested in plasma using a commercial functional assay (Hyphen BioMed, Neuville, France) based on the property of annexin-V, immobilized onto plastic wells, to bind phosphatidylserine (PS) expressed in MPs, as described previously [39]. In brief, plasma samples were placed onto plate microwells coated with streptavidin and biotinylated annexin V. After incubation and washing, bovine factor Xa–Va and human



prothrombin were added. After further incubation, the thrombin-specific chromogenic substrate was added. The reaction was stopped with 2% citric acid after 10 min, and absorbance was measured at 405 nm. The results of duplicates were expressed as nanomolar PS equivalent (nM PS eq) by reference to a standard curve. The detection limit of the assay was 0.05 nM, the intra-assay coefficient of variation was 5% and the interassay coefficient of variation was 8%.

### Statistical analysis

Data were stored on SPSS (SPSS version 20 for MS Windows statistical package, Chicago, IL, USA) with a unique record per patient. The Student's t-test or the analysis of variance (ANOVA) test with Bonferroni's correction were used to compare quantitative variables. The Chi-square test or Fisher's exact test were used to compare qualitative variables. Logistic multivariate regression analyses were carried out using subclinical arteriosclerosis (presence of one or more plaque in the absence of clinical manifestations of arteriosclerotic disease), multiple ( $\geq 2$ ) carotid plaques and arterial thrombosis as the dependent variables. Variables significantly associated in the multivariate analysis together with other potentially relevant variables were included in the analysis as independent variables. All statistical tests were two-tailed and a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### General characteristics

The main characteristics according to the SLE profiles are shown in Table 1. Eighty-seven SLE patients were included: Twenty-two (25.3%) patients were classified as SLE-APS, 32 (36.8%) as SLE non-aPL, and 33 (37.9%) as SLE-aPL patients. Most patients (93.1%) were female and their mean age was  $41.1 \pm 11.2$  years. There was no difference in the prevalence of vascular risk factors (family history of CVD, smoking, obesity, arterial hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertriglyceridemia) among the three groups.

Subclinical arteriosclerosis was found in 19 (21.8%) patients. Thirteen episodes of arterial thrombosis were recorded: 8 in patients with SLE-APS and 5 in patients with SLE non-aPL. Only one episode of thrombotic microangiopathy was observed (in a SLE-APS patient). Eight episodes of venous thrombosis were detected, all in patients with SLE-APS.

### MPs in the whole series

The mean procoagulant activity of MPs in all 87 patients was  $13.65 \pm 8.08$  nM and there was no difference among SLE-APS ( $15.24 \pm 9.07$  nM), SLE non-aPL ( $12.46 \pm 5.94$  nM), and SLE-aPL ( $13.76 \pm 9.16$  nM);  $p = 0.466$ . No significant differences were seen in procoagulant MPs according to age, vascular risk factors or aPL positivity.

### MPs and subclinical arteriosclerosis

After excluding patients with arterial thrombosis, the procoagulant activity of MPs was analyzed based on the presence or absence of subclinical arteriosclerosis. The main characteristics of these 2 groups of patients are reflected in Table 2. Patients with subclinical arteriosclerosis were older, had a longer time of evolution of the disease, more chronic damage assessed by the SLICC scale and had predominance of some aPL (LAC and IgG aCL).

The procoagulant activity of MPs was  $15.35 \pm 9.26$  nM in SLE patients with subclinical arteriosclerosis and  $12.85 \pm 7.40$  nM in patients without subclinical arteriosclerosis ( $p = \text{NS}$ ) (Fig. 1). The multivariate analysis included demographic characteristics, CV risk factors, clinical manifestations, activity and damage scales (SLEDAI and SLICC), laboratory features, and treatment received. Only age [OR = 1.100 (95%CI 1.040–1.164);  $p = 0.001$ ] and SLICC [OR = 1.528 (95%CI 1.073–2.178);  $p = 0.019$ ] were independently associated with subclinical arteriosclerosis.

### MPs and multiple carotid plaques

Subsequently, the association of arteriosclerosis burden with the procoagulant activity of MPs was analyzed, comparing patients with multiple (two or more) carotid plaques versus those with less than two (one or none) carotid plaques. To analyze the relationship of MPs with the arteriosclerosis burden, patients with arterial thrombosis were excluded. The main characteristics of the patients without arterial thrombosis based on the absence or presence of multiple carotid plaques are shown in Table 2. Patients with multiple carotid plaques (and therefore, with a greater arteriosclerosis burden), were older, with a longer evolution time of the disease and had more chronic damage. However, there were no differences in the presence of aPL in both groups.

In SLE patients with multiple carotid plaques, the procoagulant activity of MPs was significantly higher ( $17.26 \pm 10.63$  nM vs  $12.78 \pm 7.15$  nM;  $p = 0.04$ ) (Fig. 1). In the multivariate analysis (performed with the variables described in the previous section), age [OR = 1.121 (95%CI 1.044–1.205);  $p = 0.002$ ], SLICC [OR = 1.658 (95%CI 1.124–2.445);  $p = 0.011$ ] and the procoagulant activity of

Author's personal copy

Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic...

**Table 1** Main characteristics of SLE patients included in the study

	SLE-APS (n=22)	SLE non-aPL (n=32)	SLE-aPL (n=33)	p
Age (years)	42.3 [9.6]	41.5 [10.3]	39.9 [13.1]	NS
Sex (F)	18 (81.8)	31 (96.9)	32 (97.0)	NS
Disease duration (months)	109.9 [71.7]	141.0 [68.3]	133.3 [86.1]	
Family history of CVD	1 (4.5)	5 (15.6)	1 (3.0)	NS
Smoking	7 (31.8)	10 (31.3)	7 (21.2)	NS
Obesity	2 (9.1)	4 (12.5)	7 (21.2)	NS
Hypertension	5 (22.7)	12 (37.5)	12 (36.4)	NS
Diabetes mellitus	0 (0.0)	1 (3.1)	0 (0.0)	NS
Hypercholesterolemia	8 (36.4)	12 (37.5)	8 (24.2)	NS
Hypertriglyceridemia	8 (36.4)	7 (21.9)	8 (24.2)	NS
SLE clinical features				
Joint involvement	21 (95.5)	30 (93.8)	32 (97.0)	NS
Skin involvement	15 (68.2)	26 (81.3)	28 (84.8)	NS
Thrombocytopenia	13 (59.1)	5 (15.6)	11 (33.3)	p=0.003
Renal involvement	11 (50.0)	21 (65.6)	11 (33.3)	p=0.034
Serositis	5 (22.7)	13 (40.6)	7 (21.2)	NS
CNS involvement	5 (22.7)	4 (12.5)	2 (6.1)	NS
Hemolytic anemia	3 (13.6)	9 (28.1)	12 (36.4)	NS
Arteriosclerosis prevalence <sup>a</sup>	11 (50.0)	9 (28.1)	8 (24.2)	NS
Clinical arteriosclerosis <sup>a</sup>	6 (27.3)	3 (9.4)	–	NS
Subclinical arteriosclerosis <sup>a</sup>	5 (22.7)	6 (18.8)	8 (24.2)	NS
Multiple carotid plaques <sup>b</sup>	7 (31.8)	6 (18.8)	4 (12.1)	NS
Clinical MCP <sup>b</sup>	5 (22.7)	3 (9.4)	–	NS
Subclinical MCP <sup>b</sup>	2 (9.1)	3 (9.4)	4 (12.1)	NS
SLEDAI-2K	10.4 [7.5]	4.7 [5.7]	7.0 [5.7]	p=0.006
SLICC/ACR-DI	1.4 [1.5]	1.4 [1.6]	1.1 [1.5]	NS
Treatment				
Antimalarial drugs	18 (81.8)	29 (90.6)	33 (100)	NS
Glucocorticoids	17 (77.3)	29 (90.6)	28 (84.8)	NS
ISS agents <sup>c</sup>	13 (59.1)	29 (90.6)	24 (72.7)	NS
Antiplatelet agents	6 (27.3)	8 (25.0)	13 (39.4)	NS
Anticoagulation	11 (50.0)	0 (0.0)	1 (3.0) <sup>d</sup>	p<0.001
APS clinical features				
Arterial thrombosis	8 (36.4)	5 (15.6)	–	
Venous thrombosis	8 (36.4)	0 (0.0)	–	
TMA	1 (4.5)	0 (0.0)	–	
Obstetric morbidity <sup>e</sup>	5 (27.8)	4 (12.9)	–	
aPL laboratory features				
aPL	22 (100.0)	–	33 (100.0)	
LAC	18 (81.8)	–	17 (51.1)	
aCL	16 (72.7)	–	30 (90.9)	
IgG aCL	11 (50.0)	–	18 (54.5)	
IgM aCL	5 (22.7)	–	14 (42.4)	
aβ2GPI	5 (22.7)	–	6 (18.2)	
IgG aβ2GPI	3 (13.6)	–	6 (18.2)	
IgM aβ2GPI	4 (18.2)	–	3 (9.1)	
Triple aPL positivity	4 (18.2)	–	5 (15.2)	

Categorical variables are expressed as number and percentage (in brackets) and continuous variables as mean ± standard deviation (in square brackets)

Abbreviations: *aβ2GPI* anti-β2 glycoprotein I, *aCL* anticardiolipin antibodies, *aPL* antiphospholipid antibodies, *APS* antiphospholipid syndrome, *APS-SLE* APS with associated SLE, *CVD* cardiovascular disease, *F* female, *ISS* immunosuppressant, *LAC* lupus anticoagulant, *MCP* multiple carotid plaques, *NS* no sig-

**Table 1** (continued)

nificant, *SLE* systemic lupus erythematosus, *SLE-aPL* SLE with aPL but without clinical criteria of APS, *SLEDAI-2K* Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000, *SLE non-aPL* SLE without aPL, *SLICC/ACR-DI* Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index, *TMA* thrombotic microangiopathy

<sup>a</sup>Arteriosclerosis prevalence was defined by the presence of one or more plaques at any of the carotid territories explored. Clinical and subclinical arteriosclerosis refers to the presence or absence of thrombotic manifestations of arteriosclerotic disease, respectively

<sup>b</sup>Multiple carotid plaques was defined by the existence of  $\geq 2$  plaques at any of the carotid territories explored. Clinical and subclinical MCP refers to the presence or absence of thrombotic manifestations of arteriosclerotic disease, respectively

<sup>c</sup>Cyclophosphamide, azathioprine, methotrexate, mycophenolate or others

<sup>d</sup>One patient with SLE-aPL was receiving anticoagulation therapy due to a mechanical valve (without thrombotic events)

<sup>e</sup>Only taking females into account

MPs [OR = 1.094 (95%CI 1.010–1.185);  $p = 0.027$ ] were independently associated with multiple carotid plaques.

### MPs and arterial thrombosis

The main characteristics of the patients based on the absence or presence of arterial thrombosis are reflected in Table 3. The patients who suffered arterial thrombosis were older and had less joint involvement, took fewer antimalarials and received anticoagulation more frequently. As it could be predictable, a higher prevalence and burden of arteriosclerosis was seen in patients who had suffered arterial thrombosis (Table 3), which corroborates the arteriosclerotic continuum in the patients of the present study.

The procoagulant activity of MPs was higher in SLE patients with arterial thrombosis than in those without arterial thrombosis ( $17.28 \pm 8.29$  nM vs  $12.96 \pm 7.90$  nM;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1). Likewise, in the multivariate analysis (including the variables used in previous sections) arterial thrombosis was independently associated with age [OR = 1.080 (95%CI 1.016–1.148);  $p = 0.014$ ] and the procoagulant activity of MPs [OR = 1.101 (95%CI 1.025–1.182);  $p = 0.008$ ].

### MPs and other thrombosis

No relationship was found between increased procoagulant activity of MPs and venous thrombosis ( $17.78 \pm 9.75$  nM vs  $13.24 \pm 7.84$  nM;  $p = \text{NS}$ ). Since thrombotic microangiopathy was detected in only one patient, we decided not to include it in the analysis.

### Discussion

MPs have been associated with endothelial dysfunction [29] and CVD [33] in SLE patients but, to our knowledge, this is the first study to analyze the specific relationship between the procoagulant activity of MPs and the arteriosclerotic

disease continuum, from subclinical arteriosclerosis to arterial thrombosis, highlighting the importance of the arteriosclerosis burden. We found that the procoagulant activity of MPs was not statistically different among patients with or without subclinical arteriosclerosis (presence/absence of plaque). However, with the increase in arteriosclerotic burden (patients with multiple carotid plaques and patients with arterial thrombosis) an association with procoagulant activity of MPs was found.

The importance of the arteriosclerosis burden in CV risk assessment has been highlighted in recent years [6, 8, 9, 40] stating that compared to the mere presence of plaque, the measurement of arteriosclerosis burden better assess the CV risk [8]. In line with our results, in a recent study analyzing obesity (another CV risk factor), an association between adiposity and carotid plaque burden, but not with the presence/absence of plaque, has been found. The authors suggested that perhaps adiposity contributes more to development than to the onset of plaque [40]. Other authors have demonstrated in type 1 [6] and type 2 [9] diabetes patients an association between the arteriosclerosis burden and the existence of diabetic retinopathy, a target organ injury associated with an increased risk of developing CVD [6, 9].

Our findings support an association between MPs and arteriosclerosis burden in SLE patients. These results are in line with those obtained in patients without autoimmune diseases. Chironi et al. [41] analyzed subclinical arteriosclerosis by ultrasound of the carotid arteries, abdominal aorta and femoral arteries in 216 asymptomatic subjects included in a CV prevention program and found that leukocyte-derived MPs levels were significantly associated with a higher arteriosclerotic burden, defined by plaque in 2 or 3 sites compared with a single site or no site. Suades et al. [42] analyzed MPs levels in 37 high CV risk-familial hypercholesterolemia patients and compared them with 37 patients with secondary hypercholesterolemia. Levels of procoagulant tissue factor-bearing MPs were higher in high CV risk patients and, among them, MPs levels correlated with the lipid-rich arteriosclerotic plaque burden at the carotid and aortic levels.

Author's personal copy

Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic...

**Table 2** Main characteristics of SLE patients without arterial thrombosis according to subclinical arteriosclerosis and multiple carotid plaques

	Subclinical arteriosclerosis <sup>a</sup>			Multiple carotid plaques <sup>b</sup>		
	Presence (n=19)	Absence (n=55)	p	Presence (n=9)	Absence (n=65)	p
Age (years)	47.8 [9.2]	37.3 [11.1]	p<0.001	50.3 [10.8]	38.5 [11.0]	p=0.003
Sex (F)	17 (89.5)	52 (94.5)	NS	8 (88.9)	61 (93.8)	NS
Disease duration (months)	181.5 [98.0]	113.5 [62.6]	p=0.009	198.2 [100.3]	122.0 [71.0]	p=0.005
Family history of CVD	2 (10.5)	3 (5.5)	NS	1 (11.1)	4 (6.2)	NS
Smoking	6 (31.6)	14 (25.5)	NS	2 (22.2)	18 (27.7)	NS
Obesity	2 (10.5)	9 (16.4)	NS	1 (11.1)	10 (15.4)	NS
Hypertension	8 (42.1)	17 (30.9)	NS	5 (55.6)	20 (30.8)	NS
Diabetes mellitus	0 (0.0)	1 (1.8)	NS	0 (0.0)	1 (1.5)	NS
Hypercholesterolemia	7 (36.8)	17 (30.9)	NS	5 (55.6)	19 (29.2)	NS
Hypertriglyceridemia	6 (31.6)	13 (23.6)	NS	4 (44.4)	15 (23.1)	NS
SLE clinical features						
Joint involvement	19 (100.0)	54 (98.2)	NS	9 (100.0)	64 (98.5)	NS
Skin involvement	15 (78.9)	45 (81.8)	NS	7 (77.8)	53 (81.5)	NS
Thrombocytopenia	4 (21.1)	20 (36.4)	NS	2 (22.2)	22 (33.8)	NS
Renal involvement	8 (42.1)	28 (50.9)	NS	5 (55.6)	31 (47.7)	NS
Serositis	7 (36.8)	14 (25.5)	NS	5 (55.6)	16 (24.6)	NS
CNS involvement	2 (10.5)	5 (9.1)	NS	2 (22.2)	5 (7.7)	NS
Hemolytic anemia	3 (15.8)	18 (32.7)	NS	1 (11.1)	20 (30.8)	NS
SLEDAI-2K	7.1 [6.7]	6.4 [6.3]	NS	7.4 [6.1]	6.5 [6.5]	NS
SLICC/ACR-DI	1.9 [1.6]	1.0 [1.3]	p=0.01	2.7 [1.8]	1.0 [1.2]	p=0.001
Treatment						
Antimalarial drugs	18 (94.7)	54 (98.2)	NS	8 (88.9)	64 (98.5)	NS
Glucocorticoids	16 (84.2)	48 (87.3)	NS	9 (100.0)	55 (84.6)	NS
ISS agents <sup>c</sup>	14 (73.7)	42 (76.4)	NS	8 (88.9)	48 (73.8)	NS
Antiplatelet agents	4 (21.1)	18 (32.7)	NS	2 (22.2)	20 (30.8)	NS
Anticoagulation	2 (10.5)	5 (9.1)	NS	1 (11.1)	6 (9.2)	NS
aPL laboratory features						
aPL	13 (68.4)	34 (61.8)	NS	6 (66.7)	41 (63.1)	NS
LAC	11 (57.9)	17 (30.9)	p=0.04	5 (55.6)	23 (35.4)	NS
aCL	11 (57.9)	30 (54.5)	NS	5 (55.6)	36 (55.4)	NS
IgG aCL	10 (52.6)	15 (27.3)	p=0.04	5 (55.6)	20 (30.8)	NS
IgM aCL	4 (21.1)	14 (25.5)	NS	1 (11.1)	17 (26.2)	NS
aβ2GPI	4 (33.3)	5 (11.9)	NS	2 (33.3)	7 (14.6)	NS
IgG aβ2GPI	3 (25.0)	4 (9.5)	NS	2 (33.3)	5 (10.4)	NS
IgM aβ2GPI	3 (25.0)	3 (7.1)	NS	1 (16.7)	5 (10.4)	NS
Triple aPL positivity	3 (20%)	4 (7.7)	NS	1 (14.3)	6 (10.0)	NS

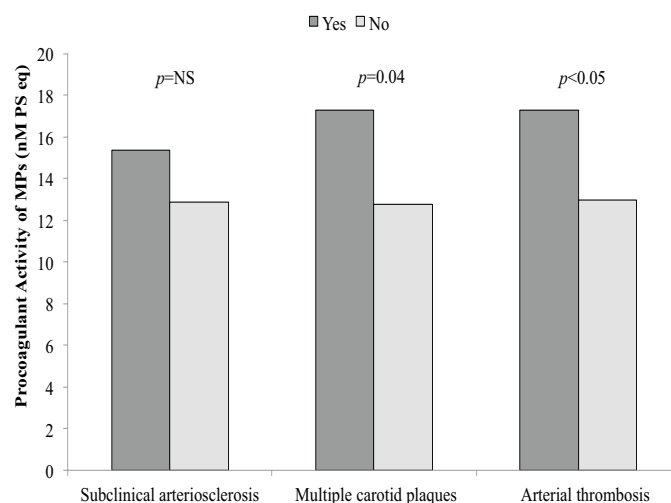
Categorical variables are expressed as number and percentage (in brackets) and continuous variables as mean ± standard deviation (in square brackets)

Abbreviations: *aβ2GPI* anti-β2 glycoprotein I, *aCL* anticardiolipin antibodies, *aPL* antiphospholipid antibodies, *CVD* cardiovascular disease, *F* female, *ISS* immunosuppressant, *LAC* lupus anticoagulant, *NS* no significant, *SLE* systemic lupus erythematosus, *SLEDAI-2K* Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000, *SLICC/ACR-DI* Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index

<sup>a</sup>Subclinical arteriosclerosis was defined by the presence of one or more plaques at any of the carotid territories explored in the absence of clinical manifestations of arteriosclerotic disease

<sup>b</sup>Multiple carotid plaques was defined by the existence of ≥2 plaques at any of the carotid territories explored. The analysis was performed in patients without arterial thrombosis

<sup>c</sup>Cyclophosphamide, azathioprine, methotrexate, mycophenolate or others



**Fig 1** Procoagulant activity of MPs in SLE patients with subclinical arteriosclerosis, multiple carotid plaques without arterial thrombosis, or arterial thrombosis. Procoagulant activity of MPs (mean ± standard deviation) obtained for the different study subgroups was the following: subclinical arteriosclerosis, presence 15.35 ± 9.26 nM vs absence 12.85 ± 7.40 nM, p=NS; multiple carotid plaques, presence 17.26 ± 10.63 nM vs absence 12.78 ± 7.15 nM, p=0.04; and arterial thrombosis, presence 17.28 ± 8.29 nM vs absence 12.96 ± 7.90 nM,

p<0.05. The p-value was obtained by Student t-test. The results shown are unadjusted for covariables. Subclinical arteriosclerosis was defined by the presence of one or more plaques at any of the carotid territories explored in the absence of clinical manifestations of arteriosclerotic disease. Multiple carotid plaques was defined by the existence of ≥ 2 plaques at any of the carotid territories explored. The analysis was performed in patients without arterial thrombosis.

The fact that MPs were associated with arteriosclerosis burden rather than the mere presence or absence of plaque is intriguing. In our study, presence/absence of plaque was related only with age and chronic damage associated with SLE. Consequently, and in accordance with that suggested by Imahori et al. [40], we can hypothesise that MPs contribute to the process of arteriosclerosis progression more than the process of plaque initiation.

We found an association between the procoagulant activity of MPs and arterial thrombosis in patients with SLE. Only two studies have analyzed the relationship between arterial thrombosis and MPs in patients with SLE, with differing results [31, 33]. López et al. [33] found a significantly higher amount of total MPs in SLE patients with CVD. In contrast, Nielsen et al. [31] reported lower levels of MPs in 70 patients with SLE compared with controls, with a relative increase in annexin V-nonbinding MPs in SLE patients with a history of arterial thrombosis.

The role of MPs in non-autoimmune diseases has been assessed in arterial thrombosis. In 2018, a meta-analysis of 13 studies including 988 patients with ischemic stroke and 985 controls found an association between MPs levels and ischemic stroke, except for lymphocyte-derived MPs where no relationship was found [43]. In another review, an association between endothelial and platelet-derived

MPs and stroke was postulated [44]. Additionally, in a meta-analysis of 11 studies, a relationship was found between myocardial infarction and annexin V-positive, endothelial and platelet MPs, but not with leukocyte MPs [45]. This evidence seems to show a clear relationship between MPs and arterial thrombosis [31, 33, 43–45], although studies assessing subtypes of MPs related to CVD are not always concordant [43, 45]. This may be explained, in part, by methodological issues. Flow cytometry is the method most frequently used to determine MPs and allows the quantification and determination of their cellular source. Although flow cytometry is considered the gold standard, it has some technical limitations, such as the lack of standardization and concerns about the detection limit for small size MPs that makes its use outside of research laboratories difficult. Functional assays, such as that used in the present study, assess the biological activities (procoagulant in the present assay) independently of their cellular source or size. Functional assays are reproducible and automatable and thus procoagulant MPs may be postulated as a biomarker of atherothrombotic risk [46].

Lastly, the possible value of MPs as a biological therapeutic target for arterial thrombosis or subclinical arteriosclerosis progression in SLE remains to be assessed. A therapeutic regime including drugs such as statins, aspirin

Author's personal copy

Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic...

**Table 3** Main characteristics in SLE patients according to arterial thrombosis

	Arterial thrombosis		
	Presence (n=13)	Absence (n=74)	p
Age (years)	47.4 [6.2]	40.0 [11.5]	p=0.002
Sex (F)	12 (92.3)	69 (93.2)	NS
Disease duration (months)	125.8 [66.4]	131.0 [78.5]	NS
Family history of CVD	2 (15.4)	5 (6.8)	NS
Smoking	4 (30.8)	20 (27.0)	NS
Obesity	2 (15.4)	11 (14.9)	NS
Hypertension	4 (30.8)	12 (33.8)	NS
Diabetes mellitus	0 (0.0)	1 (1.4)	NS
Hypercholesterolemia	4 (30.8)	24 (32.4)	NS
Hypertriglyceridemia	4 (30.8)	19 (25.7)	NS
SLE clinical features			
Joint involvement	10 (76.9)	73 (98.6)	p=0.01
Skin involvement	9 (69.2)	60 (81.1)	NS
Thrombocytopenia	5 (38.5)	24 (32.4)	NS
Renal involvement	7 (53.8)	36 (48.6)	NS
Serositis	4 (30.8)	21 (28.4)	NS
CNS involvement	4 (30.8)	7 (9.5)	NS
Hemolytic anemia	3 (23.1)	21 (28.4)	NS
Arteriosclerosis prevalence <sup>a</sup>	9 (69.2)	19 (25.7)	p=0.004
Multiple carotid plaques <sup>b</sup>	8 (61.5)	9 (12.2)	p<0.001
SLEDAI-2K	9.4 [7.1]	6.6 [6.4]	NS
SLICC/ACR-DI	1.5 [2.1]	1.2 [1.4]	NS
Treatment			
Antimalarial drugs	8 (61.5)	72 (97.3)	p=0.001
Glucocorticoids	10 (76.9)	64 (86.5)	NS
ISS agents <sup>c</sup>	10 (76.9)	56 (75.7)	NS
Antiplatelet agents	5 (38.5)	22 (29.7)	NS
Anticoagulation	5 (38.5)	7 (9.5)	p=0.015
aPL laboratory features			
aPL	8 (61.5)	47 (63.5)	NS
LAC	7 (53.8)	28 (37.8)	NS
aCL	5 (38.5)	41 (55.4)	NS
IgG aCL	4 (33.3)	25 (33.8)	NS
IgM aCL	1 (8.3)	18 (24.3)	NS
aβ2GPI	2 (20.0)	9 (16.7)	NS
IgG aβ2GPI	2 (20.0)	7 (13.0)	NS
IgM aβ2GPI	1 (10.0)	6 (11.1)	NS
Triple aPL positivity	2 (16.7)	7 (10.4)	NS

Categorical variables are expressed as number and percentage (in brackets) and continuous variables as mean ± standard deviation (in square brackets)

Abbreviations: *aβ2GPI* anti-β2 glycoprotein I, *aCL* anticardiolipin antibodies, *aPL* antiphospholipid antibodies, *CVD* cardiovascular disease, *F* female, *ISS* immunosuppressant, *LAC* lupus anticoagulant, *NS* no significant, *SLE* systemic lupus erythematosus, *SLEDAI-2K* Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000, *SLICC/ACR-DI* Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index

<sup>a</sup>Arteriosclerosis prevalence was defined by the presence of one or more plaques at any of the carotid territories explored

<sup>b</sup>Multiple carotid plaques was defined by the existence of ≥2 plaques at any of the carotid territories explored

<sup>c</sup>Cyclophosphamide, azathioprine, methotrexate, mycophenolate or others

or aggressive immunosuppressive therapy, which is known to diminish MPs levels [47–49], may be a useful approach in the future.

### Strengths and limitations

A strength of the study is that it is the first specific analysis of the relationship between MPs and arteriosclerosis burden in patients with SLE. However, some limitations should be noted. Firstly, the retrospective nature of the study. Secondly, the small number of patients, inherent to the low prevalence of the disease. Thirdly, the use of carotid ultrasound to assess the arteriosclerosis burden. Although it is a validated test, there are subjective aspects in its interpretation, linked to the experience of the sonographer. Finally, the risk of type I error (that is, the existence of "casual" false positives, just by analyzing multiple subgroups) is another limitation that is implicit in a work of this nature where the analysis of different subgroups was essential to eliminate confounding factors.

### Future directions

If prospective studies with more patients confirm that the procoagulant activity of MPs could identify SLE patients at greater atherothrombotic risk, their use as a biomarker would enable patients to benefit from early arteriosclerosis prophylaxis.

### Conclusions

In conclusion, our results show the procoagulant activity of MPs was associated with the burden of arteriosclerosis and with arterial thrombosis in patients with SLE and, therefore, is related to the CV risk of these patients.

**Funding** This study was supported in part by Grant Nos. FIS 11/00977 and 05/0204 from the "Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)".

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare they have no competing interests.

**Ethics approval** The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic de Barcelona (linked to the University of Barcelona), it was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all participants.

### References

- Bertsias G, Ioannidis JPA, Boletis J et al (2008) EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis* 67:195–205. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.070367>
- Jiménez S, García-Criado M, Tàssies D et al (2005) Preclinical vascular disease in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatology(Oxford)* 44:756–761. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh581>
- Thompson T, Sutton-Tyrrell K, Wildman RP et al (2008) Progression of carotid intima-media thickness and plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 58:835–842. <https://doi.org/10.1002/art.23196>
- Teixeira V, Tam L-S (2018) Novel insights in systemic lupus erythematosus and atherosclerosis. *Front Med* 4:262. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00262>
- Shah PK, Lecis D (2019) Inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Res*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18901.1>
- Carbonell M, Castelblanco E, Valldeperas X et al (2018) Diabetic retinopathy is associated with the presence and burden of subclinical carotid atherosclerosis in type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 17:66. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0706-z>
- Jiménez S, Tàssies D, Espinosa G et al (2008) Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 67:835–840. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.077321>
- Naqvi TZ, Lee M-S (2014) Carotid intima-media thickness and plaque in cardiovascular risk assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* 7:1025–1038. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2013.11.014>
- Alonso N, Traveset A, Rubinat E et al (2015) Type 2 diabetes-associated carotid plaque burden is increased in patients with retinopathy compared to those without retinopathy. *Cardiovasc Diabetol* 14:33. <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0196-1>
- Urowitz MB, Bookman AAM, Koehler BE et al (1976) The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 60:221–225. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(76\)90427-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(76)90427-7)
- Esdaille JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T et al (2001) Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:2331–2337. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)44:10<2331:AID-ART395>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)44:10<2331:AID-ART395>3.0.CO;2-I)
- Tàssies D, Espinosa G, Muñoz-Rodríguez FJ et al (2000) The 4G/5G polymorphism of the type I plasminogen activator inhibitor gene and thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 43:2349–2358. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200010\)43:10<2349:AID-ANR24>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200010)43:10<2349:AID-ANR24>3.0.CO;2-J)
- Plasín-Rodríguez MA, Rodríguez-Pintó I, Patricio P et al (2018) The H1 haplotype of the endothelial protein C receptor protects against arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 169:128–134. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.006>
- Narshi CB, Giles IP, Rahman A (2011) The endothelium: an interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus* 20:5–13. <https://doi.org/10.1177/0961203310382429>
- Schoenfeld SR, Kasturi S, Costenbader KH (2013) The epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease among patients

Author's personal copy

Procoagulant microparticles are associated with arterial disease in patients with systemic...

- with SLE: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 43:77–95. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.12.002>
16. Moriya J (2019) Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol* 73:22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2018.05.010>
  17. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM (2019) Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 133:906–918. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-882993>
  18. Beyer C, Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:21–29. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.229>
  19. Nicolai E, Emmi G, Squatrito D et al (2015) Microparticles: bridging the gap between autoimmunity and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 41:413–422. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1549850>
  20. Cunningham M, Marks N, Barnado A et al (2014) Are microparticles the missing link between thrombosis and autoimmune diseases? involvement in selected rheumatologic diseases. *Semin Thromb Hemost* 40:675–681
  21. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R (2011) Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:4–9. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200998>
  22. Voukalis C, Shantsila E, Lip GYH (2019) Microparticles and cardiovascular diseases. *Ann Med* 51:193–223. <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1609076>
  23. Rautou PE, Vion AC, Amabile N et al (2011) Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* 109:593–606. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233163>
  24. Świtowska M, Stomka A, Sinkiewicz W, Zekanowska E (2015) Tissue-factor-bearing microparticles (MPs-TF) in patients with acute ischaemic stroke: The influence of stroke treatment on MPs-TF generation. *Eur J Neurol* 22:395–401. <https://doi.org/10.1111/ene.12591>
  25. Thulin Å, Christersson C, Alfredsson J, Siegbahn A (2016) Circulating cell-derived microparticles as biomarkers in cardiovascular disease. *Biomark Med* 10:1009–1022. <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0035>
  26. Montoro-García S, Orenes-Piñero E, Marín F et al (2012) Pharmacological modulation of microparticle release: new strategies for the management of atherothrombotic vascular disorders. *Curr Pharm Des* 18:840–849. <https://doi.org/10.2174/138161212799277789>
  27. Versteeg HH, Heemskerck JWM, Levi M, Reitsma PH (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 93:327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
  28. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M et al (2006) Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 95:94–99
  29. McCarthy EM, Wilkinson FL, Parker B, Alexander MY (2016) Endothelial microparticles: pathogenic or passive players in endothelial dysfunction in autoimmune rheumatic diseases? *Vascul Pharmacol* 86:71–76. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.016>
  30. Sellam J, Proulle V, Jünger A et al (2009) Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 11:R156. <https://doi.org/10.1186/ar2833>
  31. Nielsen CT, Østergaard O, Johnsen C et al (2011) Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 63:3067–3077. <https://doi.org/10.1002/art.30499>
  32. Nielsen CT, Østergaard O, Rekvig OP et al (2015) Galectin-3 binding protein links circulating microparticles with electron dense glomerular deposits in lupus nephritis. *Lupus* 24:1150–1160. <https://doi.org/10.1177/0961203315580146>
  33. López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A et al (2017) Circulating microparticle subpopulations in systemic lupus erythematosus are affected by disease activity. *Int J Cardiol* 236:138–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.02.107>
  34. Aringer M, Costenbader K, Daikh D et al (2019) 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214819>
  35. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T et al (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4:295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>
  36. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB (2002) Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 29:288–291
  37. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C et al (1996) The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39:363–369. <https://doi.org/10.1002/art.1780390303>
  38. Pengo V, Tripodi A, Reber G et al (2009) Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 7:1737–1740. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x>
  39. Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Creus M et al (2016) Higher levels of procoagulant microparticles in women with recurrent miscarriage are not associated with antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod* 31:46–52. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev278>
  40. Imahori Y, Mathiesen EB, Leon DA et al (2018) The contribution of obesity to carotid atherosclerotic plaque burden in a general population sample in Norway: the Tromsø Study. *Atherosclerosis* 273:15–20. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.014>
  41. Chironi G, Simon A, Hugel B et al (2006) Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2775–2780. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000249639.36915.04>
  42. Suades R, Padró T, Alonso R et al (2015) High levels of TSP1+CD142+ platelet-derived microparticles characterise young patients with high cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis. *Thromb Haemost* 114:1310–1321. <https://doi.org/10.1160/TH15-04-0325>
  43. Wang B, Cai W, Zhang Z et al (2018) Circulating microparticles in patients after ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Rev Neurosci*. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0105>
  44. El-Gamal H, Parray AS, Mir FA et al (2019) Circulating microparticles as biomarkers of stroke: a focus on the value of endothelial- and platelet-derived microparticles. *J Cell Physiol* 234:16739–16754. <https://doi.org/10.1002/jcp.28499>
  45. Wang Z, Cai W, Hu S et al (2017) A meta-analysis of circulating microvesicles in patients with myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol* 109:156–164. <https://doi.org/10.5935/abc.20170102>
  46. Campello E, Spiezia L, Radu CM et al (2014) Evaluation of a procoagulant phospholipid functional assay as a routine test for measuring circulating microparticle activity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 25:534–537. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000068>
  47. Suades R, Padró T, Alonso R et al (2013) Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from



- endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost* 110:366–377. <https://doi.org/10.1160/TH13-03-0238>
48. Bulut D, Becker V, Mügge A (2011) Acetylsalicylate reduces endothelial and platelet-derived microparticles in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol* 89:239–244. <https://doi.org/10.1139/y11-013>
49. Parker B, Al-Husain A, Pemberton P et al (2014) Suppression of inflammation reduces endothelial microparticles in active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 73:1144–1150. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-203028>
- Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### **Resumen de la metodología y de los resultados del segundo estudio.**

El objetivo del segundo estudio fue valorar la relación entre la actividad procoagulante de las MPs y la patología CV en pacientes con LES. Para ello se estudió la relación de las MPs con la mera presencia de placa carotídea en pacientes asintomáticos (arteriosclerosis subclínica), el número de placas (carga de arteriosclerosis) y la presencia de trombosis arterial.

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron 87 pacientes con LES: 22 (25,3%) pacientes con LES asociado a SAF, 32 (36,8%) con LES sin AAF y 33 (37,9%) con LES y AAF, pero sin criterios clasificatorios de SAF. A todos los pacientes se les determinó la actividad procoagulante de las MPs mediante un ensayo funcional con anexina V. La arteriosclerosis fue evaluada a través de una ecografía carotídea y las trombosis fueron diagnosticadas mediante métodos objetivos.

La media de la actividad procoagulante de las MPs en los 87 pacientes con LES fue de  $13,65 \pm 8,08$  nM. No hubo diferencias en la actividad procoagulante de las MPs entre los 3 subgrupos de pacientes con LES.

En función de la presencia o ausencia de arteriosclerosis subclínica, la actividad procoagulante de las MPs fue de  $15,35 \pm 9,26$  nM y de  $12,85 \pm 7,40$  nM, respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa. En el análisis multivariante, la arteriosclerosis subclínica sólo se asoció de forma independiente con la edad [OR=1,100 (IC 95% 1,040–1,164); p=0,001] y con el daño crónico medido mediante la escala SLICC/ACR (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology*) [OR=1,528 (IC 95% 1,073–2,178); p=0,019].

Al comparar los pacientes con placa carotídea múltiple (2 o más) y, por tanto, con mayor carga de arteriosclerosis, frente a los pacientes con una sola placa o ninguna, se objetivó que aquellos pacientes con mayor carga de arteriosclerosis tenían una actividad procoagulante de las MPs significativamente mayor ( $17,26 \pm 10,63$  nM vs  $12,78 \pm 7,15$  nM;  $p=0,04$ ). En el análisis multivariante, la placa carotídea múltiple se asoció de forma independiente con la edad [OR=1,121 (IC 95% 1,044–1,205);  $p=0,002$ ], con el SLICC/ACR [OR=1,658 (IC 95% 1,124–2,445);  $p=0,011$ ] y con la actividad procoagulante de las MPs [OR=1,094 (IC 95% 1,010–1,185);  $p=0,027$ ].

Los pacientes con trombosis arterial presentaron una actividad procoagulante de las MPs significativamente mayor que los pacientes sin trombosis arterial ( $17,28 \pm 8,29$  nM vs  $12,96 \pm 7,90$  nM;  $p<0,05$ ). En el análisis multivariante, la trombosis arterial se asoció de manera independiente con la edad [OR= 1,080 (IC 95% 1,016–1,148);  $p=0,014$ ] y con la actividad procoagulante de las MPs [OR= 1,101 (IC 95% 1,025–1,182);  $p=0,008$ ].

De acuerdo con nuestros resultados, en los pacientes con LES, la actividad procoagulante de las MPs se relaciona con una mayor carga arteriosclerótica y con las trombosis arteriales y, por tanto, con un mayor riesgo CV.

## **6. DISCUSIÓN**



La patología CV está íntimamente relacionada con dos EAS bien caracterizadas, el SAF y el LES. En el caso del SAF, la patología trombótica representa su manifestación clínica más característica y forma parte de sus criterios clasificatorios, pero se desconoce cuál es el mecanismo exacto por el que se producen las trombosis y qué papel juegan los AAF en dicho mecanismo. Los pacientes con LES, por su parte, tienen un mayor riesgo de desarrollar arteriosclerosis acelerada y ECV, y a pesar de que ésta no se incluye dentro de sus criterios diagnósticos, es la principal causa de muerte en estos pacientes. Se sabe que existen diferentes factores que participan en esta mayor prevalencia de patología CV en el LES, como los FRCV tradicionales y también factores relacionados con el propio LES como son la actividad y duración de la enfermedad, la presencia de AAF o de afectación renal y el uso crónico de glucocorticoides. Como la arteriosclerosis tiene una base inflamatoria crónica, se considera que la actividad inflamatoria persistente en pacientes con LES es el principal mecanismo que favorece la arteriosclerosis acelerada que se ha detectado en estos pacientes. Esta tesis doctoral pretende ampliar el conocimiento de la fisiopatología CV de estas dos EAS.

El SAF es la trombofilia adquirida más frecuente y se sabe que los AAF están implicados de alguna manera en el desarrollo de las trombosis. La etiopatogenia de las trombosis en el SAF es compleja y parte de una predisposición genética que precisa de un desencadenante ambiental. En lo que respecta a la predisposición genética, ha sido objeto de una ardua investigación en los últimos años y en esta línea nuestro grupo demostró que existe una relación entre la trombosis arterial y los polimorfismos de algunos genes que regulan la hemostasia, como los que codifican las glicoproteínas plaquetarias y el PAI-1. Otro de los genes implicados en la

hemostasia y que ha sido estudiado en los últimos años por diversos autores es el gen *PROCR*.

El gen *PROCR* codifica el EPCR y este receptor es fundamental en el sistema anticoagulante de la PC, ya que se encarga de potenciar hasta veinte veces la activación de la PC. Una vez activada, la PCa fragmenta los factores FVa y FVIIIa y, de esta manera, ejerce una función anticoagulante. Determinados polimorfismos del *PROCR*, que han dado lugar a la caracterización de diferentes haplotipos, también se han relacionado con la patología trombótica, concretamente los haplotipos *PROCR* H1 y H3. Estos haplotipos han sido poco estudiados en las EAS. En pacientes con LES se demostró una mayor prevalencia del haplotipo H3 respecto a los controles, pero no se relacionó con el daño vascular. En el caso de la EB, se detectó un efecto protector del haplotipo H1 sobre la trombosis venosa que los autores relacionaron con unos niveles más elevados de PCa en presencia de este haplotipo. Sin embargo, hasta el momento no se ha analizado el papel de los haplotipos *PROCR* en las trombosis de los pacientes con SAF. Por este motivo, el primer estudio de esta tesis doctoral se centra en evaluar esta relación y según nuestros resultados, el haplotipo *PROCR* H1 tiene un efecto protector de la trombosis arterial en los pacientes con SAF.

Aunque más allá de las EAS los resultados de los diferentes estudios siguen siendo inconsistentes, la mayoría de ellos detectan relación entre los haplotipos *PROCR* y el riesgo de trombosis, sobre todo en lo que respecta al riesgo reducido de trombosis arterial o venosa en presencia del haplotipo H1. El papel protector del haplotipo H1 en la trombosis arterial descrito en dichos estudios es congruente con nuestros resultados en pacientes con SAF. Sin embargo, no encontramos relación con la trombosis venosa en nuestra serie.

Respecto al haplotipo H3, algunos autores lo han relacionado con un aumento del riesgo de trombosis venosa, mientras que otros no han encontrado ninguna asociación, como ocurrió en nuestro caso. Por su parte, las diferentes publicaciones que hacen referencia a la relación del haplotipo H3 con la trombosis arterial muestran resultados especialmente contradictorios. Algunos estudios lo consideran un factor de riesgo, otros lo consideran un factor protector y otros estudios no han encontrado ninguna asociación. En nuestra serie, a pesar de que detectamos una menor prevalencia del haplotipo H3 en pacientes con trombosis arterial, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Creemos que existen varios factores que pueden explicar la falta de consenso entre los estudios del haplotipo H3. Por un lado, se debe considerar la heterogeneidad en el diseño de los estudios, que incluye estudios retrospectivos, prospectivos y meta-análisis. Además, hay diferencias en las poblaciones estudiadas, tanto en lo que respecta al tamaño muestral como a la diversidad étnica de los pacientes incluidos en los diferentes estudios. También puede haber aspectos genéticos, donde la interacción con algún otro polimorfismo podría aumentar o reducir el riesgo de trombosis.

Por otra parte, se ha reportado que el haplotipo H3 tendría un efecto protrombótico de carácter leve y esto es interesante en el contexto del SAF, ya que es posible que el modesto efecto protrombótico del H3 quedase enmascarado por el efecto protrombótico mucho más importante de los AAF. Esta hipótesis podría explicar la falta de asociación del haplotipo H3 con las trombosis en nuestro primer estudio.

Los niveles de sEPCR, la forma soluble del EPCR, también se han relacionado con la patología trombótica pero nuevamente hay pocos estudios en EAS. Estos estudios se realizaron en pacientes con LES y EB, sin llegar a encontrar ninguna asociación con trombosis. En el primer estudio de la presente tesis, analizamos la relación entre los



niveles de sEPCR y las trombosis en pacientes con SAF, pero tampoco encontramos asociación, independientemente del territorio vascular estudiado (arterial o venoso). De acuerdo con los diferentes estudios publicados, no existe una clara asociación entre sEPCR y el riesgo trombótico. Aunque nosotros no detectamos una asociación directa entre sEPCR y trombosis, sí que objetivamos unos niveles inferiores de sEPCR en presencia del haplotipo H1, el cual a su vez se comportó como un factor protector frente a la trombosis arterial. Uno de los motivos que podrían explicar la falta de asociación entre sEPCR y trombosis, es el tiempo transcurrido desde la manifestación trombótica hasta que se realiza la determinación de los niveles de sEPCR, ya que es posible que los niveles de sEPCR vayan cambiando conforme pasa el tiempo tras la trombosis. Además, es también posible que existan otros mecanismos mediados por los diferentes haplotipos del *PROCR* que actúen en paralelo al sEPCR y que impidan atribuirle toda la causalidad de la trombosis.

Por tanto, estos resultados refuerzan la participación de determinantes genéticos de los mecanismos de control de la hemostasia en el desarrollo de las trombosis características de los pacientes con SAF. Sería interesante analizar si una combinación de estas variables genéticas conseguiría identificar a pacientes con especial riesgo trombótico, lo cual, a su vez, podría condicionar la intensidad del tratamiento anticoagulante de estos pacientes.

La relación entre LES y ECV también ha sido investigada de forma intensiva encontrando numerosos factores implicados. Por su parte, las MPs se han relacionado con procesos inflamatorios y trombóticos y también se ha vinculado con las EAS. En los últimos años, las MPs han sido el foco de atención para entender la fisiopatología de la ECV en el LES, ya que podrían explicar la relación entre inflamación, autoinmunidad y trombosis.

El papel de las MPs en la ECV de los pacientes con LES ha sido evaluado previamente en dos estudios. En el primero se detectó un aumento de las MPs totales en pacientes con ECV y en el segundo se evidenció un aumento relativo de un subtipo de MPs no unidas a anexina V en pacientes que habían sufrido una trombosis arterial. En el segundo estudio de esta tesis doctoral, realizado en pacientes con LES, se analiza la relación entre la actividad procoagulante de las MPs y la enfermedad arteriosclerótica en todo su espectro, es decir, desde las etapas iniciales de la arteriosclerosis subclínica hasta la trombosis arterial, evaluando el aumento de carga de arteriosclerosis en ausencia de trombosis. Según nuestros resultados, los pacientes con más carga de arteriosclerosis y con trombosis arterial tienen una mayor actividad procoagulante de las MPs.

Fuera del contexto de las EAS, también se han detectado niveles más elevados de MPs relacionados con una mayor carga de arteriosclerosis. La importancia de la carga de arteriosclerosis radica en que se relaciona con una mayor prevalencia de lesión en órgano diana y con un aumento en el riesgo CV. Otros autores también demostraron que la obesidad se relaciona más con la carga de arteriosclerosis que con la simple presencia de placa y sugirieron que la obesidad era un factor que podría contribuir más en la progresión de la arteriosclerosis que en su inicio. En nuestro estudio, la relación de las MPs con la carga de arteriosclerosis y la trombosis arterial y no con la mera presencia de placa, está en consonancia con estos resultados y también podrían traducir una mayor participación de las MPs en la progresión de la arteriosclerosis que en el inicio de ésta.

En cuanto a la trombosis arterial, en diferentes metaanálisis y revisiones realizadas en enfermedad cerebrovascular y cardiopatía isquémica, se ha demostrado una relación con las MPs. Sin embargo, existen ciertas inconsistencias entre los diferentes estudios

para determinados subtipos de MPs. Esto podría traducir una diferente funcionalidad entre MPs con distinto origen celular, pero también puede ser debido a aspectos metodológicos. La mayoría de los estudios que analizan MPs utilizan la citometría de flujo como técnica de elección para su caracterización, ya que permite cuantificarlas y determinar su origen celular. Sin embargo, la citometría tiene algunos inconvenientes. A pesar de los avances tecnológicos de los nuevos citómetros de flujo, dado el pequeño tamaño de las MPs, puede ser muy difícil o imposible detectar aquellas MPs de menor tamaño, y por el mismo motivo, es una técnica difícil de estandarizar y reproducir entre laboratorios. Por ello, en nuestro estudio utilizamos un ensayo funcional que evalúa la actividad procoagulante de las MPs, con independencia de su tamaño u origen. Las características del ensayo, en formato de ELISA, la convierte en una técnica perfectamente reproducible intra e inter laboratorios, automatizable y por tanto, aplicable en la detección de MPs como biomarcador de riesgo aterotrombótico.

Existen estudios que demuestran que, en presencia de fármacos utilizados para la prevención o tratamiento de la ECV, o en presencia de tratamientos inmunosupresores, se pueden reducir los niveles de MPs. Por tanto, es lógico pensar que las MPs podrían tener una utilidad como biomarcadores de respuesta a los diferentes tratamientos. Si se consiguiera caracterizar mejor el mecanismo fisiopatológico de las MPs en la ECV, las propias MPs se podrían convertir en la diana terapéutica para reducir el riesgo CV.

Por tanto, los resultados de este segundo estudio de la presente tesis doctoral apoyan el papel de las MPs en la fisiopatología de la ECV en el LES y en un futuro podrían ayudar a identificar pacientes subsidiarios de algún tratamiento destinado a reducir el riesgo CV.

Al evaluar de forma conjunta los resultados de ambos estudios podemos sugerir que los haplotipos *PROCR* y las MPs procoagulantes colaboran en la fisiopatología de la ECV que afecta al SAF y al LES. Algunas teorías podrían explicar los vínculos entre ambos mecanismos fisiopatológicos. Por ejemplo, los haplotipos *PROCR* podrían alterar el EPCR presente en las MPs, favoreciendo o entorpeciendo su función anticoagulante. En el caso del SAF, también hemos comentado que algunos estudios apuntan a que los AAF podrían modificar la función hemostática de las MPs, a través de algún tipo de enlace con la  $\beta$ 2GPI presente en su membrana. Dado que las MPs también tienen la capacidad de transportar elementos pertenecientes al sistema anticoagulante de la PC y que se ha descrito una resistencia adquirida de la PC relacionada con los AAF, la predisposición protrombótica del SAF podría ser debida a un mal funcionamiento de la PC de estas MPs tras la unión de los AAF a la  $\beta$ 2GPI de su membrana. Este mal funcionamiento podría ser debido a una alteración en el EPCR de las propias MPs. Por tanto, podría existir un mecanismo etiopatogénico combinado en el SAF, en el cual, los haplotipos *PROCR* por un lado y los AAF por otro, modificarían la función anticoagulante del EPCR presente en las MPs, favoreciendo la ocurrencia de trombosis. Esta hipótesis podría suponer un punto de partida interesante para investigaciones futuras.

Esta tesis doctoral nos acerca un poco más a descubrir el misterio fisiopatológico de la ECV en el SAF y en el LES, pero sin duda, es necesario ampliar la investigación en este campo para llegar a su completa comprensión.



## **7. CONCLUSIONES**



### **7.1. Conclusiones del primer estudio.**

- 1.- No hubo diferencias en los niveles de sEPCR entre pacientes con SAF y controles.
- 2.- No hubo diferencias en los niveles de sEPCR en los pacientes con SAF, en función de la presencia o ausencia de trombosis arteriales o venosas.
- 3.- La frecuencia alélica de los haplotipos *PROCR* H1 y H3 fue similar en los pacientes con SAF y en los controles.
- 4.- El haplotipo *PROCR* H1 se comportó como un factor protector frente a la trombosis arterial en los pacientes con SAF.
- 5.- El haplotipo *PROCR* H3 no se relacionó con el riesgo de trombosis arterial en los pacientes con SAF.
- 6.- No se detectó relación entre los haplotipos del *PROCR* y la trombosis venosa en los pacientes con SAF.
- 7.- En los pacientes con SAF y en los controles los niveles de sEPCR fueron superiores en los portadores del haplotipo H3 con respecto a los portadores del haplotipo H1.



## **7.2. Conclusiones del segundo estudio.**

1.- La actividad procoagulante de las MPs no fue diferente entre los subgrupos de pacientes con LES: LES asociado a SAF, LES sin AAF y LES con AAF pero sin criterios de SAF.

2.- Las MPs procoagulantes se relacionaron con una mayor carga de arteriosclerosis en los pacientes con LES.

3.- En los pacientes con LES la carga de arteriosclerosis se asoció de forma independiente a la actividad procoagulante de las MPs, a la edad y al daño crónico medido con la escala SLICC/ACR.

4.- Las MPs procoagulantes se relacionaron con la trombosis arterial en los pacientes con LES.

5.- En los pacientes con LES la trombosis arterial se asoció de forma independiente a la actividad procoagulante de las MPs y a la edad.

6.- En los pacientes con LES, no se detectó relación entre la MPs procoagulantes y la trombosis venosa.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



1. Khamashta M, Taraborelli M, Sciascia S, Tincani A. Antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2016;30(1):133–48.
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera et al. R. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):295–306.
3. Bertias G, Ioannidis JPA, Boletis J, Bombardieri S, Cervera R, Dostal C, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2008 Feb;67(2):195–205. Available from: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2007.070367>
4. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2019 Sep;78(9):1151–9. Available from: <https://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2018-214819>
5. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, Aringer M, Bajema I, Boletis JN, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2019;78(6):736–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30926722>
6. Teixeira V, Tam L-S. Novel insights in systemic lupus erythematosus and atherosclerosis. *Front Med* [Internet]. 2018 Jan 29;4(January):262. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00262/full>
7. Ajeganova S, Hafström I, Frostegård J. Patients with SLE have higher risk of cardiovascular events and mortality in comparison with controls with the same levels of traditional risk factors and intima-media measures, which is related to accumulated disease damage and antiphospholipid syndrome: *Lupus Sci Med* [Internet]. 2021 Feb 5;8(1):e000454. Available from: <https://lupus.bmj.com/lookup/doi/10.1136/lupus-2020-000454>
8. Wu G-C, Liu H-R, Leng R-X, Li X-P, Li X-M, Pan H-F, et al. Subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus: A systemic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2016 Jan;15(1):22–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997215002037>
9. Croca S, Rahman A. Atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2017;31(3):364–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.berh.2017.09.012>
10. Shah PK, Lecis D. Inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Research* [Internet]. 2019 Aug 9;8:1402. Available from: <https://f1000research.com/articles/8-1402/v1>
11. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascula. *J Am Soc Echocardiogr* [Internet]. 2008

- Feb;21(2):93–111; quiz 189–90. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18261694>
12. O’Leary DH, Bots ML. Imaging of atherosclerosis: carotid intima-media thickness. *Eur Heart J* [Internet]. 2010 Jul;31(14):1682–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542989>
  13. Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, B. *Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2012;34(4):290–6. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128470>
  14. Carbonell M, Castelblanco E, Valldeperas X, Betriu À, Traveset A, Granado-Casas M, et al. Diabetic retinopathy is associated with the presence and burden of subclinical carotid atherosclerosis in type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2018 Dec 4;17(1):66. Available from:  
<https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-018-0706-z>
  15. Naqvi TZ, Lee M-S. Carotid Intima-Media Thickness and Plaque in Cardiovascular Risk Assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* [Internet]. 2014 Oct;7(10):1025–38. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1936878X14004392>
  16. Alonso N, Traveset A, Rubinat E, Ortega E, Alcubierre N, Sanahuja J, et al. Type 2 diabetes-associated carotid plaque burden is increased in patients with retinopathy compared to those without retinopathy. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2015 Dec 18;14(1):33. Available from:  
<http://www.cardiab.com/content/14/1/33>
  17. Imahori Y, Mathiesen EB, Leon DA, Hopstock LA, Hughes AD, Johnsen SH, et al. The contribution of obesity to carotid atherosclerotic plaque burden in a general population sample in Norway: The Tromsø Study. *Atherosclerosis* [Internet]. 2018 Jun;273:15–20. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915018301990>
  18. Cervera R, Piette J-C, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2002 Apr;46(4):1019–27. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/art.10187>
  19. Cervera R, Bucciarelli S, Plasín MA, Gómez-Puerta JA, Plaza J, Pons-Estel G, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): Descriptive analysis of a series of 280 patients from the “CAPS Registry.” *J Autoimmun* [Internet]. 2009 May;32(3–4):240–5. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841109000353>
  20. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Ceberio-Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2015 Jun;74(6):1011–8. Available from:  
<https://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2013-204838>

21. Rodríguez-Pintó I, Moitinho M, Santacreu I, Shoenfeld Y, Erkan D, Espinosa G, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): Descriptive analysis of 500 patients from the International CAPS Registry. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2016 Dec;15(12):1120–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997216302051>
22. Arachchillage DRJ, Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* [Internet]. 2017 Jul;178(2):181–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.14632>
23. Zuo Y, Shi H, Li C, Knight JS. Antiphospholipid syndrome: a clinical perspective. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2020 Apr 20;133(8):929–40. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/CM9.0000000000000705>
24. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(6):230.
25. Castro-Marrero J, Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Genetic risk factors of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2009;147(3):289–96.
26. Sebastiani GD, Iuliano A, Cantarini L, Galeazzi M. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: An update. *Autoimmun Rev*. 2016;15(5):433–9.
27. Reverter J, Tàssies D. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: Association with clinical manifestations. In: *Antiphospholipid Syndrome in Systemic Autoimmune Diseases*. 1st ed. Elsevier; 2009. p. 91–103.
28. Ortiz-Fernández L, Sawalha AH. Genetics of Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2019 Dec 5;21(12):65. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11926-019-0869-y>
29. Lopez-Pedraza C, Barbarroja N, Patiño-Trives AM, Collantes E, Aguirre MA, Perez-Sanchez C. New Biomarkers for Atherothrombosis in Antiphospholipid Syndrome: Genomics and Epigenetics Approaches. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Apr 16;10:764. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00764/full>
30. Barinotti A, Radin M, Cecchi I, Foddai SG, Rubini E, Roccatello D, et al. Genetic Factors in Antiphospholipid Syndrome: Preliminary Experience with Whole Exome Sequencing. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Dec 15;21(24):9551. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9551>
31. Tàssies D, Espinosa G, Muñoz-Rodríguez FJ, Freire C, Cervera R, Monteagudo et al. J. The 4G/5G polymorphism of the type 1 plasminogen activator inhibitor gene and thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 2000;43(10):2349–58.
32. Jiménez S, Tàssies D, Espinosa G, García-Criado Á, Plaza J, Monteagudo et al. J. Double heterozygosity polymorphisms for platelet glycoproteins Ia/IIa and IIb/IIIa increases arterial thrombosis and arteriosclerosis in patients with the antiphospholipid syndrome or with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(6):835–40.
33. Reverter J-C, Tàssies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, et al. Hypercoagulable State in Patients With Antiphospholipid Syndrome Is Related to High Induced Tissue Factor Expression on Monocytes and to Low Free

- Protein S. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1996 Nov;16(11):1319–26. Available from:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.16.11.1319>
34. Ginsberg JS, Demers C, Brill-Edwards P, Bona R, Johnston M, Wong A, et al. Acquired free protein S deficiency is associated with antiphospholipid antibodies and increased thrombin generation in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* [Internet]. 1995 Apr;98(4):379–83. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934399803179>
  35. Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, Yasuda S, Sakai Y, Furusaki A, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* [Internet]. 2004 Nov 6;16(11):1633–41. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxh166>
  36. López-Pedrerá C, Buendía P, José Cuadrado M, Siendones E, Angeles Aguirre M, Barbarroja N, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF- $\kappa$ B/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK path. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2006 Jan;54(1):301–11. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/art.21549>
  37. Motoki Y, Nojima J, Yanagihara M, Tsuneoka H, Matsui T, Yamamoto M, et al. Anti-phospholipid antibodies contribute to arteriosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus through induction of tissue factor expression and cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Res* [Internet]. 2012 Oct;130(4):667–73. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004938481100644X>
  38. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Ritter S, Pedrosa DG, Strand D, Graf C, et al. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis. *Blood* [Internet]. 2019 Oct 3;134(14):1119–31. Available from:  
<https://ashpublications.org/blood/article/134/14/1119/374910/Tissue-factor-pathway-inhibitor-primers-monocytes>
  39. Jiménez S, García-Criado M, Tàssies D, Reverter J, Cervera R, Gilabert et al. M. Preclinical vascular disease in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatology(Oxford)*. 2005;44(6):756–61.
  40. Thompson T, Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Kao A, Fitzgerald SG, Shook et al. B. Progression of carotid intima-media thickness and plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):835–42.
  41. Kao AH, Lertratanakul A, Elliott JR, Sattar A, Santelices L, Shaw P, et al. Relation of Carotid Intima-Media Thickness and Plaque With Incident Cardiovascular Events in Women With Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Cardiol* [Internet]. 2013 Oct;112(7):1025–32. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914913012381>
  42. Kay SD, Poulsen MK, Diederichsen ACP, Voss A. Coronary, Carotid, and Lower-extremity Atherosclerosis and Their Interrelationship in Danish Patients

- with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2016 Feb;43(2):315–22. Available from: <http://www.jrheum.org/lookup/doi/10.3899/jrheum.150488>
43. Svensson C, Eriksson P, Zachrisson H, Sjöwall C. High-Frequency Ultrasound of Multiple Arterial Areas Reveals Increased Intima Media Thickness, Vessel Wall Appearance, and Atherosclerotic Plaques in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Med* [Internet]. 2020 Oct 9;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2020.581336/full>
  44. Tselios K, Sheane BJ, Gladman DD, Urowitz MB. Optimal Monitoring For Coronary Heart Disease Risk in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review. *J Rheumatol* [Internet]. 2016 Jan;43(1):54–65. Available from: <http://www.jrheum.org/lookup/doi/10.3899/jrheum.150460>
  45. Urowitz MB, Bookman AAM, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1976;60(2):221–5.
  46. Nikpour M, Urowitz MB, Gladman DD. Premature atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31(2):329–54.
  47. Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *J Rheumatol* [Internet]. 1995 Jul;22(7):1259–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562755>
  48. Magder LS, Petri M. Incidence of and Risk Factors for Adverse Cardiovascular Events Among Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2012 Oct 15;176(8):708–19. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kws130>
  49. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific Incidence Rates of Myocardial Infarction and Angina in Women with Systemic Lupus Erythematosus: Comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1997 Mar 1;145(5):408–15. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.aje.a009122>
  50. Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg MC. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* [Internet]. 1992 Nov;93(5):513–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000293439290578Y>
  51. Maksimowicz-McKinnon K, Selzer F, Manzi S, Kip KE, Mulukutla SR, Marroquin OC, et al. Poor 1-Year Outcomes After Percutaneous Coronary Interventions in Systemic Lupus Erythematosus. *Circ Cardiovasc Interv* [Internet]. 2008 Dec;1(3):201–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.108.788745>
  52. Tektonidou MG, Wang Z, Ward MM. Brief Report: Trends in Hospitalizations Due to Acute Coronary Syndromes and Stroke in Patients With Systemic Lupus Erythematosus, 1996 to 2012. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2016 Nov;68(11):2680–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.39758>



53. Arkema E V., Svenungsson E, Von Euler M, Sjöwall C, Simard JF. Stroke in systemic lupus erythematosus: a Swedish population-based cohort study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2017 Sep;76(9):1544–9. Available from: <https://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2016-210973>
54. Wiseman SJ, Bastin ME, Jardine CL, Barclay G, Hamilton IF, Sandeman E, et al. Cerebral Small Vessel Disease Burden Is Increased in Systemic Lupus Erythematosus. *Stroke* [Internet]. 2016 Nov;47(11):2722–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.116.014330>
55. Chuang Y-W, Yu M-C, Lin C-L, Yu T-M, Shu K-H, Kao C-H. Risk of Peripheral Arterial Occlusive Disease in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015 Nov;94(46):e2121. Available from: <https://journals.lww.com/00005792-201511170-00035>
56. Hassan AA, Habib HM, Eissa AA. Peripheral arterial disease in patients with systemic lupus erythematosus: a prospective controlled study. *Int J Rheum Dis* [Internet]. 2013 Jun;16(3):319–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1756-185x.12025>
57. Erdozain JG, Villar I, Nieto J, Ruiz-Irastorza G. Peripheral Arterial Disease in Systemic Lupus Erythematosus: Prevalence and Risk Factors. *J Rheumatol* [Internet]. 2014 Feb;41(2):310–7. Available from: <http://www.jrheum.org/lookup/doi/10.3899/jrheum.130817>
58. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, Berger et al. R Du. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001;44(10):2331–7.
59. Narshi CB, Giles IP, Rahman A. The endothelium: An interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus*. 2011;20(1):5–13.
60. Schoenfeld SR, Kasturi S, Costenbader KH. The epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease among patients with SLE: A systematic review. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 2013;43(1):77–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.12.002>
61. Sherer Y, Zinger H, Shoenfeld Y. Atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2010;43(1):98–102.
62. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol* [Internet]. 2019 Jan;73(1):22–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S091450871830145X>
63. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* [Internet]. 2019 Feb 28;133(9):906–18. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/133/9/906/260659/Thromboinflammation-challenges-of-therapeutically>
64. Cunningham M, Marks N, Barnado A, Wirth JR, Gilkeson G, Markiewicz M. Are Microparticles the Missing Link between Thrombosis and Autoimmune Diseases? Involvement in Selected Rheumatologic Diseases. Vol. 40, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2014. p. 675–81.

65. Niccolai E, Emmi G, Squatrito D, Silvestri E, Emmi L, Amedei et al. A. Microparticles: Bridging the gap between autoimmunity and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(4):413–22.
66. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2010 Jan 1;6(1):21–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrrheum.2009.229>
67. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: Friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):4–9.
68. Voukalis C, Shantsila E, Lip GYH. Microparticles and cardiovascular diseases. *Ann Med* [Internet]. 2019 May 19;51(3–4):193–223. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07853890.2019.1609076>
69. Connor WE. The Chemistry of Blood Coagulation. *Arch Intern Med* [Internet]. 1958 Oct 1;102(4):681–2. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.1958.00260210167023>
70. Douglas S. COAGULATION HISTORY, OXFORD 1951-53. *Br J Haematol* [Internet]. 1999 Oct;107(1):22–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.1999.01689.x>
71. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care* [Internet]. 2009 Feb;19(1):3–10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x>
72. Riddel JP, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of Blood Coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs* [Internet]. 2007 May 29;24(3):123–31. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1043454206298693>
73. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* [Internet]. 2013 Jan;93(1):327–58. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00016.2011>
74. MACFARLANE RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* [Internet]. 1964 May;202(4931):498–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/202498a0>
75. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* (80- ) [Internet]. 1964 Sep 18;145(3638):1310–2. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.145.3638.1310>
76. Hoffman M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *J Thromb Thrombolysis* [Internet]. 2003 Aug;16(1/2):17–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:THRO.0000014588.95061.28>
77. McMichael M. New Models of Hemostasis. *Top Companion Anim Med* [Internet]. 2012 May;27(2):40–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1938973612000219>
78. Monroe DM, Hoffman M. What Does It Take to Make the Perfect Clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2006 Jan;26(1):41–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83>

79. Hoffman M, Monroe D. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost* [Internet]. 2001 Dec 12;85(06):958–65. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1615947>
80. Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin Activates Factor XI on Activated Platelets in the Absence of Factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1999 Jan;19(1):170–7. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.19.1.170>
81. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2008 Feb;38(1):15–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050207001826>
82. Amiral J, Seghatchian J. Revisiting the activated protein C-protein S-thrombomodulin ternary pathway: Impact of new understanding on its laboratory investigation. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2019 Aug;58(4):538–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050219301004>
83. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(19):10212–6.
84. Gandrille S. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica* [Internet]. 2008 Jun 1;93(6):812–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515879>
85. Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood*. 2004;103(4):1311–8.
86. Navarro S, Medina P, Mira Y, Estellés A, Villa P, Ferrando F, et al. Haplotypes of the EPCR gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation. *Haematologica*. 2008;93(6):885–91.
87. Chen X, Tian L, Li M, Jin W, Zhang H, Zheng C. Relationship between endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G polymorphisms and deep venous thrombosis. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(1):72–5.
88. Yin G, Jin X, Ming H, Zheng X, Zhang D. Endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G polymorphism is associated with venous thromboembolism. *Exp Ther Med*. 2012;3(6):989–92.
89. Liaw P, Neuenschwander P, Smirnov M, Esmon C. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem*. 2000;275(8):5447–52.
90. Lopez-Sagaseta J, Montes R, Puy C, Diez N, Fukudome K, Hermida J. Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2007;5(9):1817–24. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17723119](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17723119)
91. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P,

- Esmon CT. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood*. 1998;91(2):725–7.
92. Sesin CA, Yin X, Esmon CT, Buyon JP, Clancy RM. Shedding of endothelial protein C receptor contributes to vasculopathy and renal injury in lupus: In vivo and in vitro evidence. *Kidney Int*. 2005;68(1):110–20.
  93. Yalçındağ FN, Batioğlu F, Özdemir Ö, Cansızoğlu E, Eğin Y, Akar N. Soluble endothelial protein C receptor levels in Behçet patients with and without ocular involvement. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. 2008 Nov 5;246(11):1603–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00417-008-0873-9>
  94. Simmonds R, Lane D. Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains. *Blood*. 1999;94(2):632–41.
  95. Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, De Visser MCH, Bertina RM. Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2004;2(8):1305–10.
  96. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Woodhams B, Mira Y, et al. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost*. 2004;91(5):905–11.
  97. Qu D, Wang Y, Song Y, Esmon NL, Esmon CT. The Ser219->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *J Thromb Haemost*. 2006;4(1):229–35.
  98. Medina P, Navarro S, Bonet E, Martos L, Estellés A, Bertina RM, et al. Functional analysis of two haplotypes of the human endothelial protein C receptor gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(3):684–90.
  99. Zoheir N, Eldanasouri N, Abdel-Aal AA, Hosny KA, Abdel-Ghany WM. Endothelial cell protein C receptor gene 6936A/G and 4678G/C polymorphisms as risk factors for deep venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016;27(3):259–65.
  100. Ulu A, Gunal D, Tiras S, Eğin Y, Deda G, Akar N. EPCR gene A3 haplotype and elevated soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels in Turkish pediatric stroke patients. *Thromb Res*. 2007;120(1):47–52.
  101. Medina P, Navarro S, Corral J, Zorio E, Roldán V, Estellés A, et al. Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction. *Haematologica*. 2008;93(9):1358–63.
  102. Navarro S, Bonet E, Medina P, Martos L, Ricart JM, Vayá A, et al. Haplotypes of the endothelial protein C receptor gene and Behçet's disease. *Thromb Res*. 2012;129(4):459–64.
  103. Anastasiou G, Politou M, Rallidis L, Grouzi E, Karakitsos P, Merkouri E, et al.

- Endothelial protein C receptor gene variants and risk of thrombosis. *Clin Appl Thromb*. 2016;22(2):199–204.
104. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Bertina RM, España F. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost*. 2005;94(2):389–94.
  105. Jiang J, Liu K, Zou J, Ma H, Yang H, Zhang X, et al. Associations between polymorphisms in coagulation-related genes and venous thromboembolism: A meta-analysis with trial sequential analysis. *Medicine(Baltimore)*. 2017;96(13):e6537.
  106. Dennis J, Johnson CY, Adediran AS, De Andrade M, Heit JA, Morange PE, et al. The endothelial protein C receptor (PROCR) Ser219Gly variant and risk of common thrombotic disorders: A HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Blood*. 2012;119(10):2392–400.
  107. Li YY, Wu JJ, Yang XX, Geng HY, Gong G, Kim HJ. EPCR gene Ser219Gly polymorphism and venous thromboembolism: A meta-analysis of 9,494 subjects. *Front Physiol*. 2017;8(MAY):1–10.
  108. Saposnik B, Lesteven E, Lokajczyk A, Esmon CT, Aiach M, Gandrille S. Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene PROCR and generates a novel soluble form of EPCR in plasma. *Blood*. 2008;111(7):3442–51.
  109. Howson JMM, Zhao W, Barnes DR, Ho WK, Young R, Paul DS, et al. Fifteen new risk loci for coronary artery disease highlight arterial-wall-specific mechanisms. *Nat Genet*. 2017;49(7):1113–9.
  110. Yamagishi K, Cushman M, Heckbert SR, Tsai MY, Folsom AR. Lack of association of soluble endothelial protein C receptor and PROCR 6936A/G polymorphism with the risk of venous thromboembolism in a prospective study. *Br J Haematol*. 2009;145(2):221–6.
  111. Ireland H, Konstantoulas CJ, Cooper JA, Hawe E, Humphries SE, Mather H, et al. EPCR Ser219Gly: Elevated sEPCR, prothrombin F1+2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding in vitro. *Atherosclerosis*. 2005;183(2):283–92.
  112. Kallel C, Cohen W, Saut N, Blankenberg S, Schnabel R, Rupprecht HJ, et al. Association of soluble endothelial protein C receptor plasma levels and PROCR rs867186 with cardiovascular risk factors and cardiovascular events in coronary artery disease patients: the Athero Gene study. *BMC Med Genet*. 2012;13:103.
  113. Świtońska M, Słomka A, Sinkiewicz W, Zekanowska E. Tissue-factor-bearing microparticles (MPs-TF) in patients with acute ischaemic stroke: The influence of stroke treatment on MPs-TF generation. *Eur J Neurol*. 2015;22(2):395–401.
  114. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Gavasso S, Woodhams B, Simioni P. Evaluation of a procoagulant phospholipid functional assay as a routine test for measuring circulating microparticle activity. *Blood Coagul Fibrinolysis [Internet]*. 2014 Jul;25(5):534–7. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=>

00001721-201407000-00023

115. Morel O, Morel N, Freyssinet J-M, Toti F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: A checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* [Internet]. 2008 Jan 7;19(1):9–23. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537100701817232>
116. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* [Internet]. 2004 Nov 15;104(10):3190–7. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/104/10/3190/18713/Hematopoietic-cell-derived-microparticle-tissue>
117. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1687–93.
118. Van Der Meijden PEJ, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renné T, ten Cate H, Spronk HMH. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2012 Jul;10(7):1355–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2012.04758.x>
119. Bucciarelli P, Martinelli I, Artoni A, Passamonti SM, Previtali E, Merati et al. G. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism. *Thromb Res* [Internet]. 2012;129(5):591–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.08.020>
120. Cui C, Wang G, Yang S, Huang S, Qiao R, Cui W. Tissue Factor-bearing MPs and the risk of venous thrombosis in cancer patients: A meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 26;8(1):1675. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19889-8>
121. Wang M, Fu Y, Xu L, Xiao L, Yue Y, Liu et al. S. Diagnostic value of platelet-derived microparticles in pulmonary thromboembolism: A population-based study. *Exp Ther Med*. 2018;16(4):3099–106.
122. Wang B, Cai W, Zhang Z, Zhang H, Tang K, Zhang Q, et al. Circulating microparticles in patients after ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Rev Neurosci* [Internet]. 2018 May 11;32(1):1–10. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/revneuro.ahead-of-print/revneuro-2017-0105/revneuro-2017-0105.xml>
123. El-Gamal H, Parray AS, Mir FA, Shuaib A, Agouni A. Circulating microparticles as biomarkers of stroke: A focus on the value of endothelial- and platelet-derived microparticles. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 Oct 25;234(10):16739–54. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.28499>
124. Wang Z, Cai W, Hu S, Xia Y, Wang Y, Zhang et al. Q. A meta-analysis of circulating microvesicles in patients with myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2017;109(2):156–64. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20170102>
125. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the

- analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* [Internet]. 2004 Dec;53(4):210–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647627>
126. Dignat-George F, Boulanger CM. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2011 Jan;31(1):27–33. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.110.218123>
127. Zarà M, Guidetti GF, Camera M, Canobbio I, Amadio P, Torti M, et al. Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 11;20(11):2840. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2840>
128. Livaja Koshiar R, Somajo S, Norström E, Dahlbäck B. Erythrocyte-Derived Microparticles Supporting Activated Protein C-Mediated Regulation of Blood Coagulation. Miyata T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Aug 19;9(8):e104200. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104200>
129. Iba T, Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. *J Intensive Care* [Internet]. 2018 Dec 19;6(1):68. Available from: <https://jintensivecare.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40560-018-0340-6>
130. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui et al. A. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res*. 2011;109(5):593–606.
131. Chironi G, Simon A, Hugel B, Pino M Del, Gariépy J, Freyssinet et al. JM. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2775–80.
132. Suades R, Padró T, Alonso R, Mata P, Badimon L. High levels of TSP1+/CD142+ platelet-derived microparticles characterise young patients with high cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis. *Thromb Haemost* [Internet]. 2015 Nov 30;114(12):1310–21. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH15-04-0325>
133. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo et al. L. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost*. 2006;95(9):94–9.
134. McCarthy EM, Wilkinson FL, Parker B, Alexander MY. Endothelial microparticles: Pathogenic or passive players in endothelial dysfunction in autoimmune rheumatic diseases? *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2016;86:71–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.016>
135. Sellam J, Proulle V, Jüngel A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg et al. J-E. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2009;11(5):R156. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2833>
136. Nielsen CT, Østergaard O, Johnsen C, Jacobsen S, Heegaard NHH. Distinct

- features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63(10):3067–77.
137. Nielsen CT, Østergaard O, Rekvig OP, Sturfelt G, Jacobsen S, Heegaard NHH. Galectin-3 binding protein links circulating microparticles with electron dense glomerular deposits in lupus nephritis. *Lupus.* 2015;24(11):1150–60.
138. López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, Caminal-Montero L, Suárez A. Circulating microparticle subpopulations in systemic lupus erythematosus are affected by disease activity. *Int J Cardiol* [Internet]. 2017;236:138–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.02.107>
139. Nielsen CT, Østergaard O, Rasmussen NS, Jacobsen S, Heegaard NHH. A review of studies of the proteomes of circulating microparticles: key roles for galectin-3-binding protein-expressing microparticles in vascular diseases and systemic lupus erythematosus. *Clin Proteomics* [Internet]. 2017 Dec 8;14(1):11. Available from: <http://clinicalproteomicsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12014-017-9146-0>
140. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* [Internet]. 2004 Dec 6;91(04):667–73. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH03-07-0487>
141. Combes V, Simon A-C, Grau G-E, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 Jul 1;104(1):93–102. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/4985>
142. Jy W, Tiede M, Bidot CJ, Horstman LL, Jimenez JJ, Chirinos J, et al. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* [Internet]. 2007 Jan;121(3):319–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384807002046>
143. Campello E, Radu CM, Spiezia L, Simioni P. Modulating thrombotic diathesis in hereditary thrombophilia and antiphospholipid antibody syndrome: A role for circulating microparticles? *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(7):934–43.
144. Liestøl S, Sandset PM, Mowinckel MC, Wisløff F. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2007;5(11):2204–10.
145. Muñoz-Rodríguez F-J, Reverter J-C, Font J, Tàssies D, Espinosa G, Cervera R, et al. Clinical significance of acquired activated protein C resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2002;11(11):730–5. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0961203302lu2560a>
146. Thulin Å, Christersson C, Alfredsson J, Siegbahn A. Circulating cell-derived microparticles as biomarkers in cardiovascular disease. *Biomark Med* [Internet]. 2016;10(9):1009–22. Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm-2016-0035>



147. Montoro-García S, Orenes-Piñero E, Marín F, Valdés M, Lip GY, Shantsila E. Pharmacological modulation of microparticle release: new strategies for the management of atherothrombotic vascular disorders. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2012 Feb 1;18(6):840–9. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=18&issue=6&spage=840>
148. Suades R, Padró T, Alonso R, Mata P, Badimon L. Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost* [Internet]. 2013 Dec 4;110(08):366–77. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH13-03-0238>
149. Bulut D, Becker V, Mügge A. Acetylsalicylate reduces endothelial and platelet-derived microparticles in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2011 Apr;89(4):239–44. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/y11-013>
150. Parker B, Al-Husain A, Pemberton P, Yates AP, Ho P, Gorodkin et al. R. Suppression of inflammation reduces endothelial microparticles in active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014 Jun;73(6):1144–50. Available from: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2012-203028>
151. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Effects of Losartan and Simvastatin on Monocyte-Derived Microparticles in Hypertensive Patients With and Without Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Appl Thromb* [Internet]. 2004 Apr 30;10(2):133–41. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/107602960401000203>
152. Simioni P, Morboeuf O, Tognin G, Gavasso S, Tormene D, Woodhams B, et al. Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels and venous thromboembolism in carriers of two dysfunctional protein C variants. *Thromb Res*. 2006;117(5):523–8.