

Biomarcadores y blancos moleculares del complemento en el diagnóstico de las microangiopatías trombóticas

► Natalia Mogollón Molina^{1a}, Sabrina Rotondo^{2a}, Célia Dos Santos^{3b*}, Analía Sánchez-Luceros^{4ab}

¹ Bioquímica.

² Bioquímica, Especialista en Inmunología.

³ PhD, Especialista en Biología Celular y Molecular.

⁴ Médica, Hematóloga, Dra. en Medicina Interna.

^a Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^b Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, IMEX-CONICET-ANM, J.A. Pacheco de Melo 3081 (C1425AUM), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

El sistema del complemento juega un papel central en la inmunidad innata, es una línea de defensa contra patógenos y participa en la homeostasis. La activación anormal del complemento contribuye al desarrollo de patologías de variable severidad, tanto inmunológicas y hematológicas como renales. Entre ellas, las microangiopatías trombóticas (MAT) representan un grupo de enfermedades raras con manifestaciones clínicas comunes caracterizadas por anemia hemolítica no inmune, trombocitopenia y daño de órgano(s) blanco. Si bien la clasificación de las MAT sigue siendo desafiante y no ha sido internacionalmente estandarizada, la descripción de entidades asociadas a anomalías del complemento fue comprobada con la eficiencia de la terapia anticomplemento en los pacientes. Las herramientas de diagnóstico desarrolladas en las últimas décadas son esenciales actualmente para diferenciar las MAT más características del grupo; esto es, la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) y el síndrome urémico hemolítico (SUH). En el presente trabajo se presenta una revisión del funcionamiento del sistema del complemento en condiciones fisiológicas, para poder explicar luego cuáles son las alteraciones del sistema implicadas en el desarrollo de las MAT y describir las herramientas disponibles para detectarlas en el laboratorio.

Palabras clave: Microangiopatías trombóticas; Complemento; Síndrome urémico hemolítico atípico; Diagnóstico; Variante genética; Biomarcadores

Complement biomarkers and molecular targets in the diagnosis of thrombotic microangiopathies

Abstract

The complement system plays a crucial role in the innate immune response, being the first-line defense against pathogens and regulating homeostasis. Uncontrolled complement activation can cause immunologic, hematologic as well as renal syndromes of variable severity. Among them, thrombotic microangiopathies (TMA) represent a group of rare diseases characterised by similar clinical manifestations such as microangiopathic hemolytic anemia (MAHA), peripheral thrombocytopenia and organ injury. Although TMA classification is still challenging and no international consensus has been reached, complement-associated disorders have been described thanks to the efficiency of anti-complement therapy in patients. Diagnostic tools developed in the last decades are essential to differentiate the two most well characterized

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

TMA: thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and hemolytic uremic syndrome (HUS). This review will describe how the complement system works in physiological conditions in order to explain how complement abnormalities are involved in TMA, and finally how to detect those anomalies using laboratory tests.

Keywords: *Thrombotic microangiopathies; Complement; Atypical hemolytic uremic syndrome; Diagnosis; Genetic variant; Biomarkers*

Biomarcadores e alvos moleculares do complemento no diagnóstico das microangiopatias trombóticas

Resumo

O sistema do complemento desempenha um papel central na imunidade inata, sendo uma linha de defesa contra patógenos e participando da homeostase. A ativação anormal do complemento contribui para o desenvolvimento de patologias de gravidade variável, como imunológicas, hematológicas e renais. Entre elas, as microangiopatias trombóticas (MAT) representam um grupo de doenças raras com manifestações clínicas comuns caracterizadas por anemia hemolítica não imune, trombocitopenia e lesão de órgão(s) alvo. Embora a classificação das MAT continue sendo desafiadora e não tenha sido padronizada internacionalmente, a descrição de entidades associadas a anomalias do complemento foi comprovada com a eficiência da terapia anticomplemento nos pacientes. As ferramentas de diagnóstico desenvolvidas nas últimas décadas são atualmente essenciais para diferenciar as MAT mais características do grupo, que são a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) e a síndrome hemolítica urêmica atípica (SHU). Neste trabalho, é apresentada uma revisão do funcionamento do sistema de complemento em condições fisiológicas, a fim de explicar posteriormente quais são as alterações do sistema compreendidas no desenvolvimento das MAT, e descrever as ferramentas disponíveis para detectá-las em laboratório.

Palavras-chave: *Microangiopatias trombóticas; Complemento; Síndrome hemolítica urêmica atípica; Diagnóstico; Variante genética; Biomarcadores*

Introducción

El sistema del complemento es una herramienta esencial de la respuesta inmune innata y actúa como un puente entre la inmunidad innata y la adquirida. Consta de varias proteínas que se sintetizan principalmente en el hígado. Se encuentran en el plasma como precursores inactivos (zimógenos) y en las superficies celulares (1). En las reacciones inflamatorias, los factores del complemento que se encuentran en el plasma sanguíneo se dirigen hacia los tejidos infectados y allí ejercen su acción. Las tres funciones principales del complemento incluyen opsonización, quimiotaxis y formación del complejo de ataque a membrana. Durante la opsonización, ciertos factores del complemento se depositan sobre superficies celulares marcándolas, para que sean el blanco de células fagocíticas. La quimiotaxis implica que los distintos factores del complemento atraen células inmunes para que los agentes patógenos puedan ser capturados y fagocitados. El ataque de membrana consiste en el depósito de otros factores del complemento sobre las membranas celulares que provocan la formación de poros que llevan a la lisis del agente patógeno. Adicionalmente, algunos elementos del complemento participan en la señalización

celular, favoreciendo la supervivencia de la célula. La reducción de expresión de otras proteínas del complemento en la superficie celular contribuye al aclaramiento de células apoptóticas, participando de esta manera en la homeostasis (2).

Las anomalías del complemento fueron asociadas en las últimas décadas a varias enfermedades hematológicas y renales, multiplicando así los trabajos de investigación para tratar de describir los mecanismos involucrados en cada enfermedad. Al conocer la fisiopatología, la búsqueda de herramientas de diagnóstico y biomarcadores puede ser orientada a blancos moleculares, lo que permite asistir a los pacientes de manera más eficaz y rápida. Esta revisión está dirigida al rol del complemento en la fisiopatología de las microangiopatías trombóticas (MAT). Estas enfermedades raras presentan formas heterogéneas, algunas de las cuales se caracterizan por su asociación con la activación del sistema del complemento, generalmente debida a una falla en los mecanismos de su regulación. Se revisarán cuáles son los diferentes componentes del sistema del complemento relevantes a la investigación y estudio de MAT y otras patologías con las que se debe realizar un diagnóstico diferencial, como así también la metodología disponible para determinar anomalías patológicas significativas en un contexto clínico.

Vías del complemento

El sistema del complemento puede activarse a través de tres vías (Fig. 1): la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa, cuyo componente central y común es C3. La activación resulta del clivaje de la proteína C3 inactiva, en los fragmentos funcionales C3a, un mediador inflamatorio que permanece soluble en la circulación y C3b, una opsonina que permite la formación de la convertasa C3 y que se une de manera covalente a la superficie de patógenos o células destinados a su eliminación.

El inicio de la vía clásica y la vía de las lectinas ocurre mediante moléculas de reconocimiento claramente identificadas que son C1, MBL (acrónimo: *mannose-binding lectin*) y ficolinas respectivamente. Éstas, al interactuar con las superficies correspondientes, conducen a su propio cambio conformacional, que simultáneamente induce la activación de enzimas que escinden otras moléculas subsiguientes en la cascada y de esta manera se generan los complejos enzimáticos esenciales del complemento.

Al contrario, el inicio de la vía alternativa no implica la intervención de moléculas de reconocimiento, sino que la vía está constitutivamente activada (Fig. 1).

Vía clásica y vía de las lectinas

La activación de la vía clásica comienza con la unión de complejos de inmunoglobulinas (IgG e IgM) a C1q, que es una subunidad del componente C1 (Fig. 1). Esta unión activa a la subunidad C1r por autoclivaje. C1r luego escinde y activa C1s (3). C1s produce un clivaje de C2 y C4 dando origen a C4bC2b (anteriormente denominado C4bC2a). Este es un complejo enzimático que escinde a C3 en C3a y C3b (4). C3a (anafilatoxina) actúa como un reclutador de células inflamatorias, mientras C3b se une al complejo C4bC2b para formar la convertasa C5 (C4bC2bC3b) (Fig. 2). La convertasa C5 escinde una molécula de C5 en una potente anafilatoxina C5a y un fragmento bioactivo C5b. C5b interactúa con C6, C7, C8 y múltiples copias de C9 para formar el complejo de ataque a la

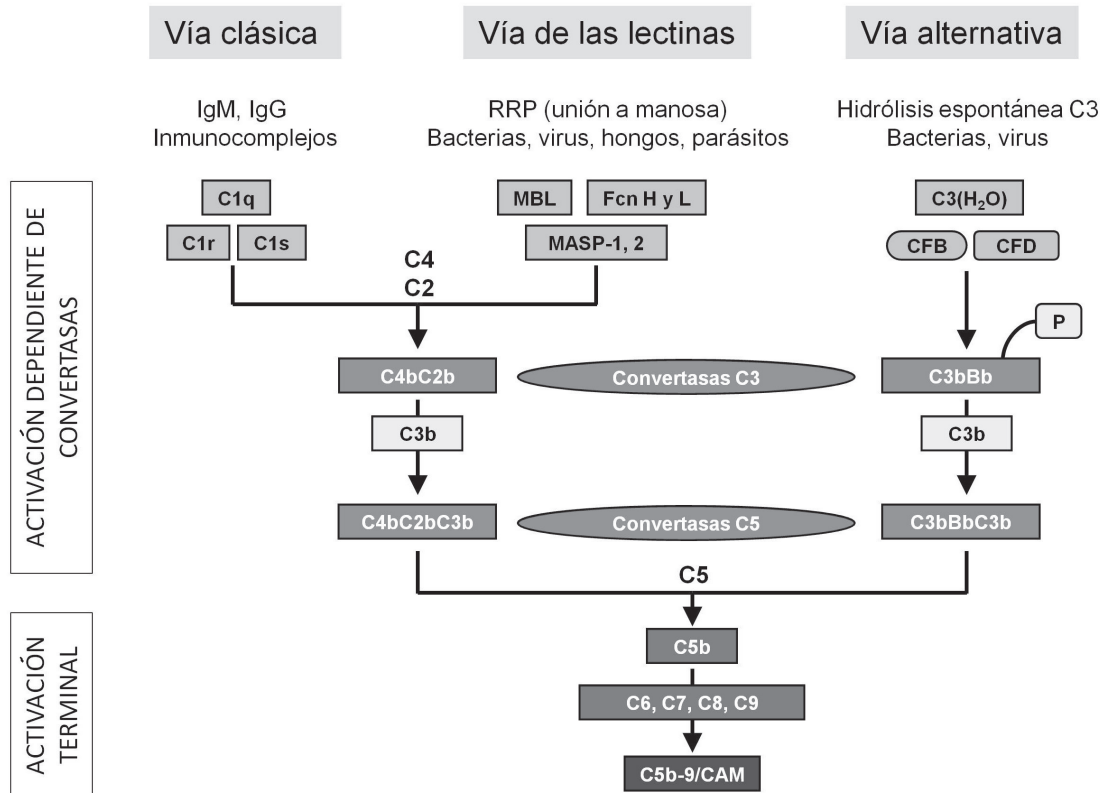


Figura 1. Las tres vías del sistema del complemento.

La activación de la vía clásica, con la unión de complejos de inmunoglobulinas (IgG e IgM) a C1q, activa las subunidades C1r y C1s. La activación de la vía de las lectinas utiliza miembros de la familia de las lectinas de unión a manosa (MBL) y ficolinas (H y L) como receptores de reconocimiento de patrones que activan las serinoproteasas MASP-1 y MASP-2. La vía clásica y de las lectinas permiten escindir C2 y C4 para formar la convertasa C3. La activación de la vía alterna convierte C3 en una forma bioactiva C3(H₂O) en la fase fluida, la cual después de su unión al factor B (CFB) y la intervención del factor D (CFD) genera la C3 convertasa. La unión de una proteína sérica llamada properdina (P) estabiliza la C3 convertasa, prolongando su vida media. Las convertasas C3 generan C3b al escindir el C3 libre para la formación de las convertasas C5. El componente C5 escindido por las convertasas genera C5b el cual se fija a la membrana de la célula blanco para continuar con el desenlace común de las tres vías (vía terminal), y la formación del CAM.

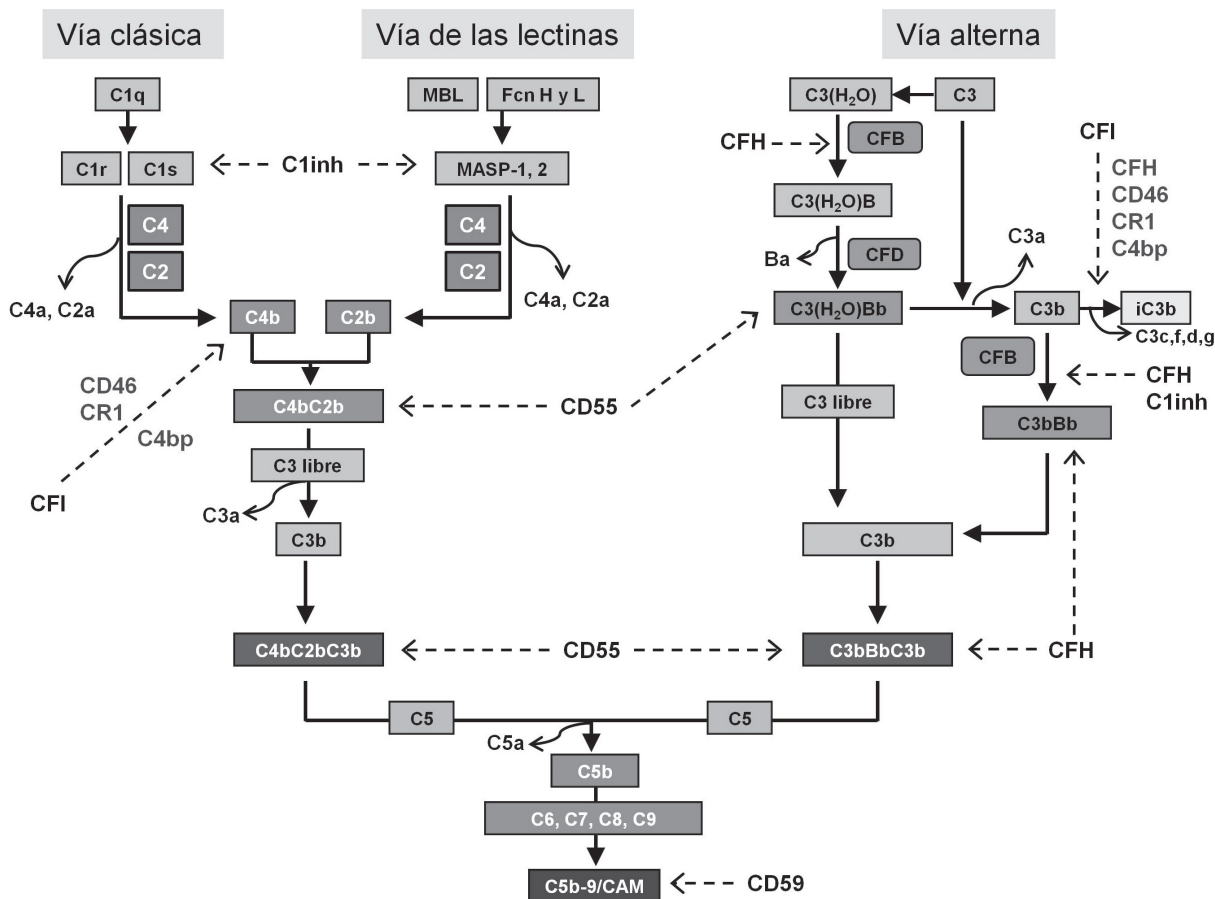


Figura 2. Efectores y reguladores de las vías de activación del complemento.

El factor H (CFH) puede inhibir la formación de la convertasa C3 al competir con el factor B (CFB) por el sitio de unión a C3b. Acelera la descomposición de la C3 convertasa y actúa como cofactor para la escisión mediada por factor I (CFI) de C3b. Eso resulta en la formación de la molécula enzimáticamente inactiva iC3b y en la liberación de C3f. C4 binding protein (C4bp) actúa como cofactor de CFI en la inactivación proteolítica de C4b evitando la formación de la convertasa C3 clásica y en la escisión de C3b en la fase fluida. CD46 es un cofactor de CFI en el clivaje proteolítico e inactivación de C3b en la vía alternativa y a C4b en la vía clásica y de las lectinas. El receptor tipo 1 de complemento (CR1) se une a C3b, C4b y en menor medida, iC3b. CR1, cofactor de CFI, induce el clivaje de iC3b, generando C3c y C3f,d,g. CD55 o DAF (factor acelerador de decaimiento). Tal como CD59 son inhibidores unidos a la membrana celular y actúan sobre las convertasas C3/C5 y sobre la vía terminal del complemento respectivamente. MBL: *manosa binding lectin*; Fcn: ficolinas; MASP: *mucin-associated surface proteins*; C2a/C4a/C3a: anafilatoxinas producidas por el clivaje de C2/C4 y C3; Ba: producto del clivaje de CFB; CAM: complejo de ataque a membrana.

membrana C5b-9 (CAM o MAC por *membrane attack complex*, acrónimo en inglés). C5b-8 se inserta en la membrana y C9 se polimeriza para dar lugar a un flujo de calcio creando poros funcionales en las membranas de las células que conducen a su lisis (1).

La activación de la vía de las lectinas, al igual que la vía clásica, también conduce a la formación del complejo convertasa C4bC2bC3b, con la diferencia de que, en vez de usar anticuerpos para el reconocimiento de patógenos, utiliza miembros de la familia de las colectinas llamadas lectinas de unión a manosa (MBLs) y ficolinas, para identificar patrones de ligandos de hidratos de carbono que pueden encontrarse en la superficie de una gran variedad de microorganismos (Fig. 1). La unión de MBL o ficolinas a distintas moléculas de azúcar en la superficie de un patógeno conduce a la activación de

proteasas de serina asociadas a MBL, MASP-1, MASP-2 y MASP-3 (acrónimo del inglés *mucin-associated surface proteins*), que escinden a C4 y C2, y generan C4bC2b, que forma la convertasa C5 en una reacción análoga a la vía clásica del complemento (Fig. 2) (4).

Vía alternativa

La activación de la vía alternativa comienza con la hidrólisis espontánea de un enlace tioéster lábil de C3, que lo convierte en una forma bioactiva C3(H₂O) en fase fluida (Fig. 1). C3(H₂O) sufre un cambio estructural que expone un sitio de unión para el factor B (CFB). El complejo C3(H₂O) y CFB es escindido por el factor D (CFD) que permite la formación de un complejo C3(H₂O)Bb. Este complejo puede interactuar y escindir el C3 nativo en

C3a y C3b (Fig. 2). Este ciclo es conocido como “loop” de amplificación. En condiciones fisiológicas la convertasa C3 genera constantemente pequeñas cantidades de C3b, que pueden unirse covalentemente a cualquier superficie adyacente que contenga grupos hidroxilo. C3b se unirá covalentemente a una superficie que se encuentra dentro de aproximadamente 60 nm de la convertasa, debido a que la vida media del tioéster en C3b es corta y con baja eficacia de fijación (5). C3b experimenta un cambio estructural que conduce a la exposición de nuevos sitios de unión. Esto permite el reclutamiento de CFB formando el complejo C3bBb que funciona como convertasa de C3, amplificando la reacción. Esta convertasa tiene por sustrato a C3 y genera mayor cantidad de C3a y C3b. Este complejo C3bBb requiere de la unión de una proteína sérica llamada properdina que estabiliza el complejo, prolongando su vida media. El C3b generado por el complejo C3bBb se une a él y constituye una molécula más grande llamada C3bBbC3b o convertasa C5, análoga a C4bC2b-C3b de la vía clásica. C3bBbC3b toma por sustrato a C5 y genera C5a y C5b. C5a difunde hacia el plasma y C5b se fija a la membrana de la célula blanco para continuar con el desenlace común de las tres vías, esto es la formación del CAM (C6, C7, C8, C9) (6) (Fig. 2). Cuando C3b se une a las células del hospedador, varias proteínas presentes en el plasma y en las membranas de las células se combinan para evitar que continúe la activación del complemento. Estas proteínas interactúan con C3b y evitan que se forme la convertasa o promueven su rápida disociación, actuando como reguladores del complemento.

Reguladores del complemento

Existen en el organismo proteínas solubles y ligadas a las membranas celulares capaces de regular la acción del complemento para evitar el daño a las células del hospedador (Fig. 2).

Reguladores solubles

CFH (complement factor H)

Es el mayor regulador de la vía alternativa del sistema de complemento. Esta proteína puede inhibir la formación de la convertasa C3 al competir con CFB por el sitio de unión a C3b. Acelera la descomposición de la C3 convertasa y actúa como un cofactor para la escisión mediada por CFI de C3b, otro regulador importante de la vía alternativa. Eso resulta en la liberación de C3c, C3f, C3d, C3g y la formación de la molécula iC3b, enzimáticamente inactiva (7).

CFI (complement factor I)

El factor I es una proteasa de serina que se encuentra en el plasma. La actividad proteasa de CFI condu-

ce a la generación de un producto de degradación de C3b, llamado iC3b, que no puede unirse a CFB (5). En ausencia de regulación por CFI, la vía alternativa del complemento lleva a la generación continua de C3b depositado en la fase fluida y en la superficie celular mediante un ciclo de autoamplificación. Cuanto más C3 se convierte en C3b, se forma más C3 convertasa, lo que resulta en el agotamiento de C3 (8). Con niveles normales de CFI funcional y sus cofactores, la descomposición irreversible de C3b a iC3b tiene como efecto que las convertasas C3 se desensamblen en las superficies de las células del hospedador. De este modo se evita la amplificación inapropiada del complemento, con prevención del consumo de C3 descontrolado en la fase fluida, y la generación de los fragmentos de escisión de C3b. Estos se unen a los receptores específicos del complemento y participan en la opsonización y el desencadenamiento de la respuesta inmune adaptativa (9). La importancia de este mecanismo regulador se pone de manifiesto en pacientes con deficiencia de CFI, quienes sufren infecciones recurrentes y predisposición a diferentes enfermedades (10).

C1inh (C1 inhibitor)

C1inh inactiva las proteasas C1r y C1s, MASP-1 y MASP-2. Éste es el único inhibidor en el primer paso de activación de las vías clásicas y de las lectinas y que previene la ruptura del C4 y del C2. Miembro de la superfamilia de las serpinas, inhibidores de proteasas, C1inh fue descrito como regulador de la vía alternativa al interactuar con C3b para impedir su unión al CFB (11). Así se genera una disminución en la formación de las convertasas y la liberación de anafilatoxinas.

Reguladores de membrana

C4bp (C4 binding protein)

C4bp es un importante inhibidor de la vía clásica y de la vía de las lectinas del complemento. Esta proteína actúa como cofactor de CFI en la inactivación proteolítica de C4b tanto soluble como unido a células, evitando así la formación del complejo C4bC2a, es decir, la convertasa C3 clásica (12). Además, C4bp actúa como cofactor para CFI en la escisión de C3b en la fase fluida, lo que también afectaría la vía alternativa del complemento (13).

CR1 (complement receptor type 1)

CR1 o CD35 es una proteína de membrana que sirve como receptor de inmunocomplejos y es conocida por producir degradación de C3b unida a inmunocomplejos (14). CR1 se une a C3b, C4b y en menor medida, a iC3b. Actúa como un factor de aceleración de la degradación que promueve la disociación de los componentes de las convertasas C3 y C5. También es un cofactor

para el clivaje de C3b mediado por CFI. CR1 es un regulador extrínseco del complemento y su principal función fisiológica es el procesamiento de complejos inmunes. CR1 es un cofactor de CFI en el clivaje de iC3b que genera los productos de degradación C3c y C3dg (10).

MCP (membrane cofactor protein)

MCP o CD46 es una proteína ampliamente expresada por varios tejidos, lo que indica que cumple un rol importante en la regulación del complemento (15). MCP es un inhibidor del complemento y sirve como cofactor de CFI en el clivaje proteolítico e inactivación de la unión a la membrana de C3 en la vía alternativa y a C4b en la vía clásica y de las lectinas (16).

CD55 (factor acelerador de la degradación DAF) y CD59

DAF y CD59 son proteínas de membrana con anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI). DAF inhibe la formación de convertasas C3, mientras que CD59 sirve como el principal inhibidor de la vía del complemento terminal a través de la unión a C8 y C9, bloqueando la formación del CAM y promoviendo su descomposición (16).

Microangiopatías trombóticas

El primer caso de MAT, que sería definido más tarde como púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), fue descrito por Moschowitz en 1924 (17). En los primeros años, y con las descripciones de las primeras series de casos, la PTT y, por consiguiente, las MAT, fueron asociadas a una péntada de manifestaciones clínicas caracterizadas por anemia hemolítica microangiopática (MAHA) de causa no inmune, trombocitopenia, síntomas neurológicos, falla renal y fiebre (18). A partir de los años setenta y de los informes que demostraban que la terapia plasmática modificaba dramáticamente la mortalidad de los pacientes, las MAT pasaron a ser definidas por una tríada. La presencia de MAHA y trombocitopenia en un paciente, en ausencia de otra causa que pueda explicarlas, plantea la necesidad de instaurar la terapia plasmática en el término de horas. La gravedad de estas anomalías refleja la extensión de la agregación microvascular de las plaquetas. Los eritrocitos fragmentados (esquistocitos) se producen a medida que la sangre fluye a través de áreas turbulentas de la microcirculación que son parcialmente ocluidas por agregados plaquetarios. Este proceso causa anemia hemolítica microangiopática. El aumento de lactato deshidrogenasa (LDH) se deriva en gran parte de la isquemia tisular y/o de células de tejido necrótico, además de la hemólisis intravascular (19). La lesión de la célula endotelial juega un rol central en la secuencia de eventos que conducen a las MAT. La pérdida de la trombo-resistencia fisiológica, la adhesión de leucocitos

al endotelio dañado, el consumo del complemento, la liberación y fragmentación anormal del factor de von Willebrand (VWF, *von Willebrand factor*) y el aumento del estrés vascular pueden entonces sostener y amplificar el proceso microangiopático. Las anomalías intrínsecas del sistema del complemento y de la vía del VWF pueden explicar una predisposición genética a la enfermedad que puede desempeñar un papel primordial, en particular en las formas familiares y recurrentes (20).

Actualmente, la lista de entidades que pertenecen a las MAT es amplia y su clasificación un reto a medida que se descubrieron los procesos fisiopatológicos asociados a las distintas enfermedades (21). Dentro de las MAT se reconocen patologías asociadas a condiciones subyacentes diversas, como drogas, cáncer, crisis renal esclerodérmica, lupus eritematoso sistémico (LES), hipertensión maligna, trasplante de órganos sólidos y células progenitoras hematopoyéticas, y coagulación intravascular diseminada, entre otros (22). La PTT y el síndrome urémico hemolítico (SUH) son actualmente las patologías mejor caracterizadas por la experiencia clínica y la literatura científica. El sistema del complemento y más específicamente su regulación surgió como un factor importante en la fisiopatología de estas enfermedades, especialmente en el SUH. Sin embargo, el rol del complemento, tanto en las MAT como en otras patologías renales o trastornos del embarazo, es objeto de investigación continua. Cabe destacar que el sistema del complemento representa el primer sistema de defensa del organismo y a la vez puede tener el rol protagónico en la patogenicidad de algunas enfermedades virales con complicaciones respiratorias. El estudio clínico e histopatológico de la forma grave del síndrome respiratorio agudo severo asociado a coronavirus de tipo 2 (SARS-CoV-2), causante de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19), ha mostrado manifestaciones y síntomas muy similares a las MAT. Evidencias de la activación descontrolada del complemento, tanto en órganos como los pulmones (23) y los riñones (24) como en la circulación sistémica, indicarían que la enfermedad mediada por SARS-CoV-2 estaría impulsada por la respuesta inmune del paciente que llevaría a un proceso inflamatorio excesivo, con daño tisular en ocasiones irreversible. Además, el efecto terapéutico observado con la administración de esteroides apoyaría la hipótesis de que el uso de una terapia anticomplemento podría ser eficaz en pacientes con formas graves de COVID-19 asociadas con síntomas de MAT (22) (25).

Púrpura trombocitopénica trombótica

La PTT es una MAT severa caracterizada por agregación sistémica de plaquetas que conduce a oclusión microvascular con isquemia de órganos, especialmente del sistema nervioso central. Los pacientes generalmente presentan trombocitopenia, hemólisis con un

aumento de esquistocitos en frotis de sangre periférica y anomalías neurológicas como cefalea, confusión, déficits focales, convulsiones o coma. La trombocitopenia resulta del consumo de plaquetas en el proceso trombótico, mientras que la fragmentación y la hemólisis de los eritrocitos son el resultado de una lesión mecánica inducida por una tensión de corte (*shear stress*) anormalmente alta en la microvasculatura (26).

Tanto la forma congénita como la autoinmune o adquirida aparecen como consecuencia de un déficit o disfunción de una proteína denominada ADAMTS13 (acrónimo del inglés *a disintegrin and metalloproteina-se with a thrombospondin type 1 motif, member 13*). Es una desintegrina y metaloproteasa responsable de la escisión del VWF. ADAMTS13 actúa a nivel del dominio A2 del VWF, escindiendo los multímeros ultragrandes de VWF (ULVWF, *ultralarge von Willebrand factor multimers*) en formas de menor tamaño cuando es liberada a la circulación sanguínea (27). El defecto congénito o adquirido de ADAMTS13 hace que la molécula de VWF conserve los ULVWF, los cuales poseen mayor capacidad adhesiva comparados con los multímeros de menor tamaño, provocan adhesión de plaquetas y dan lugar a la formación de trombos plaquetarios alargados sobre el endotelio. Estos trombos se rompen y provocan la aparición de complicaciones clínicas con la fragmentación de los hematíes por el pasaje a través de un flujo turbulento, la disminución del recuento de plaquetas por el consumo en los trombos y el aumento de la LDH sérica secundario tanto a hemólisis como a isquemia de órganos. Las formas adquiridas se presentan por la acción de autoanticuerpos (IgG, IgA, IgM o en forma de complejos inmunes circulantes) dirigidos contra ADAMTS13 que ocasionan que su actividad en el plasma descienda a valores por debajo del 5-10% de la normalidad. Estos anticuerpos pueden aparecer sin causa desencadenante (PTT idiopática) o asociados a la presencia de factores precipitantes, como enfermedades del tejido conectivo, cáncer, embarazo y ciertos fármacos (28). Las formas congénitas están asociadas a mutaciones homocigotas o doble heterocigotas del gen ADAMTS13 (29).

Debe tenerse presente que la PTT es considerada una enfermedad de doble gatillo, es decir que la sola presencia de la deficiencia severa de ADAMTS13 no genera enfermedad por sí sola, ya que es necesaria la presencia de alguna noxa para desencadenar una crisis.

Síndrome urémico hemolítico

El SUH es un trastorno raro y severo que cursa con la clásica tríada de MAHA y trombocitopenia, asociada a daño renal. Históricamente el término abarcaba dos trastornos: el SUH típico, asociado a agentes infecciosos y el SUH atípico (SUHa) asociado a la desregulación de la vía alternativa del complemento. Sin embargo, actualmente se recomienda usar una clasificación

más extensa del SUH en función del evento gatillo responsable de las manifestaciones clínicas. Así, se describieron formas de SUHa relacionadas a anomalías de cobalamina-C, a infecciones por neumococo o por virus (HIV, Hepatitis A y C, Citomegalovirus, Influenza H1N1, Epstein-Barr), cáncer, drogas o a trasplantes de órganos sólidos (por ejemplo, riñón) o de células progenitoras hematopoyéticas (30). La falta de consenso en la terminología de las variantes del SUH se relaciona a que algunos mecanismos patológicos siguen siendo desconocidos. Fakhouri *et al.* consideran más relevante referir a los mecanismos patológicos para describir las formas de SUH, lo que permite apuntar directamente a un tratamiento apropiado (31). Los autores limitan el uso del término SUHa a las anomalías de la vía alternativa del complemento, a los casos asociados a anomalías de una enzima, la diacilglicerol quinasa ϵ (DGK ϵ), y a casos con etiología no identificada y que no entran en ninguna de las categorías previamente descriptas.

SUH típico

Es un síndrome clínico caracterizado por la obstrucción de la microvasculatura, más comúnmente en el riñón, por trombos fibrino-plaquetarios a pesar de la actividad normal de ADAMTS13 (32). Es causado por agentes infecciosos y es una causa frecuente de insuficiencia renal en niños. El agente infeccioso más común es *Escherichia coli* enterohemorrágica productora de toxina Shiga (STEC) y, menos comunes son otros patógenos, como *Shigella* y *Streptococcus pneumoniae* (33). STEC coloniza la mucosa del intestino grueso y causa la destrucción de microvellosidades. Al liberarse la toxina Shiga (Stx), se une a su receptor endotelial específico Gb3 y favorece la expresión superficial de P-selectina. Esta es responsable de la formación de trombos en las células endoteliales (34). Stx se internaliza a través del receptor Gb3 y se escinde para liberar una proteasa en el citoplasma. Esta proteasa inhibe la función ribosomal y la síntesis de proteínas, lo que lleva a la muerte celular. También puede activar vías de señalización, induciendo una respuesta inflamatoria en las células afectadas (35). Estudios recientes revelan que hay activación del complemento principalmente a través de la vía alternativa. En pacientes con la enfermedad, se han encontrado niveles plasmáticos bajos de C3 y niveles elevados de los productos de degradación del complemento, como los factores Bb, C3a y C5b-9 solubles. Además, los niveles de factores Bb y C5b-9 se correlacionan con la presencia de oliguria en la fase aguda de la enfermedad (36). La activación glomerular excesiva de C3 en respuesta a Stx genera C3a, que interactúa con el receptor específico C3aR y potencia así la expresión de P-selectina y el desprendimiento de trombomodulina, con la formación final del trombo y la activación del complemento. Los vasos sanguíneos del colon se dañan y se produce una diarrea sanguinolenta (37).

SUH atípico asociado al complemento

Es una MAT que resulta de la activación no controlada de la vía alternativa del complemento, que conduce a una acción perjudicial y un depósito excesivo del complemento sobre el endotelio, con preferencia por la vasculatura renal. Al igual que el SUH típico, el SUH atípico también cursa con anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal (38). La aparición de SUHa es esporádica aún en pacientes sin antecedentes familiares y en las formas familiares tiene penetrancia incompleta (39). La continua actividad del complemento es el resultado de una falla de las proteínas reguladoras. Existen varios mecanismos por los cuales pueden verse alteradas estas proteínas. Las alteraciones genéticas en el complemento pueden generar cambios de expresión o de función en las proteínas asociadas. En los genes que codifican para los inhibidores del complemento, como *CFH*, *CFI* y *MCP*, que normalmente protegen a las células y tejidos del hospedador, la presencia de variantes genéticas patogénicas causa una disminución de función. Las mutaciones en el gen *CFH* son las anomalías genéticas más frecuentes en pacientes con SUHa, y representan del 20% al 30% de los casos. El gen *CFH* se encuentra co-localizado con los genes *CFHR1* a *CFHR5*, que codifican cinco proteínas relacionadas con *CFH*. *CFH* y *CFHR* comparten un alto grado de identidad de secuencia que los predispone a conversiones de genes y reordenamientos genómicos. Híbridos de *CFH/CFHR* codifican para proteínas *CFH* anormales en las que los dominios proteicos (SCR por *short consensus domain*) de *CFH* pueden ser sustituidos por dominios de *CFHR1* o *CFHR3*. El resultado es la formación de moléculas híbridas de *CFH* que resultan en una disminución de actividad reguladora en las superficies endoteliales. Estos rearrreglos se han observado en un 3% a 5% de los pacientes con SUHa (40).

La forma adquirida del SUHa se relaciona con la presencia de autoanticuerpos anti-*CFH* en 5% a 13% de los casos en Europa (41), 30% en Corea (42), 56% en la India (43) y afecta principalmente a la población pediátrica. Los anticuerpos se unen preferentemente a los dominios proteicos carboxi-terminales de *CFH*, y producen la reducción de la unión de *CFH* a fragmentos C3 en la superficie de la célula, lo que disminuye la protección de la superficie celular mediada por *CFH* (41). El desarrollo de anticuerpos anti-*CFH* está asociado fuertemente con la delección homocigota de *CFHR1* y *CFHR3*. Esto sugiere que la deficiencia de *CFHR1/CFHR3* es un factor predisponente para el desarrollo de estos anticuerpos. Sin embargo, el mecanismo por el cual esta deficiencia causa la aparición de anticuerpos es desconocido (44).

Las mutaciones en el gen *MCP* representan alrededor del 12% de las mutaciones predisponentes para SUHa (45). El 90% de las mutaciones ocurren en el dominio extracelular. Este dominio tiene actividad de cofactor y unión a C3b, por lo tanto, estas mutaciones

generan pérdida de función de la proteína. Se han descrito mutaciones que causan deficiencia cuantitativa de la proteína y mutaciones que generan proteínas truncadas. Estas carecen del dominio C-terminal transmembrana y afectan la expresión de la proteína en la superficie de la célula (46). Se han identificado algunos polimorfismos de los genes *CFH* y *MCP* que podrían modular la penetrancia y la gravedad de la enfermedad. Los haplotipos *CFH-H3* y *MCP_{GGAAC}* son los más relevantes por ser asociados con riesgo de SUHa. Estos haplotipos incluyen variantes genéticas no patogénicas, dado que son frecuentes en la población normal. La presencia de uno o varios polimorfismos en homocigosis podría justificar la predisposición a SUHa en individuos en los que no se han encontrado mutaciones en ninguno de los genes asociados con SUHa (47) (48). Cabe resaltar que el riesgo concedido por ser portador de haplotipos en homocigosis es menor que el riesgo asociado a ser portador de una variante patogénica y que el hecho de ser portador de haplotipos en heterocigosis no descarta el riesgo de enfermedad.

Las mutaciones en el gen que codifica para *CFI* son muy poco frecuentes. En su mayoría son heterocigotas y ocupan entre el 2% y el 8% de los pacientes con SUHa. El 80% de las mutaciones ocurren en el dominio de serina proteasa. Estas mutaciones conducen a deficiencias funcionales y cuantitativas de la proteína (40) (49).

Algunas alteraciones genéticas pueden potenciar la acción de proteínas activadoras del complemento como C3 y CFB. Las mutaciones en *C3* representan del 4% al 8% de los casos de SUHa y afectan principalmente las interacciones con *CFH* y *MCP*, pero también con *CFB*. Estas mutaciones conllevan a la formación de una C3 convertasa hiperactiva ya que su disociación por *CFH* es ineficiente, y, por lo tanto, el C3b mutante tiene una velocidad de conversión a iC3b reducida en la superficie de la célula endotelial (50).

Las mutaciones en *CFB* representan del 1% al 3% de los casos de SUHa. Estas mutaciones, en su mayoría, están localizadas en el dominio de von Willebrand tipo A. Este dominio contiene residuos que son críticos para la interacción entre C3b y *CFB* e influyen en la disociación normal de Bb de C3b. Estas alteraciones promueven una formación mucho más rápida del complejo C3bBb. Adicionalmente la convertasa C3bBb se vuelve más resistente a la descomposición por *CFH* y con mayor actividad enzimática, y causa así mayor activación de la vía alternativa del complemento (51).

Microangiopatías del embarazo

Preeclampsia

Es una complicación grave del embarazo y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad fetomaterna. Se caracteriza por el desarrollo de hipertensión, proteinuria y, en formas más severas, trombocitopenia,

alteración de las enzimas hepáticas, insuficiencia renal, y convulsiones. La etiología y la patogénesis de la preeclampsia no se conocen por completo. Estudios recientes sugieren que hay una respuesta inflamatoria sistémica materna excesiva al embarazo, con activación del complemento (52) (53). La activación del complemento sucede en el tercer trimestre de un embarazo normal, al igual que en la preeclampsia, con la diferencia de que en ésta los niveles de activación son mayores. La vía clásica se activa por la circulación normal de complejos inmunes en cantidades considerables durante el embarazo. En la preeclampsia se ha visto un aumento significativo de estos complejos, lo que sugiere que hay un desequilibrio entre los mecanismos reguladores de esta vía y la activación del complemento. La vía clásica también puede ser activada por ADN bicatenario, teniendo en cuenta que se ha encontrado ADN libre de células de origen materno y fetal en mujeres con embarazos normales y un aumento en mujeres con preeclampsia. Adicionalmente, el aumento de la apoptosis de las células trofoblásticas en la placenta preecláptica podría explicar el aumento de la activación de esta vía. Un desequilibrio entre los mecanismos reguladores y de activación del complemento a favor de estos últimos podría estar directamente relacionado con el desarrollo de preeclampsia. Estudios recientes comprobaron esta hipótesis dado que demostraron la presencia de variantes genéticas en los reguladores del complemento que podrían predisponer a la aparición de la enfermedad (54).

HELLP

HELLP es una variante severa de la preeclampsia que cursa con MAHA, trombocitopenia, hipertensión, daño de órganos -principalmente el riñón e hígado- y, en los casos más severos, el desarrollo de coagulación intravascular diseminada (CID). La placenta no se desarrolla normalmente y se vuelve cada vez más disfuncional durante todo el embarazo. Esto lleva a una estimulación de la respuesta inmune excesiva al desarrollo placentario, que luego activa las cascadas de complemento y coagulación (55). La placenta disfuncional libera proteínas que interactúan con las células endoteliales vasculares que liberan VWF, el cual atrae y adhiere a plaquetas. Se han encontrado niveles disminuidos de actividad de ADAMTS13 en estas pacientes en comparación con embarazos normales. Esta condición probablemente contribuye a los altos niveles de VWF activo (56).

La destrucción de los glóbulos rojos sucede al pasar a través del endotelio dañado y las hebras de fibrina, dando origen a la presentación de MAHA. En el frotis de sangre periférica de estas pacientes se pueden observar esquistocitos. La hemólisis causa el aumento de LDH y los efectos hepatotóxicos directos de diversos factores placentarios liberados en la circulación materna, provocan la liberación del TNF- α (acrónimo de *tumor necrosis factor-alpha*). Esta citoquina inflamatoria aumenta la destrucción celu-

lar. El daño en el riñón es causado por la lesión de las células endoteliales vasculares renales en asociación directa con la acción desmedida del complemento. Esto produce una disfunción renal que contribuye a la proteinuria. Los productos de hemólisis intravascular pueden activar la coagulación y aumentar el riesgo de CID (57).

En esta patología también intervienen factores genéticos. Existen múltiples mutaciones presentes en la placenta de pacientes con HELLP, con una expresión variable de genes maternos, genes fetales y genes paternos que contribuyen al desarrollo de HELLP. Hermanas e hijas de mujeres con historia de HELLP tienen un mayor riesgo de desarrollar el síndrome (58).

Otras patologías asociadas a desregulación del complemento

Existen anomalías adquiridas del complemento debido a la presencia de autoanticuerpos contra componentes específicos del sistema. Muchas de ellas pueden generar patología renal.

Las glomerulopatías C3 (C3G) son enfermedades renales crónicas que se caracterizan predominantemente por el depósito de C3 en los glomerulos, generalmente en ausencia de IgG, y por activación del complemento debido a la desregulación de la vía alternativa (59) (60) (61). Se describieron dos subtipos según el patrón observado en los microscopios de inmunofluorescencia y electrónico: la enfermedad de depósitos densos o glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II (EDD/GNMPH), y la glomerulonefritis C3. Mientras que los anticuerpos anti-C1q se han descrito en pacientes con glomerulonefritis, los anticuerpos más conocidos en pacientes con C3G, se dirigen a las convertasas C3 (factores nefríticos C3 y C4), anti-CFB, anti-C3b o al CFH (anti-CFH) (59).

Como ya se mencionó, los anticuerpos anti-CFH están dirigidos principalmente a la región C-terminal de la molécula, donde se encuentran los dominios de reconocimiento y unión a superficies (dominios SCR19-20) y su presencia está relacionada al desarrollo de SUHa. Además, se ha comprobado que estos anticuerpos reconocen regiones a lo largo de toda la molécula, formando complejos antígeno-anticuerpo y bloqueando no solo la unión de CFH a las superficies celulares, sino también su actividad como cofactor de CFI (dominios en N-terminal) (60). En el estudio de una cohorte de 17 pacientes con C3G que presentaban títulos positivos de autoanticuerpos anti-CFH, los autores describieron que estos anticuerpos estaban dirigidos a la región N-terminal de CFH. Aproximadamente un tercio de ellos alteran la regulación en fase fluida disminuyendo la actividad de CFH como cofactor, sin afectar la regulación en superficies celulares como se observa en el SUHa (62). El factor nefrítico C3 (C3NeF) forma parte de un grupo heterogéneo de autoanticuerpos con la característica de prevenir la disociación de Bb de la convertasa C3bBb, prolongando su

vida media. C3NeF son anticuerpos de isotipo IgG o IgM, que pueden requerir la presencia o no de properdina. C3NeF fue detectado en el 50% de los casos de GNMPI y III, y en más del 80% en pacientes con EDD/GNMPII. Este anticuerpo no está exclusivamente asociado a GNMP, ya que se observó su presencia en C3G sin GNMP, lipodistrofia parcial, glomerulonefritis posestreptocócica, LES, meningitis meningocócica y en algunos individuos sanos. Los pacientes con EDD/GNMPII a menudo presentan hipocomplementemia y depósitos de fragmentos de activación de C5 y C3 en los glomérulos (59) (60).

Las gammapatías monoclonales consisten en un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la proliferación clonal de linfocitos B o células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Ig) y se asocian con un amplio espectro de afecciones malignas y benignas. Datos de la literatura demostraron alta prevalencia de Ig monoclonales en pacientes con C3G (mayores de 50 años) y se observó que en el 65% de esos casos, las Ig eran la causa directa de la activación de la vía alternativa del complemento (63). Al compartir mecanismos patológicos, se planteó que las MAT al igual que C3G podrían estar asociadas a gammapatías monoclonales. Un estudio de cohorte demostró que el 21% de los pacientes con MAT, mayores de 50 años, presentaban Ig monoclonales y que esa asociación se caracterizaba por un peor pronóstico en la evolución de la función renal, si se la comparaba con MAT sin gammapatía monoclonal (64). Si bien hay evidencia de que las Ig monoclonales podrían actuar como inhibidores de las proteínas reguladoras de la vía alternativa del complemento como CFH, otra hipótesis sería que estos anticuerpos participan en la formación de la C3 convertasa estabilizando el C3b recién formado en fase fluida (63).

Microangiopatías tromboticas en estudios de laboratorio

Debido a que las MAT cursan con sintomatología similar, en ocasiones el correcto diagnóstico se dificulta debido a la superposición de signos y síntomas. Teniendo en cuenta el pronóstico ominoso en ausencia de un tratamiento adecuado, es importante realizar un diagnóstico precoz para el inicio de un tratamiento oportuno. En el laboratorio es ideal estudiar las proteínas y mecanismos involucrados en el desarrollo de estas patologías. En esta sección se plantearán las herramientas disponibles en la actualidad para dirigir el diagnóstico de los pacientes con MAT asociadas a alteraciones del complemento.

ADAMTS13: un parámetro útil para diferenciar PTT y SUH

La determinación de los parámetros de ADAMTS13, junto con la sintomatología del paciente, guía hacia

el diagnóstico diferencial entre PTT y SUHa. Dentro de los parámetros asociados a ADAMTS13 figuran la actividad y el antígeno de ADAMTS13 y la presencia de inhibidores (IgG, IgM e IgA). La actividad de ADAMTS13 es un parámetro de laboratorio clave para confirmar el diagnóstico de PTT en el caso de estar severamente disminuida, ya que informa acerca de la funcionalidad de la enzima. Las técnicas más actuales y sensibles son comercializadas, y permiten detectar el clivaje *in vitro* de un fragmento de VWF por ADAMTS13 utilizando ELISA o FRET (transferencia de energía entre fluorocromos). En el caso de una actividad disminuida, se estudia la presencia de anticuerpos dirigidos contra ADAMTS13 para la identificación de casos de PTT adquirida (PTTa). La medición del antígeno es de importancia en aquellos pacientes en los cuales la actividad es muy baja y no se detecten anticuerpos anti-ADAMTS13. Cuando se descarta la sospecha de una PTTa, se realiza la búsqueda de variantes genéticas en ADAMTS13 para identificar casos de PTT congénita con alteraciones que puedan afectar la expresión de la proteína o su actividad funcional (65).

En la actualidad han surgido índices útiles que ayudan a estimar las posibilidades de que un paciente tenga una actividad de ADAMTS13 $\leq 10\%$ (66) (67) (68).

En las tablas se describen las variables a considerar en el índice PLASMIC, válido para aplicar en pacientes adultos, y la categoría de riesgo resultante (Tabla I) (Tabla II).

Tabla I. Índice PLASMIC

Parámetros	Puntos
Recuento de plaquetas $<30 \times 10^9/L$	1
Hemólisis (reticulocitos $>2,5\%$ o haptoglobina indetectable o bilirrubina indirecta >2 mg/dL)	1
Ausencia de cáncer activo	1
Ausencia de historia de trasplante (órganos sólidos/células progenitoras)	1
VCM <90 fL	1
RIN $<1,5$	1
Creatinina <2 mg/dL	1

RIN: razón internacional normalizada; VCM: volumen corpuscular medio.

Tabla II. Categorías de riesgo asociadas a PTT en función del índice PLASMIC

Puntaje	Categoría	Riesgo de ADAMTS13 $\leq 10\%$
0-4	Bajo	4,3%
5-6	Intermedio	56,8%
7	Alto	96,2%

Detección de toxina Shiga (Stx)

El hallazgo de microorganismos productores de toxina Shiga, sumado a la sintomatología del paciente, es de ayuda diagnóstica para el SUH típico. Como se ha descrito en esta revisión, Stx es la responsable del daño al endotelio vascular en esta patología. El diagnóstico se basa en tres criterios para establecer la asociación entre enfermedad e infección. El abordaje microbiológico es el principal criterio para la identificación y caracterización del patógeno por determinación del serotipo, biotipo y factores de virulencia por técnicas como PCR e hibridación con sondas genéticas, seguidas por la identificación de la toxina libre en materia fecal ya sea por prueba de detección rápida o por biología molecular y detección de anticuerpos anti-Stx por ensayos de seroneutralización (69). En caso de un resultado negativo, el diagnóstico se orienta hacia el SUHa, por lo cual se recomienda un estudio profundo de los componentes del complemento.

C3 y C4: factores de primera línea en el estudio del complemento

El hallazgo de niveles bajos de C3 es indicativo del consumo de esta proteína y de manera directa lleva a pensar que hay un aumento de la actividad del complemento. La inmunonefelometría es una técnica usada convencionalmente para la determinación de la concentración de esta proteína en sangre periférica (36). La búsqueda de mutaciones en el gen de C3 es una herramienta para identificar la presencia de una proteína hiperactiva y resistente a la regulación por MCP, propiedad que le confieren las mutaciones con ganancia de función.

La determinación de la concentración de C4 es una herramienta útil para ayudar a discernir la vía por la cual se ha activado el complemento, es decir, ayuda a diferenciar la vía clásica o de las lectinas, de la vía alternativa. La determinación de esta proteína al igual que C3 se realiza mediante inmunonefelometría (36). También se han observado ocasionalmente niveles bajos de C4 en pacientes con SUH típico, lo que indica la activación de las vías clásica y/o de las lectinas, que conducen al consumo de C4 (70).

CFH, CFI, CFB, MCP: factores de orientación para el diagnóstico de SUHa

La determinación de la concentración de CFH, CFI y CFB contribuye a demostrar la posible disminución de la expresión de estas proteínas. Las técnicas inmunológicas más usadas para medir estos valores plasmáticos son ELISA e inmunodifusión radial (46) (71).

La estimación de la expresión de MCP en las superficies celulares a través de citometría de flujo mediante la utilización de anticuerpos específicos es una herra-

mienta de cribado importante al momento de la toma de decisiones de tratamiento (72). Los pacientes con mutaciones únicas en MCP que causen disminución de su expresión no responden al tratamiento con plasmaféresis, debido a que es una proteína de membrana y no circula en plasma (73).

Autoanticuerpos anti-CFH y anti-CFB

Los anticuerpos dirigidos contra CFH se encuentran en mayor porcentaje en la población pediátrica y es un estudio de elección para niños con sospecha de SUHa que no tengan antecedentes familiares (41) (44). No existe un ensayo estándar para la detección de estos autoanticuerpos, sin embargo, un estudio comparó diferentes protocolos de ELISA realizados en varios laboratorios internacionales. Los autores concluyeron que el uso de un método único que utilice un estándar común debería ser adoptado por los laboratorios de referencia, para permitir realizar un estudio longitudinal que establezca la importancia relativa de los anticuerpos anti-CFH en el SUHa (74).

Los autoanticuerpos anti-CFB fueron descritos en otras enfermedades renales asociadas a anomalías del complemento como la EDD/GNMPII y glomerulonefritis por C3. Los anti-CFB se unen a CFB o al producto Bb, parte de la convertasa C3, lo que induce un aumento en la activación de esta convertasa (75). A pesar de ser una forma autoinmune muy rara, la búsqueda de estos anticuerpos en los casos de SUHa debe ser considerada en la evaluación completa de los pacientes.

Autoanticuerpos contra convertasas de la vía alternativa

Como ya se mencionó anteriormente, el C3NeF es un anticuerpo que se une a la convertasa C3 de la vía alterna, prolonga la vida media de la misma e imposibilita la acción de proteínas reguladoras sobre ella, lo que lleva a un aumento de la activación del complemento. Existen diversos ensayos para la detección de C3NeF. Rother *et al.* (76) describieron un ensayo hemolítico dependiente de la vía alternativa en el que incubaban el suero del paciente con eritrocitos de oveja no sensibilizados para cuantificar luego la hemoglobina liberada y un ensayo para evaluar en fase fluida el C3 clivado, detectado con inmunoelectroforesis cruzada. Zhang *et al.* (77) describieron otros métodos: un ELISA con C3b pegado a la placa, un ensayo de estabilización de la convertasa que utilizaba eritrocitos de oveja, inmunoelectroforesis bidimensional y electroforesis con inmunofijación. Si el paciente presenta clínica compatible y el valor de C3 sérico es bajo, con C4 dentro del rango normal en más de una medición, debe indicarse la determinación de C3NeF, junto con sus productos de activación del complemento.

Factores de activación del complemento

Fragmento de activación Bb

El fragmento Bb se forma por la acción del factor D sobre CFB en la vía alternativa. El hallazgo de niveles elevados de este fragmento por técnicas como ELISA, es indicativo de activación a través de la vía alternativa. Se han encontrado niveles elevados de este fragmento en mujeres embarazadas con pocas semanas de embarazo, las cuales evolucionaron a parto prematuro complicado (78). Esto sugiere que los eventos relacionados con la activación del complemento al inicio del embarazo se asocian con la patogénesis de la preeclampsia y que este fragmento de activación podría ser un biomarcador para el riesgo elevado de preeclampsia (79).

C5b-9 soluble

El factor C5b-9 fue analizado previamente por el método ELISA como un biomarcador de activación del complemento, pero su validación como marcador plasmático es controvertida, ya que es necesario un manejo adecuado de las muestras para prevenir la activación *in vitro* del complemento (80) (81). En un estudio se observó que no todos los pacientes en fase aguda de la enfermedad presentaban niveles elevados de C5b-9. En algunos de los pacientes que recibieron como tratamiento de elección eculizumab (anticuerpo monoclonal anti-C5) no disminuyeron los valores de C5b-9 y, algunos pacientes en remisión, persistieron con niveles altos de C5b-9 (82). En contraste, otros trabajos demostraron que todos los pacientes de la cohorte de estudio que estaban en fase aguda presentaban niveles elevados de C5b-9, mientras que todos los pacientes en remisión habían disminuido los niveles (83) (84). No ha sido determinada aún su utilidad como medida de activación del complemento para el seguimiento individual de pacientes.

Ensayos celulares para medir el depósito de C3 o C5b-9

A través de estos ensayos es posible determinar la activación del complemento, midiendo el depósito de C3 o C5b-9 directamente sobre células endoteliales, en lugar de evaluar los niveles en fase fluida. En esta técnica se exponen linajes de células endoteliales, con sensibilidad diferente a la acción del complemento, al suero de pacientes con SUHa. C3 o C5b-9 son detectados con un anticuerpo marcado y cuantificado a través de microscopía fluorescente y citometría de flujo (85). El suero de pacientes con SUHa incrementa el depósito de C5b-9 sobre las células endoteliales comparado con el suero de pacientes normales u otras patologías (82) (86). Otra utilidad de estos ensayos es la posibilidad de evaluar la efectividad clínica de eculizumab, que podría guiar la dosificación y los intervalos de tiempo o el tiempo total de administración del fármaco (82). En estos

ensayos se exponen células endoteliales al suero de pacientes con SUHa simulando un endotelio activado. Se demostró que los pacientes SUHa, con o sin variantes identificadas en los genes del complemento o anticuerpos anti-CFH, activan de manera constante y crónica el complemento en el endotelio. Además, los portadores de mutaciones no afectados mostraron una activación del complemento desregulada a nivel endotelial. Adicionalmente se demostró el nivel de bloqueo de C5 sobre el endotelio en pacientes que recibían tratamiento con eculizumab.

Ensayos funcionales

CH50: actividad hemolítica del complemento

La actividad hemolítica del complemento o CH50 es la técnica *gold standard* que evalúa la capacidad del suero para lisar glóbulos rojos de oveja sensibilizados con antisuero de conejo. Este método puede resultar complicado, exige mucho tiempo y, además, la estabilidad de los reactivos es limitada. Por eso existen otras variantes de esta técnica, como inmunoensayos (ELISA) que detectan el complejo terminal de la vía del complemento (CAM) de manera directa en el suero de los pacientes

Este complejo es el responsable de la lisis de los eritrocitos de oveja en el *test* hemolítico estándar o en el ensayo enzimático de los liposomas medido por proceso automático (87). El CH50 proporciona una visión global de la funcionalidad del sistema del complemento. Evalúa todo el sistema y no provee información acerca de cuál o cuáles factores pueden estar disminuidos o afectados funcionalmente. Esta técnica es una herramienta útil para detectar una deficiencia de la vía clásica. Un CH50 entre muy bajo a cero puede ser el resultado de una deficiencia genética de una o más proteínas del complemento. Las reducciones moderadas en CH50 a menudo se ven en procesos patológicos secundarios a la formación de complejos inmunes (88). Este ensayo también es usado para monitorear la efectividad del tratamiento con eculizumab ya que al ser un anticuerpo dirigido contra C5, el tratamiento ocasionaría una disminución de CH50 al estar bloqueando uno de los componentes terminales de la cascada del complemento. Adicionalmente, se utiliza para vigilar la terapia y comprobar la dosis efectiva a la cual se logra inhibición de este componente. Esta inhibición se ve reflejada en la disminución de CH50 a expensas de C5 (89).

AP50: ensayo funcional de la vía alternativa del complemento

Se basa en la capacidad de un volumen determinado de suero para hemolizar el 50% de los eritrocitos de conejo. A medida que se activa la vía alternativa del complemento, mayor es la cantidad de suero necesaria para hemolizar los eritrocitos. La vía alternativa del comple-

mento se encuentra activada de manera anómala en pacientes que tienen defectos en las proteínas reguladoras, lo que resulta en el consumo de las proteínas implicadas en esta vía. Por lo tanto, en la fase aguda de la enfermedad, el resultado de la actividad hemolítica es bajo, lo que se traduce en un mayor volumen de suero necesario para lograr la lisis de los eritrocitos de conejo (90).

Ensayo funcional de CFH

Es una variante de AP50 en la que se usan eritrocitos de oveja, los cuales, en contraste con los eritrocitos de conejo, contienen ácido siálico en su membrana que confiere capacidad de unirse a CFH del plasma para protegerse a sí mismos del ataque del complemento humano (91). El suero de los pacientes que poseen mutaciones en *CFH* que provocan una deficiencia completa de expresión o una anomalía de función de la proteína, induce la lisis de los eritrocitos de oveja a través de la vía alternativa, en comparación con los controles normales (92).

Ensayo funcional de la vía clásica, alternativa y de las manosas por técnica de ELISA

Este ensayo permite evaluar la actividad funcional de las tres vías de activación del complemento en paralelo. Se usan activadores específicos de la vía clásica (IgM), de la vía de las manosas (manano) y de la vía alternativa (lipopolisacárido), que se incuban con suero del paciente diluido con un bloqueador específico que garantiza la activación de una ruta específica. Finalmente, se detecta C5b-9 con un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina específica para esta molécula que será expresada durante la formación del complejo de ataque a membrana. La cantidad de activación del complemento se correlaciona con la intensidad del color y se mide en términos de absorbancia (93).

Estudios genéticos del complemento

El desarrollo de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento o “*next generation sequencing*” (NGS) permitió que se lograran avances extremadamente rápidos en la búsqueda de variantes genéticas asociadas a las enfermedades raras y multifactoriales. Las patologías como las MAT están entre las entidades que se beneficiaron de esta revolución de la genómica, dado que la presencia de anomalías en múltiples genes ya se han descrito en asociación con formas hereditarias de enfermedad. El estudio cuantitativo y funcional de los parámetros descriptos anteriormente orienta el diagnóstico de los pacientes. Sin embargo, la ausencia de anomalías en estos parámetros de laboratorio no excluye la búsqueda de variantes o pequeñas deleciones/ inserciones en los genes descriptos como asociados a MAT. Por lo general, el estudio genético por NGS se basa actualmente en el análisis de un panel de genes

seleccionados por el laboratorio o del exoma completo de los pacientes. Al encontrar variantes patogénicas sólo en el 50% de los casos de SUHa, el análisis del exoma resulta interesante para buscar mecanismos desconocidos ajenos a la vía alternativa del complemento, pero posiblemente asociados a MAT. Los paneles actuales incluyen genes del complemento *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFB*, *CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3*, *CFHR4*, *CFHR5* pero también de la coagulación como *THBD* (trombomodulina) y *DGKE* (diacilglicerol quinasa *épsilon*) (30). Para la identificación de reordenamientos genéticos más complejos y no detectables por NGS, la utilización de técnicas como MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) permite confirmar las variaciones del número de copias de los genes *CFH/CFHRs* (94). La interpretación de los resultados genéticos es un desafío y se recomienda analizarlos siempre en el contexto clínico del paciente. La dificultad surge cuando se identifican nuevas variantes o variantes de significado desconocido. Si bien existen guías y estándares para la interpretación de estas variantes (95), no hay consenso en cómo manejar estos datos entre los diferentes grupos internacionales de investigación. Actualmente, múltiples bases de datos (NCBI, gnomAD/ExAC, OMIM, HGMD, ClinVar, etc.) y una más específica “*Database of complement gene variants*” reportan los cambios genéticos ya identificados (96). Estas bases permiten comprobar la frecuencia del cambio en la población normal, la patogenidad del mismo o simplemente si ya fue descrito en otros estudios. Los avances metodológicos actuales generan una actualización continua de las bases de datos, lo que implica la necesidad de reevaluar regularmente los resultados genéticos de los pacientes.

Conclusiones

El sistema de complemento es uno de los sistemas de defensa más antiguo que cumple un rol fundamental en la inmunidad. Una mayor comprensión de la vía alternativa del complemento con la descripción de las proteínas implicadas y sus diferentes funciones, permitió describir parte de los mecanismos patológicos de las MAT. Ya que las causas de estas patologías pueden ser de origen genético, es importante resaltar que por sí solas no producen activación descontrolada del complemento, sino que están vinculadas a eventos desencadenantes como factores ambientales externos que actúen como eventos gatillos. Es por ello que tanto la PTT como el SUHa son consideradas enfermedades de “doble gatillo”. Las MAT en general pueden asociarse con disparadores como enfermedades autoinmunes, trasplantes, infecciones o presencia de anticuerpos. Sin embargo, en algunos casos se desconoce el factor desencadenante. Al cursar con manifestaciones similares entre sí, las MAT constituyen un desafío diagnósti-

co para el personal médico. Es indispensable la rápida identificación de la patología para el pronto inicio del tratamiento debido a la gravedad del cuadro clínico y a las complicaciones a largo plazo, que van desde afección renal hasta compromiso del sistema nervioso central. La aparición de nuevas terapias dirigidas, que impiden el deterioro de órganos blanco, ha reforzado la necesidad de establecer diagnósticos más precisos. Es por ello que se considera fundamental contar con herramientas de laboratorio que ayuden a la orientación y a la toma de decisiones en cuanto al diagnóstico y tratamiento. La centralización de todos los estudios del complemento en un instituto de salud o un laboratorio representa una ventaja para mejorar la atención médica de los pacientes con MAT. A pesar de los grandes avances realizados en las últimas décadas, un porcentaje alto de pacientes continúa siendo diagnosticado solamente en base a la presentación clínica y anatómo-patológica. Es por ello que la investigación de estas patologías, sostenida con los avances biotecnológicos, ha ampliado la búsqueda de factores patogénicos más allá de los límites del sistema del complemento. Estos nuevos hallazgos y desarrollos permiten no sólo incrementar el conocimiento de estas enfermedades sino también transferir a la comunidad estos avances con una mejora en la atención de los pacientes afectados.

Fuentes de financiación

Los autores agradecen la ayuda recibida de la fuente institucional, IHEMA, de la fuente gubernamental, CONICET, y el apoyo de las fuentes privadas: Fundación René Baron y *grant* del Laboratorio Raffo para soporte diagnóstico en SUHa.

Conflictos de intereses

Analía Sánchez-Luceros declara ser responsable de un *grant* para el desarrollo de diagnóstico SUHa del laboratorio Raffo.

Natalia Mogollón Molina, Sabrina Rotondo y Célia Dos Santos declaran no tener conflictos de intereses.

Correspondencia

Dra. CELIA DOS SANTOS
Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Instituto de Medicina Experimental IMEX - CONICET
Academia Nacional de Medicina
J.A. Pacheco de Melo 3081
(C1425AUM) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
Tel: +54 11 4805 5759 (Int: 247)
Correo electrónico: ccliadossantos@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement

- system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol* 2012; 2 (2): 103-11.
2. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol* 2015; 6: 257.
3. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaebler WW, Keeble AH. Paths reunited: initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 2010; 215 (1): 1-11.
4. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* 2013; 33 (6): 479-92.
5. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system Part I: Molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* 2015; 6: 262.
6. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11 (9): 785-97.
7. Roversi P, Johnson S, Caesar JJE, McLean F, Leath KJ, Tsiotsoglou SA, *et al.* Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 (21): 12839-44.
8. Nicol PA, Lachmann PJ. The alternate pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF). *Immunology* 1973; 24 (2): 259-75.
9. van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* 2007; 9 (9): 2095-102.
10. Morgan BP, Harris CL. Complement regulatory proteins. First edition. San Diego (CA): Academic Press; 1999.
11. Jiang H, Wagner E, Zhang H, Frank MM. Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J Exp Med* 2001; 194 (11): 1609-16.
12. Ermer D, Blom AM. C4b-binding protein: the good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett* 2016; 169: 82-92.
13. Blom AM, Kask L, Dahlback B. CCP1-4 of the C4b-binding protein alpha-chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. *Mol Immunol* 2003; 39 (10): 547-56.
14. Java A, Liszewski MK, Hourcade DE, Zhang F, Atkinson JP. Role of complement receptor 1 (CR1; CD35) on epithelial cells: A model for understanding complement-mediated damage in the kidney. *Mol Immunol* 2015; 67 (2 Pt B): 584-95.
15. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 431-55.
16. Baines AC, Brodsky RA. Complementopathies. *Blood Rev* 2017; 31 (4): 213-23.
17. Moschowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: an undescribed disease. *Arch Intern Med* 1925; 36: 294-310.
18. Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Medicine* 1966; 45 (2): 139-59.

19. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002; 347 (8): 589-600.
20. Ruggenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* 2001; 3: 831-46.
21. Nester CM, Barbour T, de Cordoba SR, Dragon-Durey MA, Frémeaux-Bacchi V, Goodship TH, *et al.* Atypical aHUS: state of the art. *Mol Immunol* 2015; 67 (1): 31-42.
22. Gavriilaki E, Anagnostopoulos A, Mastellos DC. Complement in thrombotic microangiopathies: unraveling Ariadne's thread into the labyrinth of complement therapeutics. *Front Immunol* 2019; 10: 337.
23. Higenbottam T, Chauhan A, Moellman J, Bernstein J, Weston Davies W. Does SARS-CoV-2 cause a vascular disease? Faculty of Pharmaceutical Medicine blog 2020 May 21 [fecha de acceso 22 de julio de 2020]. Disponible en: URL: <https://www.fpm.org.uk/blog/does-sars-cov-2-cause-a-vascular-disease/>.
24. Diao B, Wang C, Wang R, Feng Z, Tan Y, Wang H, *et al.* Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. Preprint from Q28 medRxiv 2020. doi: 10.1101/2020.03.04.20031120 PPR: PPR116092.
25. Noris M, Benigni A, Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact [published online ahead of print, 2020 May 24]. *Kidney Int* 2020; S0085-2538(20)30556-1.
26. Tsai HM. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2010; 91 (1): 1-19.
27. Zheng XL. ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annu Rev Med* 2015; 66: 211-25.
28. Contreras E, de la Rubia J, del Río-Garma J, Díaz-Ricart M, García-Gala JM, Lozano M. Guía diagnóstica y terapéutica de las microangiopatías trombóticas del Grupo Español de Aféresis. *Med Clin (Barc)* 2015; 144 (7): e1-e13.
29. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, *et al.* Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413 (6855): 488-94.
30. Goodship TH, Cook HT, Fakhouri F, Fervenza FC, Frémeaux-Bacchi V, Kavanagh D, *et al.* Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2017; 91 (3): 539-51.
31. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2017; 390 (10095): 681-96.
32. Jokiranta ST, Viklicky O, Al Shorafa S, Coppo R, Gasteyer C, *et al.* Differential diagnosis of thrombotic microangiopathy in nephrology. *BMC Nephrology* 2017;18: 324.
33. Karpman D, Loos S, Tati R, Arvidsson I. Haemolytic uraemic syndrome. *J Intern Med* 2017; 281 (2): 123-48.
34. Zoja C, Buelli S, Morigi M. Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation. *Pediatr Nephrol* 2019; 34 (3): 379-88.
35. Arvidsson I, Stahl AL, Manea Hedström M, Kristoffersson AC, Rylander C, Westman JS, *et al.* Shiga toxin-induced complement-mediated hemolysis and release of complement-coated red blood cell-derived microvesicles in hemolytic uremic syndrome. *J Immunol* 2015; 194 (5): 2309-18.
36. Ferraris JR, Ferraris V, Acquier AB, Sorroche PB, Saez MS, Ginaca A, *et al.* Activation of the alternative pathway of complement during the acute phase of typical haemolytic uraemic syndrome. *Clin Exp Immunol* 2015; 181 (1): 118-25.
37. Brocklebank V, Wood KM, Kavanagh D. Thrombotic microangiopathy and the kidney. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13 (2): 300-17.
38. Zhang K, Lu Y, Harley KT, Tran MH. Atypical hemolytic uremic syndrome: a brief review. *Hematol Rep* 2017; 9 (2): 7053.
39. Bu F, Borsa N, Gianluigi A, Smith RJ. Familial atypical hemolytic uremic syndrome: a review of its genetic and clinical aspects. *Clin Dev Immunol* 2012; 201: 370426.
40. Noris M, Remuzzi G. Genetics of immune-mediated glomerular diseases: focus on complement. *Semin Nephrol* 2017; 37 (5): 447-63.
41. Dragon-Durey MA, Sinha A, Tagarsimalemath Sk, Bagga A. Anti-complement-factor H associated glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol* 2016;12 (9): 563-78.
42. Lee JM, Park YS, Lee JH, Park SJ, Shin JI, Park YH, *et al.* Atypical hemolytic uremic syndrome: Korean pediatric series. *Pediatr Int* 2015; 57 (3): 431-8.
43. Sinha A, Gulati A, Saini S, Blanc C, Gupta A, Gurjar BS, *et al.* Prompt plasma exchanges and immunosuppressive treatment improves the outcomes of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome in children. *Kidney Int* 2014; 85: 1151-60.
44. Józsi M, Licht C, Strobel S, Zipfel SL, Richter H, Heinen S, *et al.* Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood* 2008; 111 (3): 1512-4.
45. Liszewski MK, Atkinson JP. Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations. *Hum Genomics* 2015; 9: 7.
46. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, *et al.* Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH and FI mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood* 2006; 108 (4): 1267-79.
47. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Frémeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, *et al.* Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24 (3): 475-86.
48. Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Buil A, Carerras Berges L, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, *et al.* Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum Mol Genet* 2005; 14 (5): 703-12.
49. Bienaime F, Dragon-Duery MA, Regnier CH, Nilsson SC, Kwan WH, Blouin J. *et al.* Mutations in components of

- complement influence the outcome of Factor I-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 2010; 77 (4): 339-49.
50. Schramm EC, Roumenina LT, Rybkine T, Chauvet S, Vieira-Martins P, Hue C, *et al.* Mapping interactions between complement C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2015; 125 (15): 2359-69.
 51. Goicoechea de Jorge E, Harris CL, Esparza-Gordillo J, Carreras L, Arranz EA, Garrido CA, *et al.* Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104 (1): 240-5.
 52. Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó J Jr, Füst G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol* 2010; 47 (7-8): 1500-6.
 53. Burwick RM, Fichorova RN, Dawood HY, Yamamoto HS, Feinberg BB. Urinary excretion of C5b-9 in severe preeclampsia tipping the balance of complement activation in pregnancy. *Hypertension* 2013; 62 (6): 1040-5.
 54. Salmon JE, Heuser C, Triebwasser M, Liszewski MK, Kavanagh D, Roumenina L, *et al.* Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: a genetic analysis of the PROMISSE cohort. *PLoS Med* 2011; 8 (3): e1001013.
 55. Kappler S, Ronan-Bentle S, Graham A. Thrombotic microangiopathies (TTP, HUS, HELLP). *Hematol Oncol Clin North Am* 2017; 31 (6): 1081-103.
 56. Hulstein JJ, van Runnard Heimel PJ, Franx A, Lenting PJ, Bruinse HW, Silence K, *et al.* Acute activation of the endothelium results in increased levels of active von Willebrand factor in hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (12): 2569-75.
 57. Abildgaard U, Heimdal K. Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 166 (2): 117-23.
 58. Fang CJ, Richards A, Liszewski MK, Kavanagh D, Atkinson JP. Advances in understanding of pathogenesis of aHUS and HELLP. *Br J Haematol* 2008; 143 (3): 336-48.
 59. Józsi M, Reuter S, Nozal P, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, *et al.* Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome. *Immunol Lett* 2014; 160 (2): 163-71.
 60. Nozal P, López-Trascasa M. Autoanticuerpos frente a proteínas de la vía alternativa del complemento en enfermedad renal. *Nefrología* 2016; 36 (5): 489-95.
 61. Cavero T, Praga M. Glomerulopatía C3: ¿qué sabemos de esta entidad? *NefroPlus* 2016; 8 (2): 95-107.
 62. Blanc C, Togarsimalemath SK, Chauvet S, Le Quintrec M, Moulin B, Buchler M, *et al.* Anti-factor H autoantibodies in C3 glomerulopathies and in atypical hemolytic uremic syndrome: one target, 2 diseases. *J Immunol* 2015; 194: 5129-38.
 63. Chauvet S, Roumenina LT, Aucouturier P, Marinozzi M-C, Dragon-Durey M-A, Karras A, *et al.* Both monoclonal and polyclonal immunoglobulin contingents mediate complement activation in monoclonal gammopathy associated-C3 glomerulopathy. *Front Immunol* 2018; 9: 2260.
 64. Ravindran A, Go RS, Fervenza FC, Sethi S. Thrombotic microangiopathy associated with monoclonal gammopathy. *Kidney Int* 2017; 91 (3): 691-8.
 65. Saha M, McDaniel JK, Zheng XL. Thrombotic thrombocytopenic purpura: pathogenesis, diagnosis and potential novel therapeutics. *J Thromb Haemost* 2017; 15 (10): 1889-900.
 66. Coppo P, Schwarzinger M, Buffet M, Wynckel A, Clabault C, Presne C, *et al.* Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. *PLoS One* 2010; 5 (4): e10208.
 67. Bendapudi PK, Hurwitz S, Fry A, Marques MB, Waldo SW, Li A, *et al.* Derivation and external validation of the PLASMIC score for rapid assessment of adults with thrombotic microangiopathies: a cohort study. *Lancet Haematol* 2017; 4 (4): e157-164.
 68. Li A, Khalighi PR, Wu Q, Garcia DA. External validation of the PLASMIC score: a clinical prediction tool for thrombotic thrombocytopenic purpura diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost* 2018; 16 (1): 164-9.
 69. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. La epidemiología del síndrome urémico hemolítico en la Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y rutas de transmisión. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 27-32.
 70. Stahl AL, Sartz L, Karpman D. Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2011; 117 (20): 5503-13.
 71. Kavanagh D, Richards A, Noris M, Hauhart R, Liszewski MK, Karpman D, *et al.* Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* 2008; 45 (1): 95-105.
 72. Khandelwal P, Birla S, Bhatia D, Puraswani M, Saini H, Sinha A, *et al.* Mutations in membrane cofactor protein (CD46) gene in Indian children with hemolytic uremic syndrome. *Clin Kidney J* 2018; 11 (2): 198-203.
 73. Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, *et al.* Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5 (10): 1844-59.
 74. Watson R, Lindner S, Bordereauc P, Hunzea EM, Taka F, Ngob S, *et al.* Standardisation of the factor H autoantibody assay. *Immunobiology* 2014; 219 (1): 9-16.
 75. Marinozzi MC, Roumenina LT, Chauvet S, Hertig A, Bertrand D, Olagne J, *et al.* Anti-factor B and anti-C3b autoantibodies in C3 glomerulopathy and Ig-associated membranoproliferative GN. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28 (5): 1603-13.
 76. Rother U. A new screening test for C3 nephritis factor based on a stable cell bound convertase on sheep erythrocytes. *J Immunol Methods* 1982; 51 (1): 101-7.

77. Zhang Y, Meyer NC, Wang K, Nishimura C, Frees K, Jones M, *et al.* Causes of alternative pathway dysregulation in dense deposit disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7 (2): 265-74.
78. Lynch AM, Gibbs RS, Murphy JR, Byers T, Neville MC, Giclas PC, *et al.* Complement activation fragment Bb in early pregnancy and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199 (4): 354.e1-8.
79. Lynch AM, Murphy JR, Byers T, Gibbs RS, Neville MC, Giclas PC, *et al.* Alternative complement pathway activation fragment Bb in early pregnancy as a predictor of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198 (4): 385.e1-9.
80. Dos Santos C, Alberto MF, Paiva J, Casinelli MM, Lazzari MA, Kempfer AC, *et al.* Validación de las condiciones de procesamiento y almacenamiento de muestras de sangre para la determinación del marcador de activación de la vía alternativa del complemento C5b-9 en pacientes con microangiopatía trombótica (MAT). [resumen] *Medicina (B Aires)* 2015; 75 (Supl II): 84.
81. Yang S, McGookey M, Wang Y, Cataland SR, Wu HM. Effect of blood sampling, processing, and storage on the measurement of complement activation biomarkers. *Am J Clin Pathol* 2015; 143 (4): 558-65.
82. Noris M, Galbusera M, Gastoldi S, Macor P, Banterla F, Bresin E, *et al.* Dynamics of complement activation in aHUS and how to monitor eculizumab therapy. *Blood* 2014; 124 (11): 1715-26.
83. Volokhina EB, Westra D, Van der Velden TJ, Van de Kar NC, Mollnes TE, Van den Heuvel LP. Complement activation patterns in atypical hemolytic uremic syndrome during acute phase and in remission. *Clin Exp Immunol* 2015; 181 (2): 306-13.
84. Cataland SR, Holers VM, Geyer S, Yang S, Wu HM. Biomarkers of terminal complement activation confirm the diagnosis of aHUS and differentiate aHUS from TTP. *Blood* 2014; 123 (24): 3733-8.
85. Gavriilaki E, Yuan X, Ye Z, Ambinder AJ, Shanbhag SP, Streiff MB. Modified Ham test for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2015; 125 (23): 3637-46.
86. Timmermans SAMEG, Abdul-Hamid MA, Potjewijd J, Theunissen ROMFIH, Damoiseaux JGMC, Reutelingsperger CP, *et al.* C5b9 Formation on endothelial cells reflects complement defects among patients with renal thrombotic microangiopathy and severe hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29 (8): 2234-43.
87. Sridharan M, Go RS, Abraham RS, Fervenza FC, Sethi S, Bryant SC, *et al.* Diagnostic utility of complement serology for atypical hemolytic uremic syndrome. *Mayo Clin Proc* 2018; 93 (10): 1351-62.
88. Sandhu V, Quan M. SLE and serum complement: causative, concomitant or coincidental? *Open Rheumatol J* 2017; 11: 113-22.
89. Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, Loirat C, Frémeaux-Bacchi V, French Study Group for aHUS/C3G. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8 (11): 643-57.
90. Angioi A, Fervenza FC, Sethi S, Zhang Y, Smith RJ, Murray D, *et al.* Diagnosis of complement alternative pathway disorders. *Kidney Int* 2016; 89 (2): 278-88.
91. Roumenina LT, Roquigny R, Blanc C, Poulain N, Ngo S, Dragon-Durey MA, *et al.* Functional evaluation of factor H genetic and acquired abnormalities: application for atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). *Methods Mol Biol* 2014; 1100: 237-47.
92. Sánchez-Corral P, González-Rubio C, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M. Functional analysis in serum from atypical hemolytic uremic syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol* 2004; 41 (1): 81-4.
93. Seelen MA, Roos A, Wieslander J, Mollnes TE, Sjöholm AG, Wurznner R, *et al.* Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods* 2005; 296 (1-2): 187-98.
94. Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A, Blanc C, Blouin J, Ranchin B, *et al.* Clinical features of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21 (12): 2180-7.
95. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17 (5): 405-24.
96. Osborne AJ, Breno M, Borsa NG, Bu F, Frémeaux-Bacchi V, Gale DP, *et al.* Statistical validation of rare complement variants provides insights into the molecular basis of atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy. *J Immunol* 2018; 200 (7): 2464-78.

Recibido: 27 de febrero de 2020

Aceptado: 5 de agosto de 2020