



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA" U.M.A.E.

HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"

**"CARACTERIZACIÓN DEL POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO DE  
STAT-4 (rs7574865) EN EL SÍNDROME DE ANTICUERPOS  
ANTIFOSFOLÍPIDOS PRIMARIO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS  
EN EL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL CENTRO  
NACIONAL LA RAZA.**

## TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO EN REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA

### PRESENTA:

DRA. VIRGINIA RAMÍREZ NOVA

### ASESOR DE TESIS:

DR. ALFONSO RAGNAR TORRES JIMÉNEZ

MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA

### ASESORA METODOLÓGICA:

DRA. VILMA CAROLINA BEKKER MÉNDEZ

ENCARGADA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGIA E  
INFECTOLOGÍA (UIMEII)

N° DE REGISTRO: R-2018-3502-055

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2019.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación en Salud 3502 con número de registro **18 CI 09 002 001** ante COFEPRIS y número de registro ante CONBIOÉTICA **CONBIOETICA 09 CEI 027 2017101**.

HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

FECHA Lunes, 31 de diciembre de 2018.

**M.E. ALFONSO RAGNAR TORRES JIMENEZ  
PRESENTE**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**CARACTERIZACIÓN DEL POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP) STAT-4 (RS7574865) EN EL SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS PRIMARIO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS EN EL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL CENTRO NACIONAL LA RAZA.**

que sometió a consideración para evaluación de este Comité Local de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

No. de Registro R-2018-3502-055
------------------------------------

ATENTAMENTE

**DR. GUILLERMO CAREAGA REYNA**  
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3502

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

## **IDENTIFICACIÓN DE INVESTIGADORES**

### **INVESTIGADOR RESPONSABLE:**

**DR. ALFONSO RAGNAR JIMÉNEZ TORRES**

MATRICULA: 99155531

ADSCRIPCIÓN: UMAE HOSPITAL GENERAL GAUDENCIO GONZALEZ GARZA "CMN LA RAZA"

CARGO INSTITUCIONAL: MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA

TELÉFONO: 5724-5900 EXT 23510

DOMICILIO: AVENIDA VALLEJO Y AVENIDA JACARANDAS S/N,

COLONIA: LA RAZA; DELEGACION AZCAPOTZALCO, CIUDAD DE MEXICO.

CORREO: [TOJADR@GMAIL.COM](mailto:TOJADR@GMAIL.COM)

### **INVESTIGADORES ASOCIADOS:**

**DRA. VILMA CAROLINA BEKKER MÉNDEZ**

MATRICULA: 11114452

ADSCRIPCIÓN: UMAE "CMN LA RAZA"

CARGO INSTITUCIONAL: ENCARGADA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGIA E INFECTOLOGÍA (UIMEII)

DOMICILIO: AVENIDA VALLEJO Y AVENIDA JACARANDAS S/N,

COLONIA: LA RAZA; DELEGACION AZCAPOTZALCO, CIUDAD DE MEXICO.

CORREO: [BEKKERMENDEZ@YAHOO.COM](mailto:BEKKERMENDEZ@YAHOO.COM)

**M. EN C. FRANCISCO XAVIER GUERRA CASTILLO**

MATRICULA: 3110991090

ADSCRIPCIÓN: UMAE "CMN LA RAZA"

CARGO INSTITUCIONAL: TÉCNICO EN INVESTIGACION E2 DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGIA E INFECTOLOGÍA (UIMEII)

DOMICILIO: AVENIDA VALLEJO Y AVENIDA JACARANDAS S/N,

COLONIA: LA RAZA; DELEGACION AZCAPOTZALCO, CIUDAD DE MEXICO.

CORREO: [PACOXGUERRA@GMAIL.COM](mailto:PACOXGUERRA@GMAIL.COM)

**DRA. VIRGINIA RAMÍREZ NOVA**

MATRICULA: 97362252

ADSCRIPCIÓN: UMAE HOSPITAL GENERAL GAUDENCIO GONZALEZ GARZA "CMN  
LA RAZA "

CARGO INSTITUCIONAL: MÉDICO RESIDENTE DEL SEGUNDO AÑO DE  
REUMATOLOGIA PEDIÁTRICA

TELÉFONO: 5724-5900 EXT 23510

DOMICILIO: AVENIDA VALLEJO Y AVENIDA JACARANDAS S/N,

COLONIA: LA RAZA; DELEGACION AZCAPOTZALCO, CIUDAD DE MEXICO.

CORREO: RAMIREZNOVA@HOTMAIL.COM

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
5. OBJETIVOS GENERAL.....	16
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1 TIPO DE ESTUDIO.....	16
6.2 UNIVERSO DE TRABAJO.....	17
6.3 LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO.....	17
6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	17
6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	17
6.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	17
6.7 VARIABLES DE ESTUDIO.....	18
6.8 MÉTODOS.....	18
7. DEFINICIÓN DE VARIABLES.....	20
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
9. DESCRIPCION DEL ESTUDIO.....	24
10. RECURSOS HUMANOS.....	25
10.1 Recursos humanos.....	25
10.2 Recursos materiales.....	25
10.3 Recursos económicos.....	26
10.4 Factibilidad.....	26
11. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	27
12. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	27
13. CONFIDENCIALIDAD.....	28
14. RESULTADOS.....	29
14.1 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	39
15. DISCUSIÓN.....	48

16. CONCLUSIONES.....	52
17. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	53
18. CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO.....	55
19. BIBLIOGRAFÍA.....	56
20. ANEXOS.....	59
ANEXO 1.....	59
ANEXO 2.....	60

**ABREVIATURAS:**

**SNP:** Polimorfismo de Nucleótido Único

**SAAF:** Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos Primario

**AFL:** Antifosfolípidos

**LES:** Lupus Eritematoso sistémico

**AIJ:** Artritis Reumatoide Juvenil

**UMAE:** Unidad Médica de Alta Especialidad.

**CMNR:** Centro Médico Nacional La Raza.

## 1. RESUMEN.

### **CARACTERIZACIÓN DEL POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP) STAT-4 (RS7574865) EN EL SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS PRIMARIO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS EN EL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL CENTRO NACIONAL LA RAZA**

Torres Jiménez, AR. Bekker Méndez VC, Ramírez Nova, V.

**INTRODUCCIÓN:** El síndrome antifosfolípido (SAAF) es un trastorno inmunitario adquirido caracterizado por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos circulantes. En pediatría no existen criterios diagnósticos definitivos, pero se conoce que las manifestaciones hematológicas son las más frecuentes en este grupo etario. Actualmente se desconocen las causas de la diversidad clínica en la expresión inicial de la enfermedad.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Diseño: Observacional, prospectivo, descriptivo, transversal, riesgo mínimo. Se realizó un estudio con 22 pacientes menores de 16 años; mexicanos, portadores de SAF, según los criterios de Sidney 2006. Para la detección de las variantes se realizó a partir de 2ml de sangre periférica, la extracción de DNA se realizó con kit comercial. Posteriormente cada una de las variantes se determinaron por PCR en tiempo real con sondas TaqMan: STAT-4 (RS7574865).

**OBJETIVOS:** Caracterizar la asociación del polimorfismo STAT-4 (RS7574865) en pacientes pediátricos mexicanos portadores de SAF comparados con una población sin enfermedad autoinmune.

**RESULTADOS:** Se identificó que el 90% de los pacientes son portadores de la mutación del polimorfismo STAT-4 (RS7574865), 45.4% homocigoto TT y 45.4% heterocigoto GT, al realizar el análisis estadístico no se encontró relación con las manifestaciones clínicas ni de laboratorio del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario en pediátricos mexicanos, pero si se identificó que ser portador homocigoto de la mutación confiere un riesgo de 7 veces más de padecer SAF primario  $p=0.013$ .

**CONCLUSIONES:** El SNP STAT-4 (RS7574865) se encontró en el 90% de los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario pediátrico; pero no se correlacionó con ninguna manifestación clínica ni de laboratorio.

# **CARACTERIZACIÓN DEL POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP) STAT-4 (RS7574865) EN EL SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS PRIMARIO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS EN EL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL CENTRO NACIONAL “LA RAZA”**

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1 ANTECEDENTES GENERALES.**

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) es una enfermedad sistémica autoinmune que se caracteriza por la presencia de anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos o proteínas plasmáticas ligadas a fosfolípidos aniónicos, entre los más característicos incluyen: anticoagulantes lúpicos, anticuerpos anticardiolipina (aCL), Anticuerpos Beta2-glicoproteína I (AB2GI). Además de los efectos de los antifosfolípidos (aFL) sobre las vías de la coagulación, incluidas las acciones procoagulantes de estos anticuerpos sobre la proteína C, anexina V, las plaquetas, proteasas séricas, receptores tipo Toll, factor tisular y fibrinólisis deteriorada.<sup>(1-8)</sup>

Fue descrito por primera vez en la década de los 80s por Graham Hughes en donde se demostró que existía un anticuerpo que interfiere con la unión de los fosfolípidos al activador de protrombina prolongando el tiempo parcial de tromboplastina in vivo, presentándose de manera paradójica una tendencia a trombosis.<sup>(9)</sup> De acuerdo a su presentación se determina como primaria cuando ocurre sin asociación a otra enfermedad en el que solo un pequeño porcentaje evoluciona a Lupus eritematoso sistémico (LES) incluso en un periodo de seguimiento largo; se define secundario cuando se asocia a otras enfermedades reumáticas principalmente LES. Las condiciones que crean tal susceptibilidad permanecen en gran parte indefinidas.<sup>(10, 11)</sup>

Se calcula que una incidencia de 5 por cada 100.000 personas por año y la prevalencia de 40 a 50 casos por cada 100.000 personas por año en población general. No existen datos confiables sobre la incidencia y prevalencia del SAAF en niños debido a que actualmente no existen criterios validados para pacientes pediátricos y el diagnóstico se basa en las manifestaciones clínicas y de laboratorio reportadas con mayor frecuencia en esta población.

Karakantza M. y colaboradores en el 2004 mostraron una cohorte de 1.000 paciente con diagnóstico de SAAF de 13 países Europeos, solo 2.8% de los pacientes fueron diagnosticados antes de los 15 años de edad. En pacientes pediátricos la relación mujer:hombre es 2:1 a 3:1, a diferencia de los pacientes adultos donde la relación mujer:hombre es de más de 5:1. Actualmente se sabe muy poco acerca de la distribución geográfica y racial de SAAF en niños.<sup>(12,13)</sup> En múltiples estudios de pacientes con diagnóstico de SAAF primario o secundario se ha reportado como evento trombótico más común la trombosis de vasos pequeños en 44% y como manifestación no trombótica más común la afección hematológica en el 53% de los pacientes.<sup>(14, 15)</sup>

Se han propuesto grupos de criterios diagnósticos, por distintos autores para clasificar a los pacientes con SAAF adultos, pero no pueden ser aplicados en pediátricos debido a la diversidad en la presentación clínica inicial. Los criterios diagnósticos de síndrome antifosfolípidos primario propuesto por Alarcón-Segovia<sup>14</sup> continúan siendo vigentes sin embargo los más utilizado en pediatría son los criterios de Sydney 2016 (modificados de Sapporo), determinando como síndrome antifosfolípido definitivo a la presencia de al menos 1 criterio clínico y 1 criterio de laboratorio.<sup>40</sup> (Anexo 1).

Entre algunas manifestaciones clínicas no consideradas como criterio el grupo de trabajo sobre AFL llevó acabo recomendaciones con el fin de sugerir una revisión de los criterios de clasificación actuales entre los que están a considerar: la trombosis venosa superficial, trombocitopenia, nefropatía, enfermedad valvular cardiaca migraña, corea, mielitis transversa y crisis convulsivas.<sup>(16)</sup> Recientemente se ha estudiado que en el SAAF pediátrico los eventos trombóticos son menos frecuentes que en los adultos, siendo las manifestaciones hematológicas las más frecuentemente reportadas.<sup>(17)</sup> Por ello es importante reconocer la gran diferencia que existe entre la presentación clínica en la etapa pediátrica vs adulto. Pero una condición que no cambiaría o modificaría la expresión de la enfermedad puede estar relacionada estrechamente con la presencia de polimorfismos genéticos específicos.

Las diferentes enfermedades autoinmunes que a menudo coexisten dentro de una familia tienen mayores tasas de concordancia en gemelos monocigotos que en gemelos dicigotos por lo que ha sido demostrado en meta-análisis del genoma humano que diferentes enfermedades pueden compartir los factores de mayor susceptibilidad.<sup>(18-22)</sup> Actualmente, los loci genéticos de susceptibilidad compartida que han sido documentados para

múltiples enfermedades autoinmunes incluyen el complejo de histocompatibilidad principal genético (MHC) y polimorfismos no MHC.<sup>(23-24)</sup>

Lundström E. y colaboradores en el 2013 con la justificación que los genotipos de Antígeno Leucocitario humano (HLA) clase II se han relacionado con la presencia de antifosfolípidos y el estado protrombótico, determinó la relación existente entre los alelos HLA-DRB1, antifosfolípidos y los eventos vasculares en pacientes con LES resultando más frecuente el HLA-DRB1\*04 en pacientes con LES y enfermedad cerebrovascular en comparación con los pacientes no afectados. Esta asociación se mantuvo después de compararlo con los factores de riesgo cardiovascular tradicionalmente conocidos; el HLA-DRB1\*13 se asoció con evento vascular. La positividad de la anticardiolipina IgG e IgM, beta-2-glicoproteína I, protrombina IgG y el anticoagulante lúpico se asociaron con HLA-DRB1\*04, mientras que HLA-DRB1\*13 se asoció con anticuerpos IgG (beta-2-glicoproteína I, anticardiolipinas y protrombina). En pacientes con los alelos de riesgo combinados, HLA-DRB1\*04/13 tuvo una interacción aditiva significativa para evento vascular y enfermedad cerebrovascular isquémica.<sup>(25)</sup>

Un estudio realizado por Sánchez ML et. al, 2004 en la unidad de investigación de Lupus en Reino Unido identificó la asociación del polimorfismo HLA-DM con la producción de anticuerpos antifosfolípidos. Se reportó que la variación en el gen HLA-DM es importante para producir un grupo de autoanticuerpos patógenos y antifosfolípidos fundamentado en que la presentación de antígeno está restringido al HLA de clase II e involucrado en la producción de AFL.<sup>(26)</sup>

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP) del transductor de señal y activador del gen de la transcripción 4 (STAT-4) parece ser uno de los mejores ejemplos del tipo no HLA. El gen STAT-4 se encuentra en el cromosoma 2q33 y es un factor de transcripción fundamental en la diferenciación y proliferación de células T helper 1 (Th1) y Th17.<sup>(27-29)</sup> Dado que los linajes Th1 y Th17 son efectores cruciales en los trastornos inflamatorios crónicos, el gen STAT-4 tiene un papel importante en la patogénesis de enfermedades autoinmunes. Se ha determinado hasta un 25% de pacientes portadores de polimorfismos en STAT-4 en ausencia de enfermedad reumatológica. Kelley et. al., 2010 describió que el SNP de STAT-4 (rs7574865) está asociado a un mayor riesgo de diversas enfermedades autoinmunes complejas, incluso en diferentes poblaciones étnicas, tal es el caso de la Artritis Reumatoide (AR) en el adulto; LES, síndrome de Sjögren primario (SSp), esclerosis sistémica (SSc). Sin embargo, en otras publicaciones se ha reportado

que el polimorfismo de STAT-4 (rs7574865) no parece estar relacionados con la susceptibilidad de estas enfermedades ni con la etnicidad.<sup>(30-34)</sup>

Horita, T., et al, en el 2008 estudiaron el SNP de STAT-4 (rs7574865) G/T como un factor de riesgo exclusivamente en el síndrome antifosfolípido primario basado en estudios familiares y/o manifestaciones clínicas del SAAF, así como las asociaciones de LES con SAAF en las que comparten un mecanismo común para el inicio de la enfermedad o su progresión. Además de algunos polimorfismos para antígenos diana para antifosfolípidos y genética trombótica como factores de riesgo. En este estudio se investigó el SNP rs7574865 de STAT-4 en pacientes japoneses con SAAF y los comparó con controles sanos. Se registraron 74 pacientes con SAAF (37 con SAAF primario y 37 con SAAF secundario asociado a SLE) y 414 controles sanos étnicamente pareados. Todos los pacientes cumplían criterios de clasificación de SAAF. En total 70 pacientes cumplieron con criterio trombótico y 19 con criterio obstétrico. La frecuencia del alelo T de rs7574865 en SAAF (42,6%) fue significativamente elevado en comparación con los controles sanos (31.6%). Cuando se analiza solo en pacientes con SAAF primario, la frecuencia del alelo T de rs7574865 (48.6%) fue más alto. Esta asociación todavía se observó después de la caracterización de las manifestaciones clínicas de SAAF. Los resultados demostraron por primera vez, la correlación positiva entre el alelo T de STAT4 rs7574865 y SAAF, incluso mejor al hacer énfasis en SAAF primario, lo que sugiere que el SNP de STAT-4 juega un papel crucial en la patogénesis de trastornos autoinmunes, incluidos AR, LES, SSc y SAAF independientemente de la etnia.<sup>(38)</sup>

Yin Hong y colaboradores, en el 2009 estudiaron la asociación de STAT-4, BLK, BANK1 o IRF5 con el objetivo de investigar la susceptibilidad genética que pudiera explicar la similitud entre LES y el SAAF primario. Se estudiaron 133 pacientes con SAAF primario clasificados de acuerdo a los criterios de Sydney y 468 controles sanos de la misma área geográfica. Se estudiaron tres SNP en IRF5 (rs2004640, rs2070197 y rs10954213), cuatro SNP de STAT-4 (rs1467199, rs3821236, rs3024866 y rs7574865), dos SNP en BANK1 (rs10516487 y rs3733197) y un SNP de BLK (rs2736340). Se demostró que STAT-4 y BLK muestran una fuerte asociación genética con SAAF primario para rs7574865, con un Odds Ratio (OR) 2.19,  $P = 5.17 \times 10^{-7}$ ; para rs2736340 un OR 2.06,  $p = 1.78 \times 10^{-6}$ , una débil asociación con IRF5 y no se observó asociación con BANK1. A pesar de las similitudes clínicas y serológicas del LES y SAAF primario aun no es posible determinar una

asociación genética más compleja y son pocos los genes de susceptibilidad determinados en LES. <sup>(11)</sup>

Liang, Y.L., et. al., en el 2012 publicó un metaanálisis donde se incluyó el SNP de STAT-4 rs7574865 y la susceptibilidad de enfermedades autoinmunes entre diferentes etnias. Para ello se utilizaron los informes relevantes publicados antes de septiembre del 2011. Se realizó para el genotipo T/T (efecto recesivo), T/T + G/T (efecto dominante) y alelo T, encontrándose 40 estudios con 90 comparaciones de LES, 19 de AR, 3 con diabetes tipo 1 (DT1), 11 con SSc y 4 con enfermedades autoinflamatorias (EAI), 3 con SSp, 4 con Artritis reumatoide Juvenil (AIJ), 2 con SAAF primarios, 1 con enfermedad tiroidea autoinmune, 1 con esclerosis múltiple, 1 con psoriasis, 1 con granulomatosis de Wegener, 1 con diabetes tipo 2 y 1 con arteritis de células gigantes. Las probabilidades generales del Odds Ratio para el alelo-T rs7574865 aumentó significativamente en SLE, AR, DT1, SSc, AIJ y SAAF primario (OR = 1.56, 1.25, 1.13, 1.34, 1.25 y 2.15 respectivamente,  $p < 0.00001$ ) y en EAI y SSp (OR = 1.11 y 1.33 respectivamente,  $p < 0.05$ ). Con ello se demostró que el alelo T rs7574865 de STAT-4 confiere susceptibilidad para LES, AR, DT1, SSc, AIJ, APS, EAI y SSp apoyando la hipótesis de la asociación entre el polimorfismo del gen STAT-4 y el subgrupo de enfermedades autoinmunes. <sup>(37)</sup>

En pacientes mexicanos, el IRF5 tiene fuerte asociación con LES, pero no está relacionado con el SAAF primario. Recientemente se ha demostrado que STAT-4 SNP rs7574864 se asocia con un aumento de la sensibilidad de señalización a interferón (IFN) y con menores niveles de IFN en suero, sin embargo, actualmente se desconocen los niveles plasmáticos anormales de IFN que pudiesen ser identificados en los pacientes con SAAF primario. Yin Hong. et. al., evidenció que solo algunos pacientes pueden llevar alelos de riesgo para IRF5 y BANK1 pero no se concluyó específicamente, dado que aún se necesitan más estudios para llegar a la conclusión definitiva de la susceptibilidad genética del SAAF primario. <sup>(11, 36)</sup>

Taylor K.E., et al., en el 2008 estudió 137 polimorfismos en la región STAT-4 en 4 series de casos de LES (total n =1398) y 2560 controles sanos, junto con los datos clínicos para los casos, usando pruebas condicionales, confirmaron que el haplotipo STAT-4 fue más significativo para el riesgo de LES. Además, se estudiaron polimorfismos que marcaban este haplotipo para la asociación con subfenotipos específicos de SLE, que incluyen la producción de auto-anticuerpos, nefritis, artritis, manifestaciones mucocutáneas y la edad al momento del diagnóstico. Para evitar posibles errores de tipo I a partir de la

estratificación de la población, se volvieron a analizar los datos utilizando un subconjunto de sujetos que se determinó eran más homogéneos en base al análisis de los componentes principales de los datos del genoma completo. Con ello se confirmaron 4 polimorfismos fuertemente asociados con LES y no hubo evidencia convincente de loci de riesgo de SLE adicionales en la región STAT-4. El polimorfismo rs7574865 tenía una frecuencia de alelo menor (FAM) = 31.1% en casos de LES en comparación con 22.5% en controles (OR=1.56,  $p=10^{-16}$ ). Este polimorfismo se asoció más fuertemente con SLE caracterizado por autoanticuerpos de ADN bicatenario (FAM=35.1%, OR=1.86,  $p<10^{-19}$ ), nefritis (FAM=34.3%, OR=1.80,  $p <10^{-11}$ ), y la edad al diagnóstico  $<30$  años (FAM=33.8%, OR=1.77,  $p <10^{-13}$ ). Una asociación con nefritis severa fue aún más impactante (FAM=39.2%, OR= 2.35,  $p<10^{-4}$  en el subconjunto homogéneo de sujetos). Al contrario, STAT-4 se asoció mínimamente con las úlceras orales y manifestaciones más leves de la enfermedad; concluyéndose que este polimorfismo común de STAT-4 contribuye a la heterogeneidad fenotípica del LES, predisponiendo específicamente a una enfermedad más grave.<sup>(35)</sup> Hagberg N., et. al, en el 2017 describió el riesgo de STAT4 rs7574865 (T) asociado a mayor susceptibilidad del LES y a un fenotipo más grave de la enfermedad, donde se incluyeron 52 pacientes con LES, dicho estudio evidenció que los pacientes con LES poseen un alelo de riesgo STAT4 rs7574865 mostrando un aumento en la respuesta a IL-12 e IFN- $\alpha$ .<sup>(39)</sup>

Actualmente se conoce una serie de polimorfismos HLA y no HLA posiblemente involucrados en la patogénesis del SAAF primario, todos ellos determinados en población adulta de diferentes grupos étnicos a excepción de pacientes mexicanos mostrando un amplio espectro de manifestaciones clínicas y de expresión de anticuerpos antifosfolípidos. Nuestra investigación propone determinar la caracterización del polimorfismo de STAT-4 rs7574865 en pacientes pediátricos mexicanos con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario atendidos en el servicio de reumatología pediátrica del centro nacional La Raza.

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario es una enfermedad reumatológica la cual debe ser clasificada de acuerdo a la presencia de trombosis arterial o venosa, antecedentes de pérdidas fetales recurrentes, además de la positividad de los anticuerpos

antifosfolípidos (anticoagulante lúpico, anticardiolipinas y beta2-glucoproteína I) en 2 ocasiones con una diferencia de 2 semanas.

En la población pediátrica, resulta complicado realizar el diagnóstico de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario dado que las manifestaciones de trombosis arterial-venosa o las pérdidas fetales recurrentes son las manifestaciones menos comunes. Las manifestaciones no trombóticas, como es el caso de la afección hematológica, estas son reportadas con mayor frecuencia, siendo esta verificada y documentada recientemente en un estudio institucional donde se estudiaron las características clínicas y de laboratorios iniciales de los pacientes diagnosticados con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario.

Actualmente nuestro país se conoce poco del síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario en la población infantil, se sabe que dentro de su etiología se encuentran las características inmunogenéticas; específicamente los polimorfismos independientes de HLA que contienen genes de predisposición algunos asociados a inmunidad innata (IRF5, STAT4, IRANK1, TNFAIP3, SPP1, TLR4), la mayoría asociados a la vía de interferón alfa; y otros involucrados en la señalización linfocitaria como BANK-1, LYN, BLK que intervienen en la activación o supresión de las células B o T; todos ellos considerados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Si bien, estos solo se han estudiado en población adulta, mayoritariamente de origen caucásico y con enfermedades de tejido conectivo, no se ha logrado identificar un solo polimorfismo altamente relacionado con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario.

El STAT-4 rs7574865 es hasta ahora uno de los factores de transcripción más estudiados por su fuerte asociación con el desarrollo de entidades autoinmunes, sin embargo aún no se ha determinado la asociación que existe en el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario en población infantil de origen mestizo, así como la relación que guarda con el cuadro clínico al inicio y en la evolución de la enfermedad. Es por eso que dicha investigación se propone con la finalidad de caracterizar esta correlación inmunogenética con la expresión clínica al inicio y durante la evolución del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario en niños mexicanos.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

-Caracterizar el polimorfismo de nucleótido único STAT-4 rs7574865 en el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario en pacientes pediátricos atendidos en el servicio de Reumatología pediátrica en el Hospital Centro Médico Nacional La Raza “Dr. Gaudencio González Garza”.

#### **5. OBJETIVOS GENERAL.**

-Caracterización del polimorfismo de STAT-4 rs7574865 en pacientes pediátricos portadores de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario atendidos en el servicio de Reumatología pediátrica en el Centro Médico Nacional La Raza. “Dr. Gaudencio González Garza”.

##### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Identificar la presencia del polimorfismo de nucleótido único STAT-4 rs7574865 en pacientes pediátricos con diagnóstico de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario.
2. Correlacionar las manifestaciones clínicas iniciales con la presencia del polimorfismo de STAT-4 rs7574865.
3. Correlacionar las características de laboratorios iniciales con la presencia del polimorfismo de STAT-4 rs7574865.
4. Determinar el riesgo relativo de ser portador homocigoto o heterocigoto del polimorfismo de STAT-4 rs7574865.

##### **5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.**

1. Describir las características demográficas, clínicas, laboratorio y de tratamiento en pacientes pediátricos con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primarios

#### **6. MATERIAL Y MÉTODOS.**

##### **6.1 TIPO DE ESTUDIO.**

Descriptivo. Observacional, Retrospectivo, transversal.

## **6.2 UNIVERSO DE TRABAJO.**

Pacientes con diagnóstico de síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario, menores de 16 años en seguimiento por el servicio de Reumatología pediátrica del Hospital General CMN La Raza Dr. Gaudencio González Garza, hasta Enero del 2018.

## **6.3 LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO.**

- Departamento de Reumatología Pediátrica en UMAE Hospital General de CMN La Raza. “Dr. Gaudencio González Garza”.
- Unidad de investigación en inmunología e infectología en UMAE Hospital General de CMN La Raza. “Dr. Gaudencio González Garza”.

## **6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

- Pacientes menores de 16 años con diagnóstico de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos Primario de acuerdo a los Criterios de clasificación de SAAF de Alarcón-Segovia (1992) o con positividad para anticuerpos antifosfolípidos (Anticardiolipina IGG, IGM, anticoagulante lúpico) y manifestaciones clínicas atribuibles a estos; atendidos en el servicio de Reumatología pediátrica en el CMN La Raza Dr. Gaudencio González Garza.
- Pacientes con expediente completo.
- Para ser considerados en el estudio genético, todos los tutores de los menores participantes firmaran consentimiento informado.
- Pacientes diagnosticados y en seguimiento hasta el periodo de Enero 2018.

## **6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

- Pacientes con Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos Secundario.
- Pacientes mayores de 16 años.
- Pacientes con expediente incompleto.
- Pacientes que no autoricen su participación en el estudio.

## **6.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA.**

- No probabilístico y por conveniencia.

- Se incluyeron todos los pacientes con Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos Primario en seguimiento en el servicio de Reumatología pediátrica en CMN La Raza “Dr. Gaudencio González Garza” hasta Enero 2018.
- Muestra total: 22 pacientes.

## **6.7 VARIABLES DE ESTUDIO.**

Se incluyeron variables demográficas, hereditarias, manifestaciones clínicas, parámetros de laboratorio en pacientes con diagnóstico reciente de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario atendidos en el servicio de Reumatología Pediátrica en el CMN La Raza “Dr. Gaudencio González Garza”.

## **6.8 MÉTODOS.**

### **6.8.1 Determinación del polimorfismo del gen STAT4**

#### **6.8.1.1 Extracción de DNA**

La extracción de DNA genómico (gDNA) de las muestras se realizó con el kit comercial Pure Link™ (genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del producto a partir de 200  $\mu$ l de sangre periférica. El gDNA se valoró mediante el espectofotómetro NanoDrop 2000/2000c de ThermoFisher Scientific para medir la concentración y pureza de muestra.

#### **6.8.1.2 Integridad del DNA genómico**

Una vez cuantificado el gDNA se realizaron diluciones en cada una de las muestras para obtener una concentración final de 20 ng a fin de normalizarlas. Posteriormente se amplificó por PCR punto final un gen constitutivo (Beta-actina) con el fin de constatar la integridad de las mismas.

#### **6.8.1.3 Ensayo de Genotipificación mediante discriminación alélica**

Los ensayos de genotipificación se llevaron a cabo mediante discriminación alélica con sondas Taqman. Este ensayo se basa en la amplificación por PCR en tiempo real de un segmento del gen que contiene el polimorfismo de interés mediante oligonucleótidos y posterior discriminación alélica mediante sondas que poseen unido covalentemente un

compuesto fluorescente (colorante reportero), se emplearon dos sondas: una que contiene uno de los dos tipos de colorantes (VIC ó FAM) y es complementaria a la secuencia de uno de los alelos y la otra sonda posee el otro colorante y complementariedad por el otro alelo. Ambas sondas contienen una molécula que es capaz de unirse al surco menor del DNA (Minor Groove Binder, MGB) y que aumenta la especificidad de unirse exclusivamente a su alelo así como una molécula que “apaga” la fluorescencia (Non fluorescent quencher, NFQ).

Para la discriminación de alelos durante la amplificación por PCR deben de ocurrir los siguientes eventos: Cada una de las sondas debe unirse específicamente a su secuencia complementaria ubicada entre los sitios de unión de los primers sentido y antisentido. Si la sonda Taqman está intacta, la cercanía entre el colorante reportero y la molécula NFQ resulta en la supresión de la fluorescencia. La DNA polimerasa corta solo el extremo 5' de las sondas Taqman que se hibridaron en su sitio blanco. El corte enzimático separa el colorante reportero del “quencher”, lo cual resulta en un incremento en la fluorescencia específica para el reportero. Este incremento ocurre solo si la secuencia amplificada es complementaria a la sonda. Así, la señal fluorescente generada por el PCR indica a los alelos presentes en la muestra. El incremento en una sola señal de fluorescencia indica homocigocidad (para el alelo 1 ó el alelo 2) mientras que el incremento en ambas señales de fluorescencia indica heterocigocidad. Por lo tanto para llevar a cabo el ensayo se requiere de 2 oligonucleótidos (primers) para amplificar la región de interés y 2 sondas Taqman-MGB para llevar a cabo la discriminación de alelos.

#### **6.8.1.4 Procedimiento para la discriminación alélica**

En la determinación se utilizaron los ensayos prediseñados TaqMan® SNP Genotyping Assay, Life Technologies con número de referencia: rs7574865, que codifica la variante para el gen STAT4. Secuencia contexto:

TATGAAAAGTTGGTGACCAAATGT[G/T]AATAGTGGTTATCTTATTTTCAGTGG

Para la preparación de las muestras se mezclaron los siguientes reactivos con las cantidades indicadas.

Reactivos	Volumen/reacción	Concentración final
Taqman Genotyping Master Mix	12.5 µl	2X
SNP Genotyping assay mix	1.25 µl	20X
H <sub>2</sub> O destilada	1.25 µl	-
Templado de cDNA	10 µl	≈20 ng/reacción
Volumen total	25 µl	-

Se configuró el sistema Abi Prism 7300 SDS para llevar a cabo la amplificación por tiempo real bajo las siguientes condiciones: primera etapa de 10 minutos a 95 °C; en la segunda etapa consta de una desnaturalización por 15 segundos a 92°C y una hibridación/extensión de 1 minuto a 60 °C por 45 ciclos. Antes y después de la amplificación, se realizó una lectura de placa para medir la fluorescencia. En la lectura posterior el software SDS (Sequence Detection System) calculó las mediciones de fluorescencia realizadas durante la lectura de la placa y grafica los valores Rn basados en las señales de fluorescencia de cada pozo para determinar el genotipo de cada una de las muestras.

## 7. DEFINICIÓN DE VARIABLES.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	NIVEL DE MEDICIÓN	INDICADORES
Características demográficas	EDAD: Tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento de una persona.	EDAD: Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el diagnóstico de la enfermedad.	-Cuantitativas continuas. -Numérica	EDAD: en años.
	SEXO: Conjunto de seres pertenecientes a un mismo sexo: Sexo masculino y sexo femenino.	SEXO: Lo referido en el expediente clínico.	-Cualitativa nominal -Dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masculino</li> <li>• Femenino</li> </ul>
Manifestaciones clínicas	Conjunto de signos y síntomas que se presentan en un paciente a causa de una patología específica.	1. Trombosis. Manifestación trombotica venosa o arterial que se presente como una manifestación inicial en el paciente.	-Cualitativa -Nominal -Politémica	a. Venosa. -Trombosis venosa profunda en extremidades (especificar sitio_____) -Trombosis superficial.

			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Trombosis de la vena cava superior o inferior.</li> <li>-Tromboembolia pulmonar.</li> <li>-Trombosis del seno venoso cerebral.</li> <li>-Trombosis de las venas de la retina.</li> <li>-Síndrome de Budd-Chiari.</li> <li>-Hipoadrenalismo.</li> <li>-Edad de Addison.</li> </ul> <p>b. Arterial</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Isquemia arterial en extremidades (especificar sitio_____)</li> <li>-Ataque isquémico transitorio.</li> <li>-Encefalopatía isquémica aguda.</li> <li>-Trombosis de las arterias de la retina.</li> <li>-Trombosis de la arteria renal.</li> <li>-Trombosis microangiopática renal.</li> <li>-Infarto agudo al miocardio.</li> <li>-Infarto hepático.</li> <li>-Trombosis de la arteria mesentérica.</li> <li>-Infarto en hueso.</li> </ul>
		2. Hematológico. Manifestación hematológica que se presente de manera inicial en el paciente	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Trombocitopenia. (Menos de <math>150 \times 10^9/L</math>)</li> <li>b. Anemia hemolítica autoinmune (prueba de Coombs positiva y reticulocitosis)</li> <li>c. Leucopenia (Menos de <math>4.5 \times 10^9/L</math>)</li> <li>d. Linfopenia (Menos de <math>1.5 \times 10^9/L</math>)</li> <li>e. Síndrome de Fisher Evans (AHA1 + Trombocitopenia Menos de <math>150 \times 10^9/L</math>)</li> <li>f. Síndrome de anticoagulante lúpico con hipoprotrombinemia (anticoagulante lúpico positivo + actividad de factor II menor del 50%).</li> </ul>
		3. Dermatológico. Manifestación dermatológica que se presente como manifestación inicial en el paciente.	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Livedo reticularis</li> <li>b. Úlceras cutáneas</li> <li>c. Fenómeno de Raynaud.</li> </ul>

		4. Neurológico. Manifestación neurológica que se presente como manifestación inicial en el paciente.		a. Epilepsia b. Migraña c. Corea d. Defectos cognitivos e. Enfermedades psiquiátricas (especificar _____) f. Mielitis transversa g. Esclerosis múltiple like. h. Pérdida de audición neurosensorial. i. Síndrome de Guillian-Barré.
		5. Otras manifestaciones. Otras manifestaciones (cardiacas, pulmonares, renales, osteomusculares y abortos) que se presenten de manera inicial en el paciente.		a. Enfermedad valvular cardiaca b. Oclusión coronaria c. Trombosis intracardiaca d. Cardiomiopatía e. Endocarditis de Libman-Sacks f. Infarto pulmonar g. Nefropatía asociada a síndrome antifosfolípidos h. Necrosis avascular de hueso. i. Fracturas no traumáticas j. Abortos espontáneos.
Exámenes de laboratorios	1. Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa). Mide la actividad de la vía intrínseca (actividad factor IX) y de la vía común (factor II, X y cofactores) de la cascada de coagulación	1. Tiempo parcial de tromboplastina activada. <ul style="list-style-type: none"> <li>Normal si se encuentra dentro de los rangos establecidos para el testigo</li> <li>Prolongado si es mayor al reportado para el testigo y no corrige con diluciones.</li> </ul>	-Cualitativa -Nominal -Dicotómica	1. Tiempo parcial de tromboplastina activada. <ul style="list-style-type: none"> <li>Normal (14 seg o menos)</li> <li>Prolongado. (más de 14 seg)</li> </ul>
	2. Anticoagulante lúpico (AL). Autoanticuerpo de clase IgA, IgG o IgM se comporta con un inhibidor adquirido de la coagulación, prolonga las pruebas de la coagulación dependientes de fosfolípidos in vitro y confiere mayor riesgo de trombosis in vivo.	2. Anticoagulante lúpico. Positivo en más de 2 ocasiones con diferencia de 12 semanas.		2. Anticoagulante lúpico. <ul style="list-style-type: none"> <li>Positivo (mayor a 1.2 ratios)</li> <li>Negativo (menor a 1.2 ratios)</li> </ul>
	3. Anticardiolipinas (ACL) anticuerpos	3. Anticardiolipinas. <ul style="list-style-type: none"> <li>Negativas. Cuando</li> </ul>		3. Anticardiolipinas <ul style="list-style-type: none"> <li>Positivo.</li> </ul>

	que reconocen y atacan la cardiolipina, un tipo de fosfolípido cagado negativamente que se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias. Inmunoglobulina adquirida asociada a la formación de coágulos.	<p>se determinan los isotipos IgG e IgM y se reportan negativas de acuerdo a los rangos establecidos por el laboratorio.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivas. Cuando se determinan los isotipos IgG o IgM y se portan positivas con títulos moderados o altos de acuerdo a los rangos establecidos por el laboratorio en 2 determinaciones con diferencia de 12 semanas.</li> </ul>		<p>(aCLlgG) Positivo moderado: 31-50 GPL U/ml Positivo alto: mayor 50 GPL U/ml</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo. (aCLlgM) Positivo moderado: 11-15 MPL U/ml Positivo alto: mayor 15 MPL U/ml</li> <li>• Negativo. (aCLlgG) Negativo: Menor de 20 GPL U/ml Positivo bajo: 20-30 GPL U/ml</li> <li>• Negativo (aCLlgM) Negativo: Menor de 7 MPL U/ml Positivo bajo: 7-10 MPL U/ml</li> </ul>
	4. VDRL (Venereal Disease Research Laboratory). Prueba de fluctuación que determina anticuerpos antitreponémicos mediante el antígeno de cardiolipinas. Puede reportarse de forma cualitativa o cuantitativa.	4. VDRL <ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo. Cuando la prueba de determinación se reporta negativa.</li> <li>• Positivo. Cuando la prueba de determinación se reporta positiva</li> </ul>		4. VDRL <ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo: (positivo)</li> <li>• Negativo: (negativo)</li> </ul>
Determinación de polimorfismo STAT-4 rs7574865	Homocigoto (GG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dos células sexuales que tienen la misma dotación genética</li> </ul>	-Cualitativa -Nominal -Dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo. (presente)</li> <li>• Negativo. (ausente)</li> </ul>
	Homocigoto (TT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dos células sexuales que tienen la misma dotación genética</li> </ul>		
	Heterocigoto (GT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dos células sexuales que tienen diferentes dotaciones genéticas</li> </ul>		

Tratamiento	Conjunto de medios que se utilizan para aliviar o curar una enfermedad.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tratamiento que recibió el paciente con diagnóstico de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario al inicio de la enfermedad.</li> </ul>	-Cualitativa -Nominal -Dicotómica	1. Anticoagulante: <ul style="list-style-type: none"> <li>Si</li> <li>No</li> </ul> 2. Antiagregante plaquetario: <ul style="list-style-type: none"> <li>Si</li> <li>No</li> </ul> 3. Inmunosupresor: <ul style="list-style-type: none"> <li>Si</li> <li>No</li> </ul> 4. Esteroides: <ul style="list-style-type: none"> <li>Si</li> <li>No</li> </ul> 5. Terapia biológica. <ul style="list-style-type: none"> <li>Si</li> <li>No</li> </ul>
-------------	---	--	---	---

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

- Se utilizará estadística descriptiva con cálculo de media, frecuencias, porcentajes de las características clínicas y de laboratorio. (se expresaran en gráficas y tablas). Pruebas no paramétricas: cálculo de Odds Ratio (OR); Chi cuadrada, prueba T y U de Mann-Whitney.
- Se usará el programa Microsoft Excel 2018 para la captura de datos de cada paciente.
- Con el programa SPSS versión 15 se realizará el análisis estadístico de los resultados.
- Se utilizará el algoritmo FINNET1 (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg (HEM) para la distribución genotípica de los casos y controles. Para evaluar las diferencias de genotipo y frecuencias alélicas se utilizará prueba de Chi cuadrada. Se calculará la razón de probabilidades (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC del 95%); los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 9. DESCRIPCION DEL ESTUDIO.

Del registro de hospitalización y consulta externa del servicio de Reumatología pediátrica en el CMN La Raza Dr. Gaudencio González Garza se identificaron los pacientes con diagnóstico de Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario y aquellos que cumplieron con los criterios de inclusión se realizará revisión del expediente clínico.

En la hoja de recolección de datos (anexo 1), se obtendrá la información de las características demográficas, clínicas, datos de laboratorio y tratamiento iniciales de los pacientes atendidos en el servicio de Reumatología pediátrica en el CMN La Raza Dr. Gaudencio González Garza.

Una vez identificados, se les solicitará 2 ml de sangra periférica para la determinación del polimorfismo de nucleótido único de STAT-4 rs7574865 por métodos de biología molecular. Se utilizara un grupo control con muestras de 22 pacientes sin enfermedad reumatológica con fines comparativos.

## **10. RECURSOS HUMANOS.**

### **10.1 Recursos humanos.**

- a) Asesor de tesis Dr. Alfonso Ragnar Torres Jiménez, médico adscrito al servicio de Reumatología pediátrica de la UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Diseña protocolo, analizará los resultados, realizará discusión y conclusiones, valorará la posibilidad de publicación.
- b) Asesora de tesis Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez encargada de la unidad de investigación en inmunología e infectología (UIMEII) Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Recepción de muestras sanguíneas, realiza extracción y procesamiento del ADN, analizará los resultados, realizará discusión y conclusiones, valorará la posibilidad de publicación.
- c) Tesista Dra. Virginia Ramírez Nova residente de 2do año de la subespecialidad médica Reumatología pediátrica de la UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Elabora protocolo, revisará los expedientes y capturará los datos en la hoja de recolección.

### **10.2 Recursos materiales.**

- a) La hoja de recolección de datos será financiada por los investigadores para la recolección de datos de los expedientes de los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primarios atendidos en el servicio de Reumatología pediátrica de la UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del

Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, lo cual no generará mayor gasto para el hospital.

- b) El método para realizar la extracción de DNA. Se cuenta con un kit comercial para la extracción de DNA a partir de sangre periférica.
- c) En la unidad de investigación cuenta con equipo para detección del polimorfismo STAT-4 rs7574865 utilizando las sondas TaqMan®
- d) Hoja de recolección de datos y consentimiento y asentimiento.

### **10.3 Recursos económicos.**

Se pretende someter el protocolo para financiamiento al fondo de investigación en salud (FIS) para competir por recursos.

### **10.4 Factibilidad.**

En el servicio de Reumatología pediátrica de la UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS se atienden pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario con edades entre 1 mes y 16 años por lo que es factible realizar el estudio, se cuenta con un archivo para obtener expediente, así como el sistema electrónico para consulta de resultados de laboratorio.

Además que se tendrá el apoyo por parte de la unidad de investigación del hospital de Infectología para la detección del polimorfismo de interés.

## 11. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

ACTIVIDAD	MES	AGO 2018	SEP 2018	OCT 2018	NOV 2018	DIC 2018	ENERO 2019
BÚSQUEDA BIBLIOGRAFICA	PROYECTADO	XXX					
ELABORACIÓN Y REVISIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	PROYECTADO		XXX	XXX	XXX		
REVISIÓN POR COMITÉ Y REELABORACIÓN DE PROTOCOLO	PROYECTADO		XXX	XXX	XXX		
RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	PROYECTADO					XXX	
RECOPIACIÓN DE DATOS	PROYECTADO					XXX	
ANÁLISIS DE LOS DATOS Y ELABORACION DE TESIS	PROYECTADO					XXX	
ENTREGA DEL PROYECTO	PROYECTADO						XXX

## 12. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El presente estudio no viola ninguno de los principios básicos de la investigación científica en seres humanos, establecido en la Asamblea Médica Mundial de la declaración de Helsinki en Finlandia junio de 1964, y enmendada por la 29 asamblea medica Mundial de Tokio Japón octubre de 1975; 35va asamblea Medica Mundial de Venecia, Italia en octubre de 1983 y 41va asamblea Medica Mundial de Hong Kong en septiembre de 1989, ni en la última revisión de la 48va asamblea de Somerset West, Sudáfrica, octubre de 1996, y la 52va asamblea general de Edimburgo, escocia; octubre de 2000.

Nota de clarificación del párrafo 29, agregada por la asamblea general de la AMM Washington del 2002. Nota de clarificación párrafo 30, agregada por la asamblea de la AMM, Tokio 2004, y la 59 asamblea general, Seúl, Korea en octubre del 2008, así como la ley general de Salud de la República Mexicana.

Por otra parte la investigación se apega a la ley general de salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de investigación para la salud publicada DOF 27-01-2017; y las normas dictadas por el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Esta investigación no trasgrede, el principio del respeto a las personas, de beneficencia y justicia que rigen la investigación clínica, ya que se apegara a la ley general de salud de los Estados Unidos Mexicanos , en materia de investigación para la salud (Título quinto) y las normas dictadas por el Instituto Mexicano del Seguro social para este mismo fin.

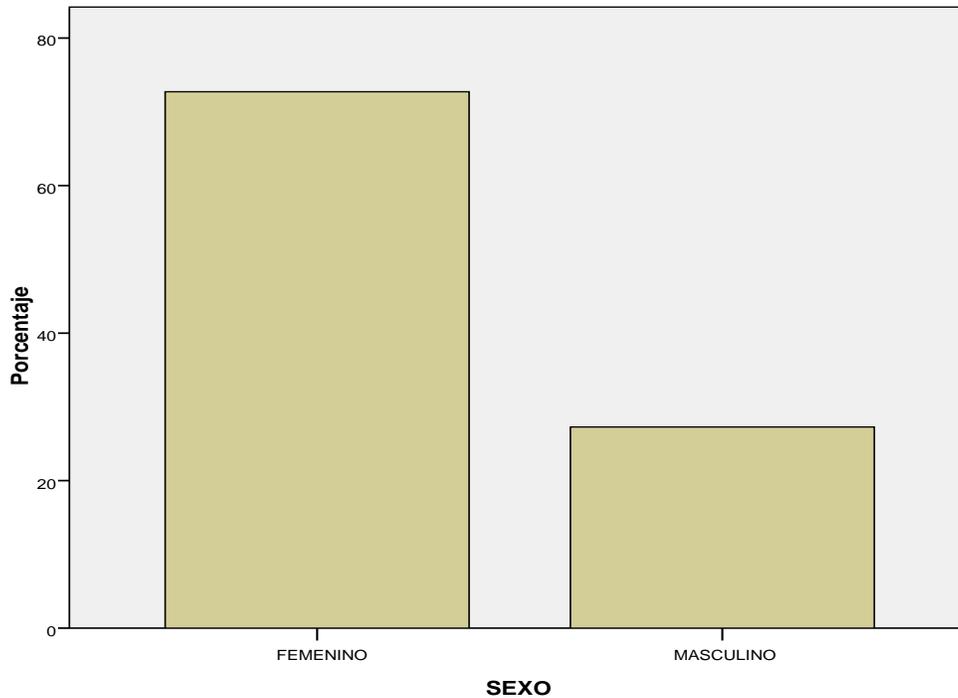
### **13. CONFIDENCIALIDAD.**

Estudio con riesgo mínimo, se utilizarán los expedientes de los pacientes con diagnóstico de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido primario en niños, para poder hacer uso de la información del expediente se pedirá la autorización de ambos padres del paciente o representante legal del paciente, se procederá a obtener la información si se autoriza el uso de la misma; se garantizará la confidencialidad de los datos del paciente, por lo que la información estará accesible únicamente a personal autorizado en base a la Organización Internacional de Estandarización (ISO) en la norma ISO/IEC 27002.

## 14. RESULTADOS

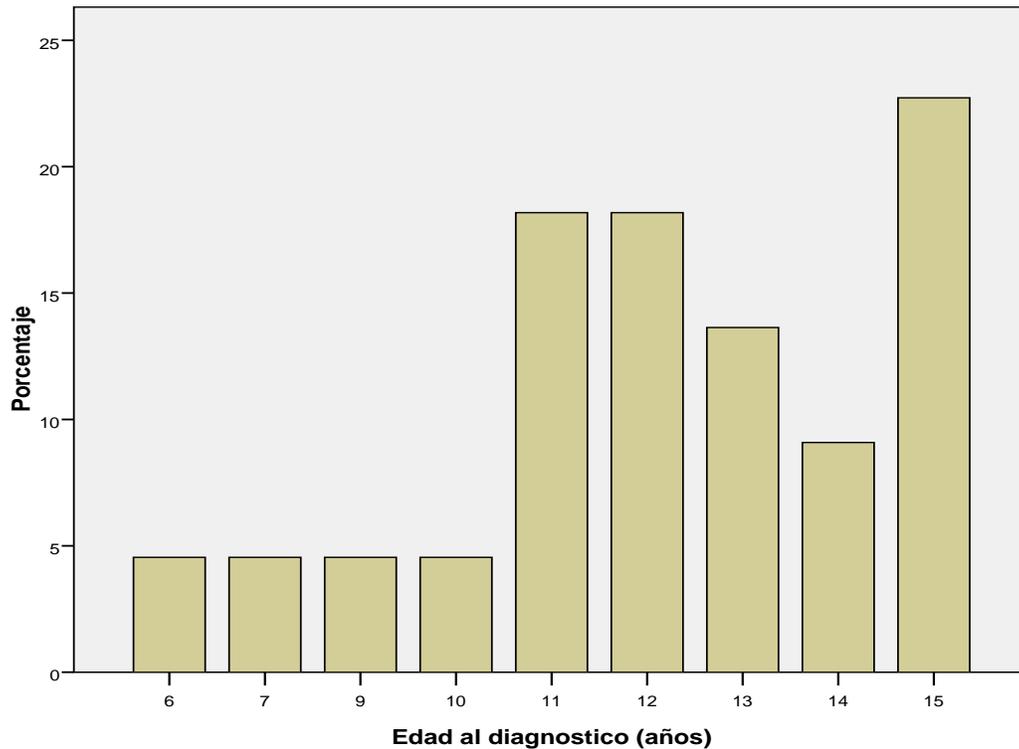
Se estudiaron un total de 22 pacientes pediátricos con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario (SAAF); de los cuales 16 (72.7%) fueron de sexo femenino y 6 (27.3%) de sexo masculino, con una relación hombre:mujer de 1:2.6 (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Sexo de pacientes pediátricos diagnosticados con SAAF primario**



La edad al diagnóstico (en años) resultó con una media de 12 años. La edad mínima al momento del diagnóstico fue de 6 años y la máxima de 15 años, con la siguiente frecuencia: 6 años (5%); 7 años (5%), 9 años (5%), 10 años (5%), 11 años (18%), 12 años (18%), 13 años (14%), 14 años (9%) y 15 años (23%). (Gráfico 2)

**Grafico 2. Edad al diagnóstico (años)**

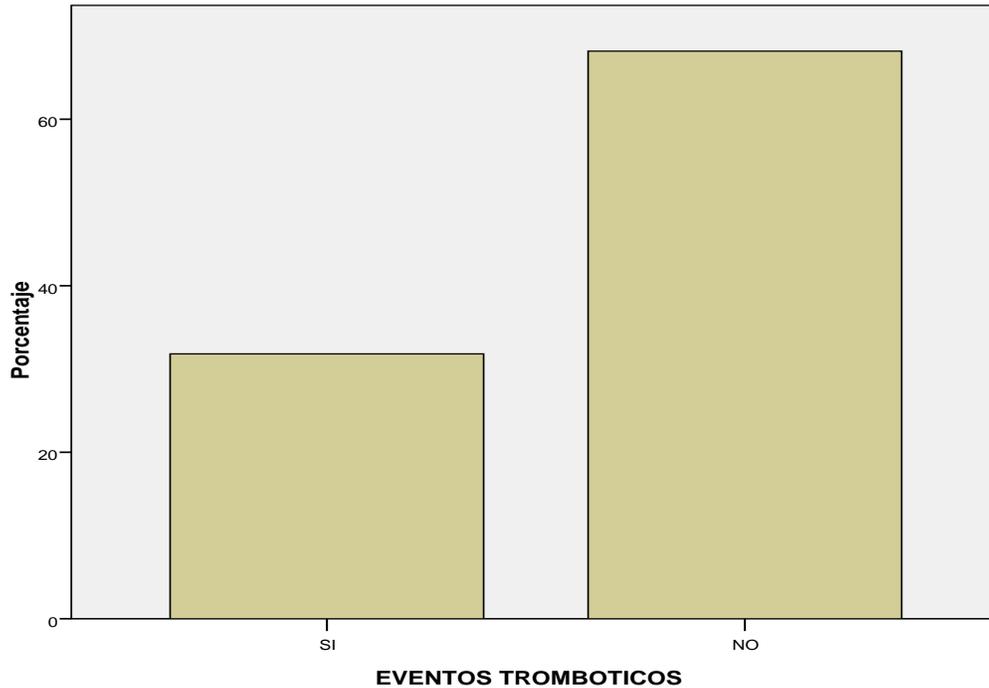


En cuanto al tiempo de evolución al diagnóstico (en semanas) tuvo una media de 18.5 semanas. Un mínimo de 1 semana con un máximo de 108 semanas.

**Manifestaciones clínicas.**

De acuerdo a las características clínicas, de los 22 pacientes solo 7 pacientes (31.8%) tuvieron eventos trombóticos y 15 pacientes (68.2%) eventos no trombóticos. Del 31.8% que presentaron trombosis el 100% fueron venosos. (Grafico 3). Del total de pacientes que se trombosaron 4 (18.2%) fueron en un solo sitio y 3 pacientes en dos o más sitios (13.6%). Los sitios anatómicos de trombosis venosa fueron en vena cava 1 paciente (4.5%), a nivel femoral 3 pacientes (13.6%); extremidades inferiores y tromboembolia pulmonar 2 pacientes (9.1%), renal y vena cava inferior 1 paciente (4.5%).

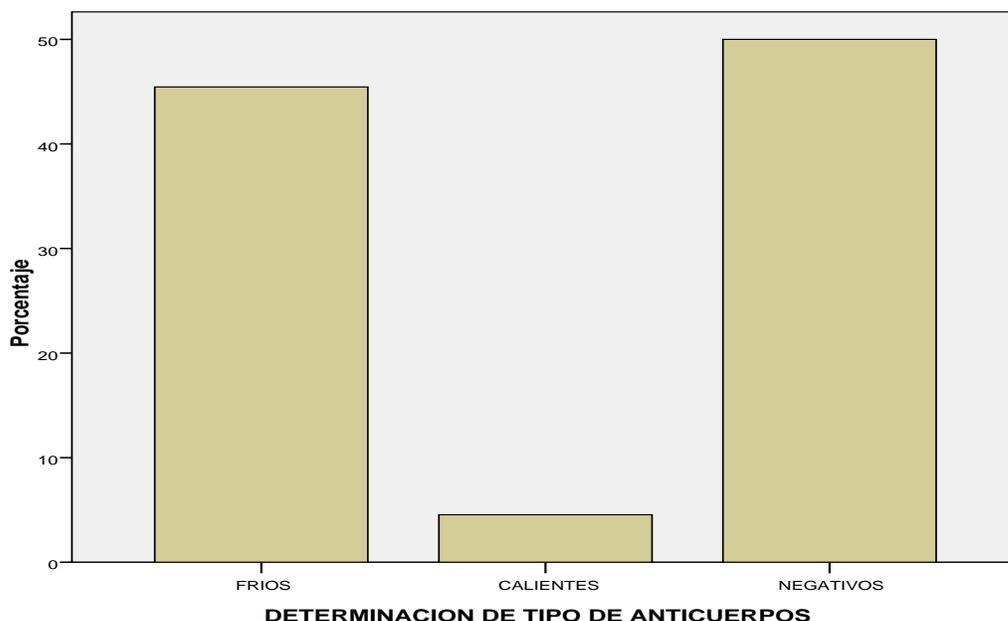
**Grafico 3. Eventos trombóticos en pediátricos con SAAF primario**



En cuanto a las manifestaciones no trombóticas, la trombocitopenia se presentó en 11 pacientes (50%). Con una media de 101,000 cel/mm<sup>3</sup>; conteo mínimo plaquetario de 23,000 cel/mm<sup>3</sup>, una máxima de 369,000 cel/mm<sup>3</sup>. De estos 4 pacientes (18.2%) se asociaron a anemia hemolítica autoinmune (síndrome de Fisher Evans).

11 de los 22 pacientes (50%) presentaron anemia hemolítica. De estos 4 pacientes (18.2%) se asociaron a síndrome de Fisher Evans. 10 pacientes cursaron con anemia hemolítica autoinmune (AHA) por anticuerpos fríos, 1 paciente con AHA por anticuerpos calientes (4.5%). (Grafico 4)

**Gráfico 4. Tipo de anticuerpos en Anemia hemolítica autoinmune en pediátricos con SAAF primario**



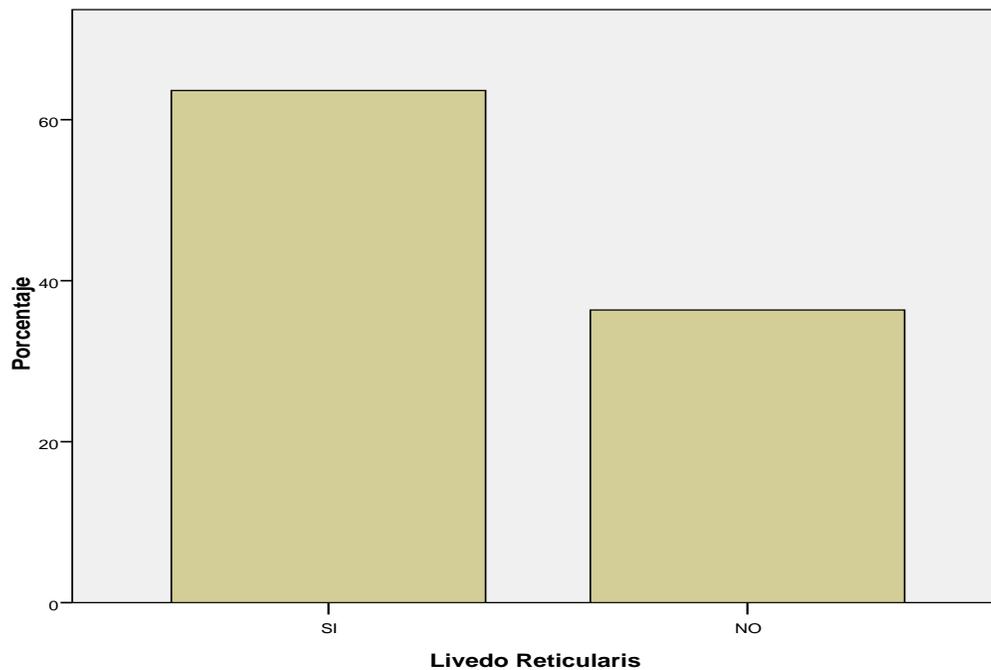
La leucopenia se presentó en 2 pacientes (9.1%) de los 22 pacientes. Con una media de 7800.91 cel/mm<sup>3</sup>; cuenta mínima de leucocitos de 2770 cel/mm<sup>3</sup> y una cuenta máxima de 15460 cel/mm<sup>3</sup> leucocitos. Tres pacientes (13.6%) presentaron linfopenia. Con una media de 2267 cel/mm<sup>3</sup>, una cuenta linfocitaria mínima de 660 cel/mm<sup>3</sup> y una máxima de 5650 cel/mm<sup>3</sup>.

Los sangrados/equimosis se presentaron en 9 pacientes (40.9%), de los cuales 7 pacientes (31.8%) cursaron con trombocitopenia y 2 pacientes (9%) con hipoprotrombinemia. El sangrado uterino anormal lo presentaron 5 mujeres (22.7%), que representa el 37.5% del total de mujeres con diagnóstico de SAAF primario.

Se reportaron 3 pacientes (13.6%) con síndrome de anticoagulante lúpico con hipoprotrombinemia. La hipocomplementemia se presentó en 13 pacientes (59.1%). La fracción de complemento C4 bajo 6 pacientes (27.3%), C3 y C4 bajos 7 pacientes (31.8%). Complemento normal en 9 pacientes (40.9%).

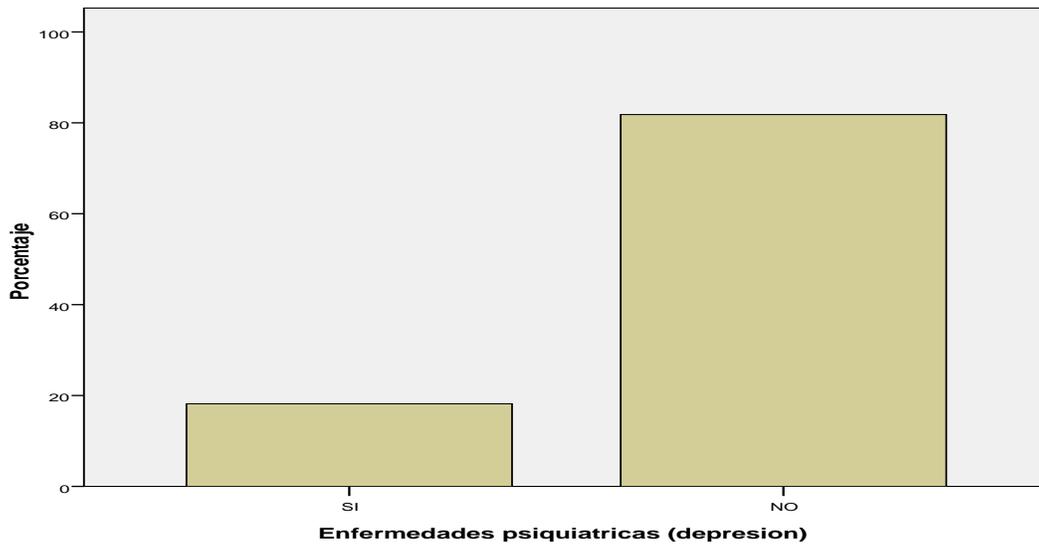
En cuanto a las manifestaciones cutáneas la más frecuente fue el livedo reticularis que se presentó en 14 pacientes (63.6%). (Gráfico 5) El fenómeno de Raynaud se presentó en 5 pacientes (22.7%) y úlceras orales en 2 pacientes (9.1%).

**Gráfico 5. Livedo reticularis en pediátricos con SAAF primario**



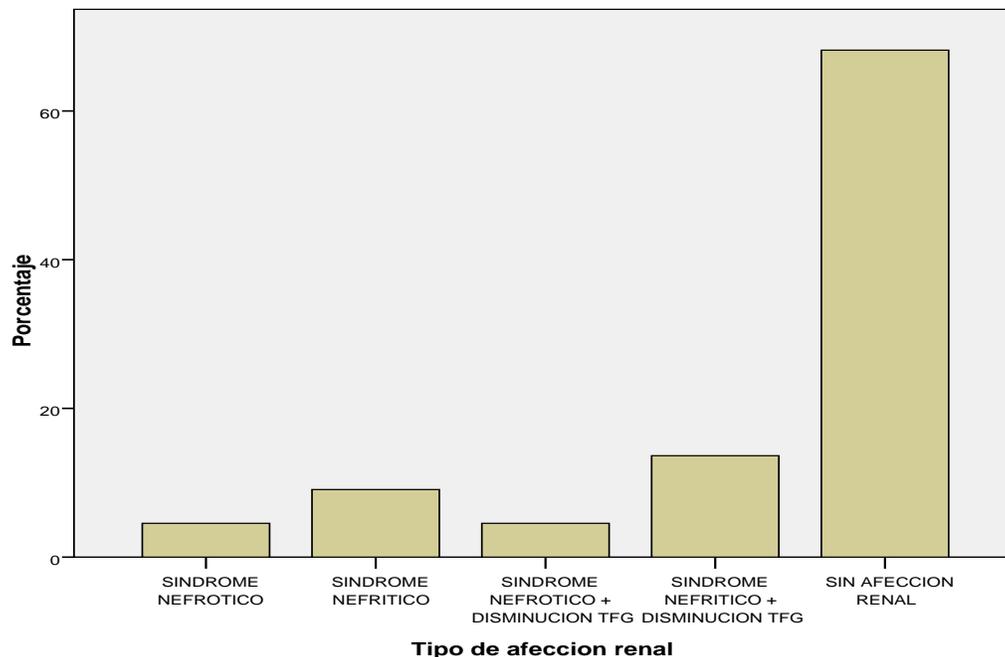
Con respecto a las manifestaciones neurológicas la depresión fue la más frecuente en 4 pacientes (18.2%) (Gráfico 6); defectos cognitivos 3 pacientes (13.6%), migraña 3 pacientes (13.6%), epilepsia 1 paciente (4.5%), corea 1 paciente (4.5%), pérdida de la visión 1 paciente (4.5%).

**Gráfico 6. Depresión en pediátricos con SAAF primario**



Entre las manifestaciones renales el síndrome antifosfolípidos asociado a nefropatía se presentó en 7 pacientes (31.8%). De acuerdo al tipo de afección renal, la más frecuente fue el síndrome nefrítico con disminución de la tasa de filtrado glomerular con 3 pacientes (13.6%), 2 pacientes con síndrome nefrítico (9.1%), 1 paciente con síndrome nefrítico (4.5%), síndrome nefrítico con disminución de la tasa de filtrado glomerular (4.5%). (Gráfico 7). No se reportaron manifestaciones cardíacas.

**Gráfico 7. Tipo afección renal en pediátricos con SAAF primario**



## **HALLAZGOS DE LABORATORIO**

En cuanto a los resultados de laboratorio la prolongación del TTPA se presentó en 21 pacientes (95.5%) con una media de 71.4 segundos, un tiempo mínimo de 27 segundos y un tiempo máximo de 124 segundos.

El anticoagulante lúpico se reportó positivo en 22 pacientes (100%). Con una media de 2.0 ratios, un valor mínimo de 1.30 ratios y un máximo de 2.48 ratios.

La determinación de anticardiolipina IgG se reportó positiva en 17 pacientes (77.3%) y negativa en 5 pacientes (22.7%). Con una media de 99.7 GPL U/ml, con un valor mínimo de 6 GPL U/ml y máximo de 280GPL U/ml.

La anticardiolipina IgM se reportó positiva en 13 pacientes (59.1%) y negativa en 9 pacientes (40.9%). Con una media 43.5 GPL U/ml, un valor mínimo de 2 GPL U/ml y máximo de 255 GPL U/ml.

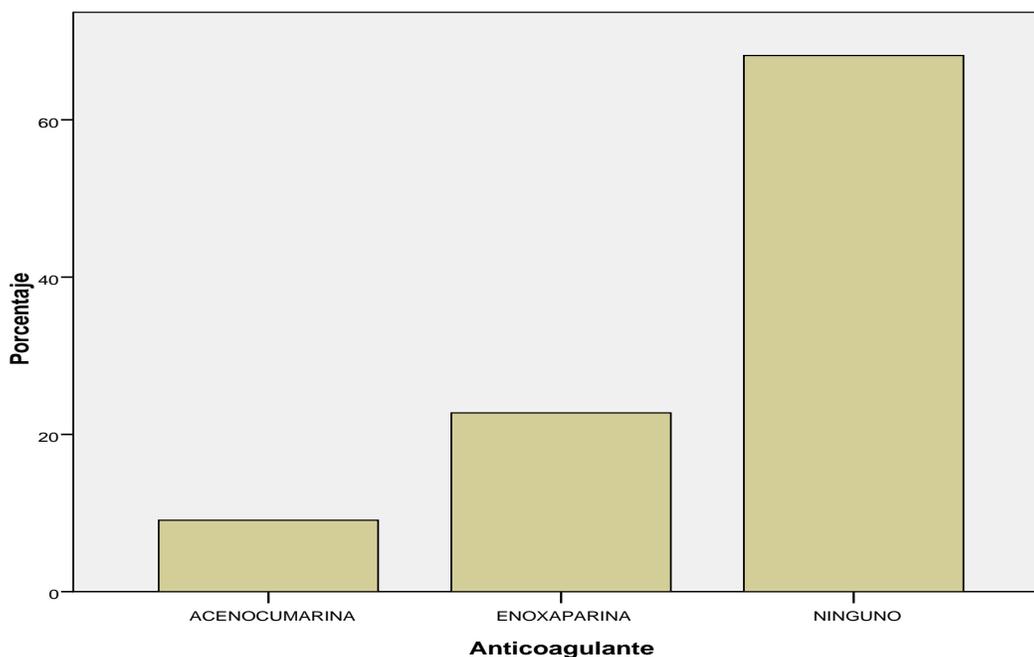
La determinación de Beta-2-glicoproteína I se realizó solo en 3 pacientes (13.6%) con un resultado positivo. No se realizó en 19 pacientes (86.4%) por falta de reactivo en la institución.

La determinación de VDRL se realizó en 2 pacientes (9.1%) reportándose positivas, en 20 pacientes (90.9%) no se realizó por falta de reactivo en la institución.

## **TRATAMIENTO INICIAL**

De los 22 pacientes la terapia con anticoagulante solo se indicó en 7 pacientes (31.8%) y no fue necesaria en 15 pacientes (68.2%). En 2 pacientes (9.1%) utilizaron acenocumarina, en 5 pacientes (22.7%) con enoxaparina. (Grafico 8)

**Gráfico 8. Anticoagulantes utilizados en pediátricos con SAAF primario**

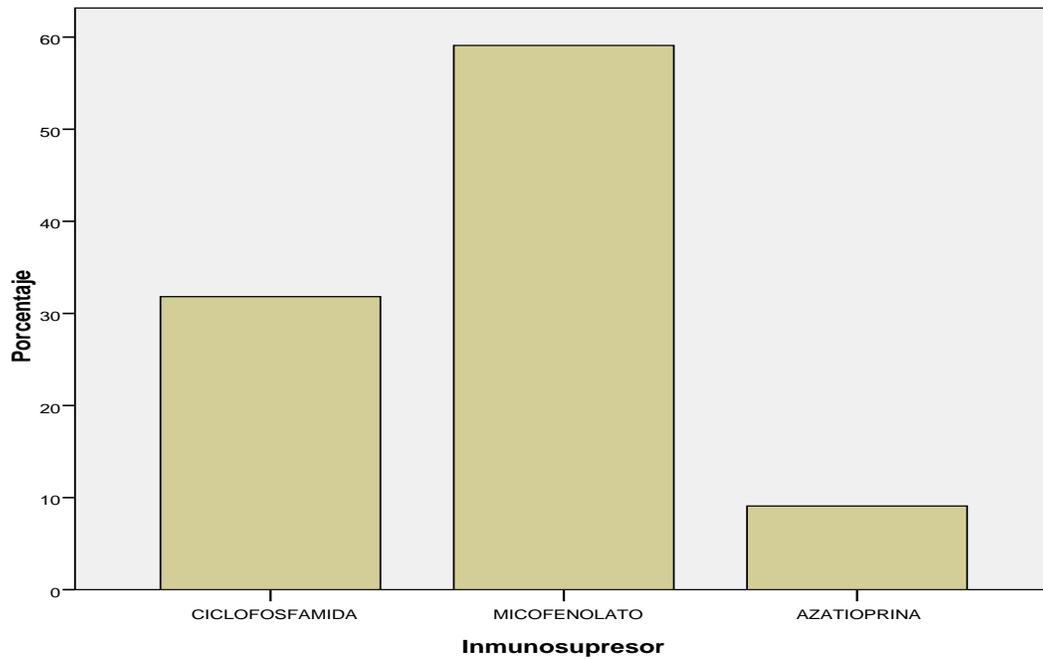


El uso de antiagregante plaquetario (ácido acetilsalicílico) fue necesario en 16 pacientes (72.7%) y no se indicó en 6 pacientes (27.3%).

El 100% utilizaron esteroide, 19 pacientes (86.4%) se trataron con pulsos de metilprednisolona seguido de prednisona (1mg/kg/día) y 3 pacientes (13.6%) únicamente prednisona vía oral.

El 100% utilizó inmunosupresor al inicio del tratamiento; 7 pacientes con ciclofosfamida (31.8%) por comorbilidad hematológica y trombosis. 13 pacientes con micofenolato (59.1%) y 2 pacientes con azatioprina (9.1%). (Grafico 9)

**Gráfico 9. Inmunosupresores utilizados en pediátricos con SAAF primario**



La terapia biológica con Rituximab solo fue necesaria en 2 pacientes (9.1%) por trombocitopenia refractaria y síndrome de Fisher-Evans.

## **DETERMINACIÓN ALÉLICA Y DEL GENOTIPO**

La determinación del polimorfismo STAT-4 (rs7574865) se realizó en los 22 pacientes; presentando una frecuencia del alelo G del 0.32 y del alelo T del 0.68, los controles con una frecuencia del alelo G y alelo T del 0.45. La mutación homocigota en los casos fue encontrada en 10 pacientes (45.5%) y la mutación heterocigota en 10 pacientes (45.5%) en comparación con los controles donde se encontraron 10 heterocigotos (45.4) y 5 homocigotos (22.7%). (Tabla 1)

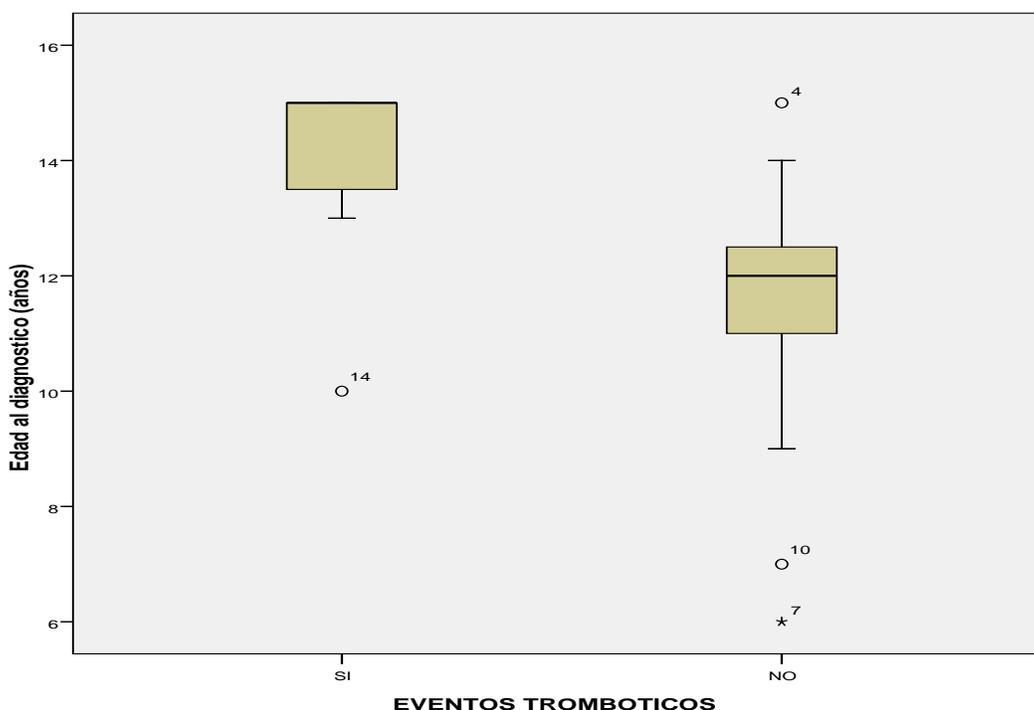
**Tabla 1. Determinación de genotipo y frecuencia alélica de SNP STAT-4 (rs7574865) en pediátricos con SAAF primario y controles.**

<b>Gen</b>	<b>ID SNP</b>	<b>Genotipo n(%)</b>			<b>n(Frecuencia del Alelo)</b>	
		<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
<b>STAT4</b>	<b>rs7574865</b>					
	Casos (n = 22)	2(9.09)	10(45.5)	10(45.5)	14(0.32)	30(0.68)
	Controles (n = 22)	7(31.8)	10(45.4)	5(22.7)	24(0.55)	20(0.45)

## 14.1 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS.

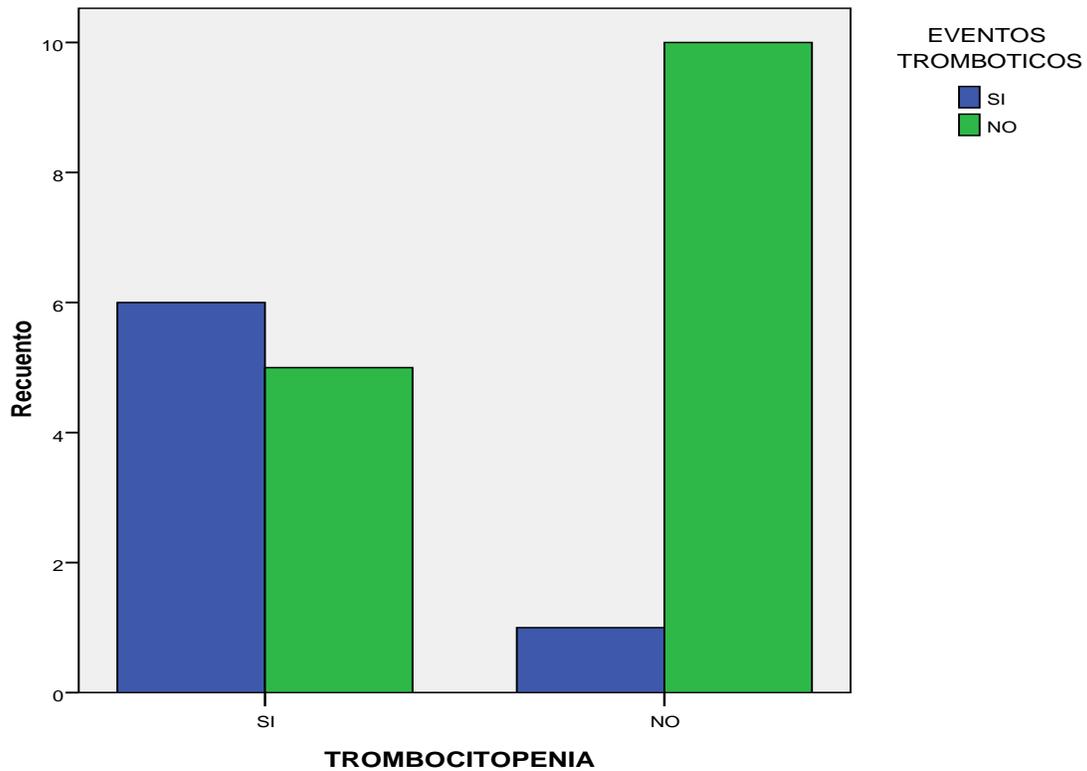
Con respecto a la edad al diagnóstico (en años) y la presencia de eventos tromboticos tuvo una media de 13.8 (10-15 años) vs 11.2 (6-15 años) con los que no se trombosan, por lo tanto se comprobó que los pacientes que se trombosan tienen más edad que los que no sufren eventos tromboticos. ( $p=0.015$ ) (Grafico 10)

**Gráfico 10. Eventos tromboticos y edad al diagnóstico (años) en pediátricos con SAAF primario**



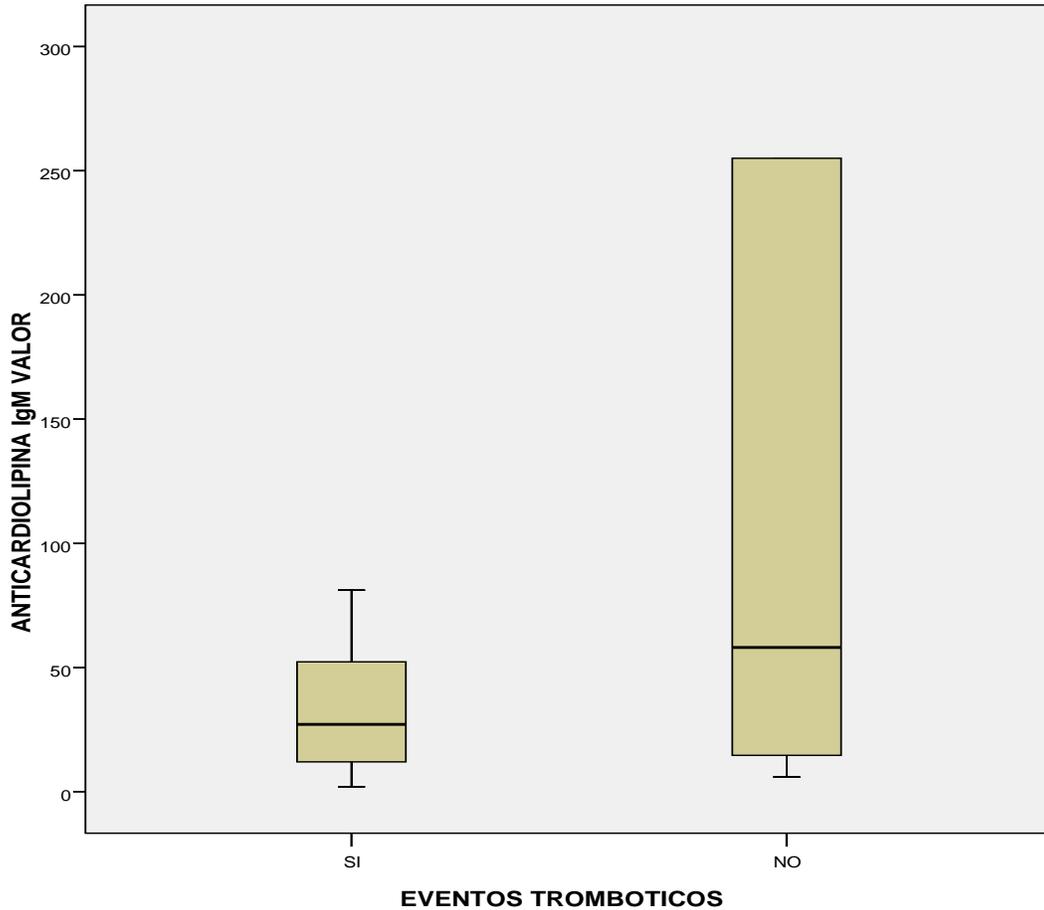
Al comparar los niveles de plaquetas con los eventos tromboticos no se obtuvo significancia estadística; sin embargo la trombocitopenia se asoció con los eventos tromboticos con una estimación de riesgo relativo (RR) de 12 (IC 95% 1.11-128.8;  $p=0.022$ ). Con una media de plaquetas 101,000 cel/mm<sup>3</sup> (23,000mm<sup>3</sup>-369000mm<sup>3</sup>) vs 166,466 cel/mm<sup>3</sup> (26000mm<sup>3</sup>-399000mm<sup>3</sup>) con los que no presentaron trombocitopenia. (Grafico 11).

**Grafico 11. Eventos trombóticos y trombocitopenia en pediátricos con SAAF primario**



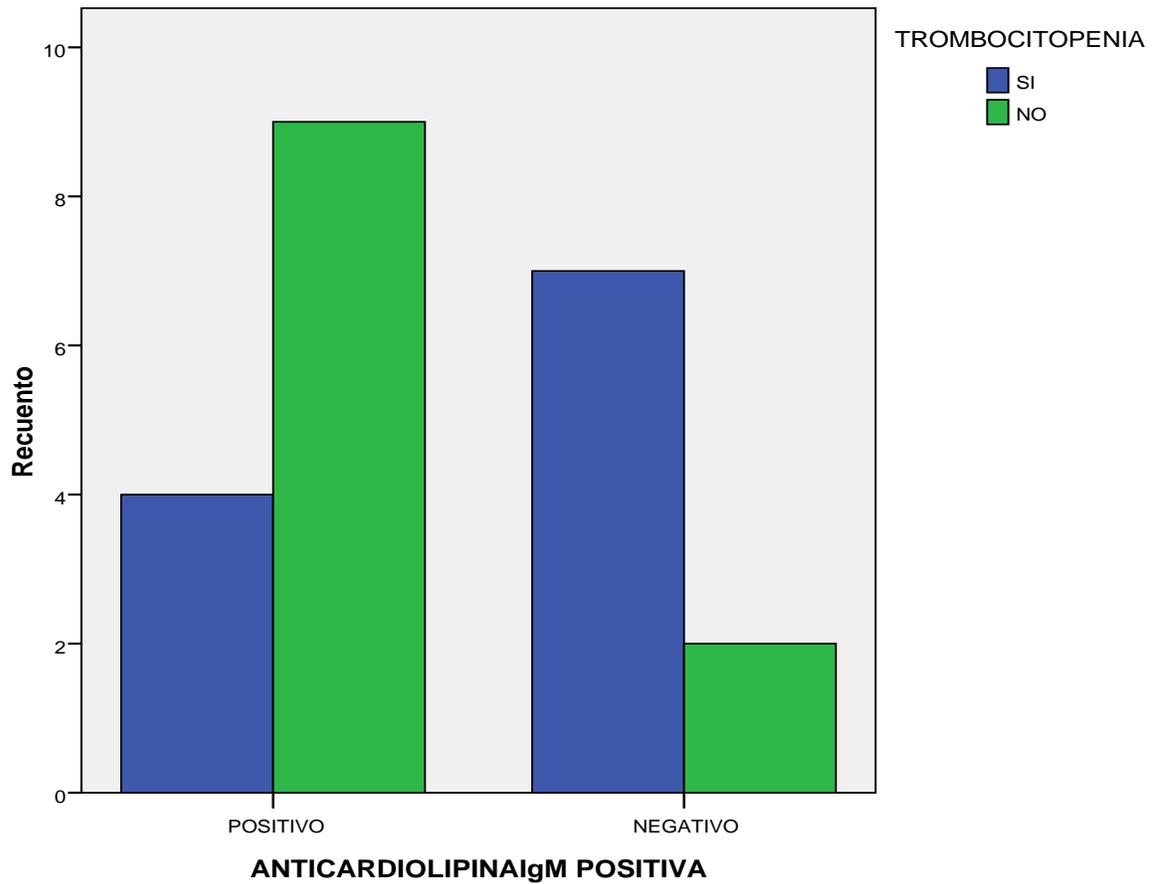
Los niveles bajos de anticardiolipina IgM se correlacionaron a eventos trombóticos ( $p=0.013$ ); es decir los niveles elevados no se correlacionan con trombosis. Con una media de 34.13 GPL U/ml (2-81 GPL U/ml) vs 120.4GPL U/ml (6-255 GPL/ml) con respecto a los que no tuvieron trombosis. (Grafico 12)

**Grafico 12. Eventos trombóticos/Niveles de anticardiolipina IgM en pediátricos con SAAF primario**



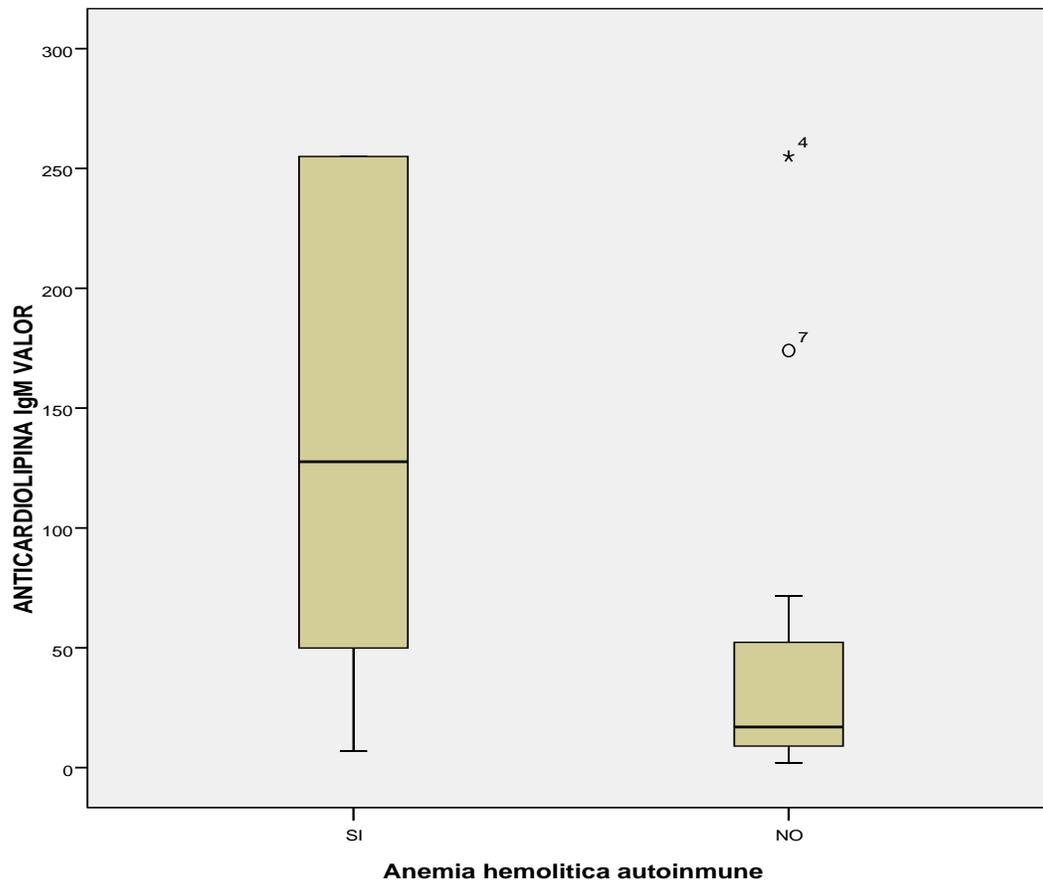
En cuanto a la relación entre los niveles de anticardiolipina IgM y la trombocitopenia se encontró que a mayores niveles de anticardiolipina IgM existe menor riesgo para desarrollar trombocitopenia, con una media de anticardiolipina IgM en pacientes con trombocitopenia de 43.5 (2-255 MPL U/ml) vs 142.44 (6-255 MPL U/ml) con los pacientes sin trombocitopenia. Con un riesgo relativo de 0.127 (0.018-0.905;  $p=0.030$ ), utilizando R de Spearman con RR -0.462. (Grafico 13)

**Grafico 13. Trombocitopenia/Niveles de anticardiolipina IgM en pediátricos con SAAF primario**



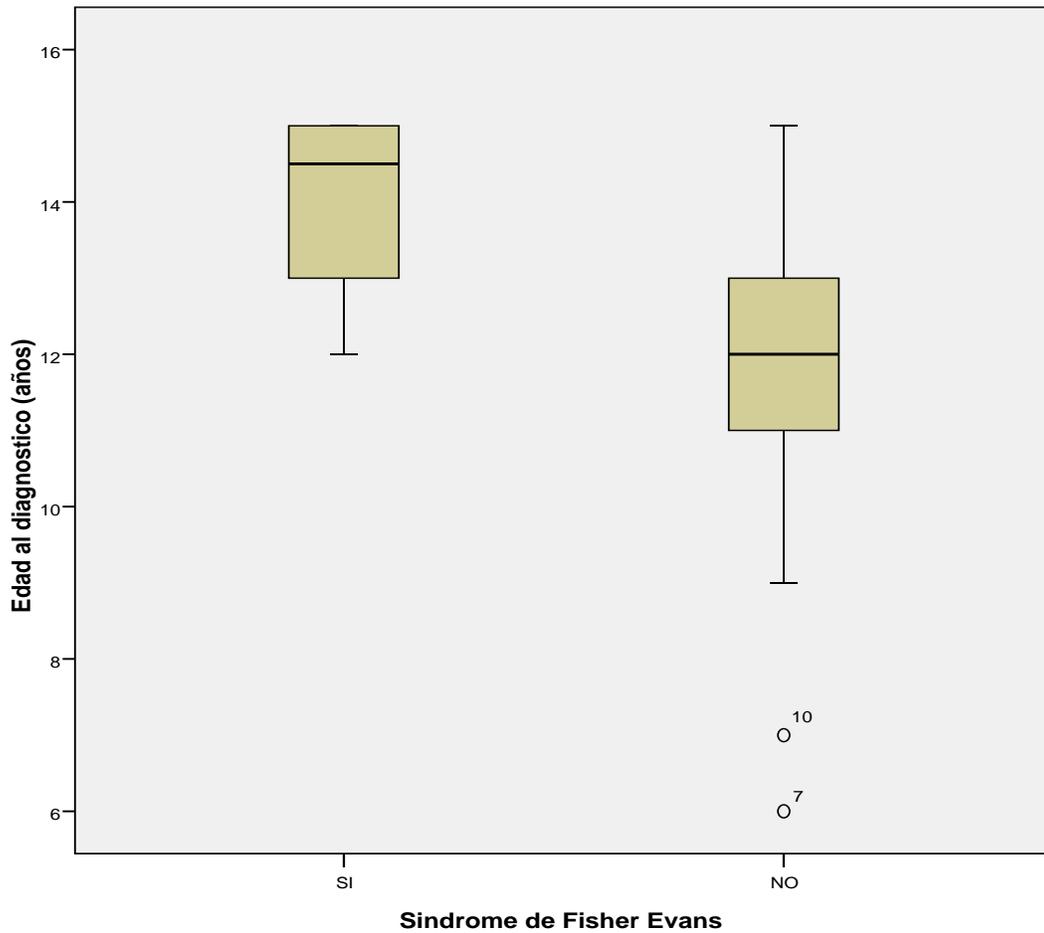
Se correlacionaron los niveles altos de anticardiolipina IgM con anemia hemolítica, con una media de 141.7 (7-255 GPL U/ml) vs 52.40 (2-255 GPL U/ml) con lo que no presentaron anemia hemolítica. Con un riesgo relativo de 5.6 (IC 95% de 0.814-38; ***p=0.017***). (Gráfico 14).

**Gráfico 14. Anemia Hemolítica Autoinmune/Niveles de anticardiolipina IgM en pediátricos con SAAF primario**



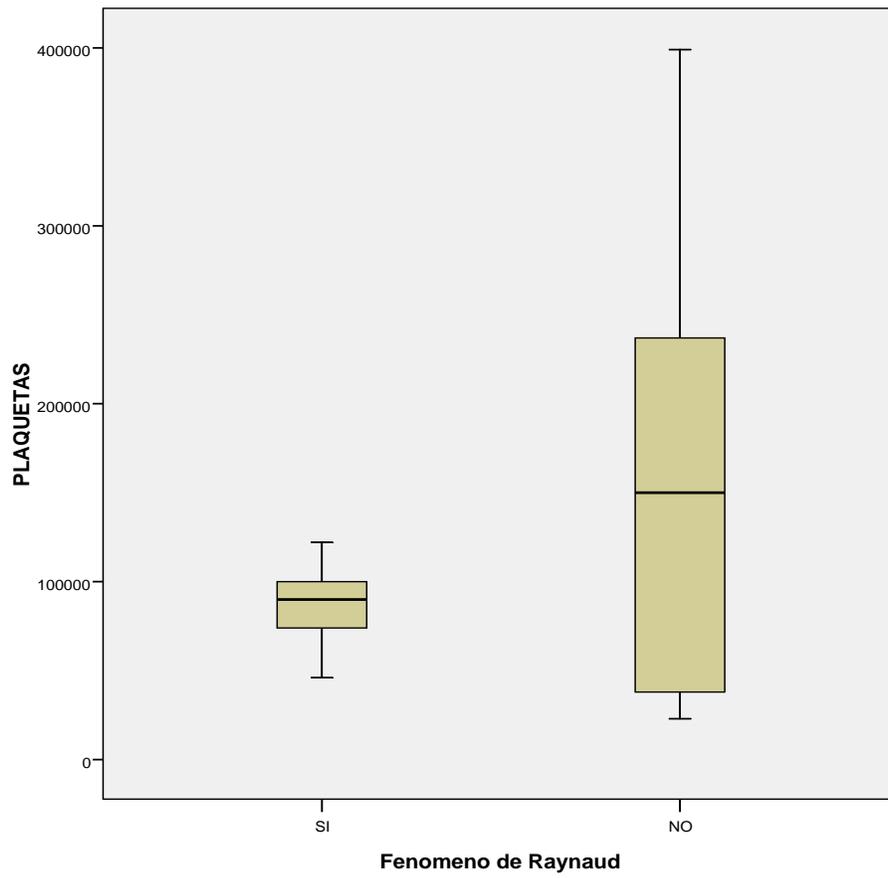
La edad al diagnóstico se relaciona significativamente con el síndrome de Fisher Evans ( $p=0.036$ ), con una media de 14 (12-15 años) vs 11.6 (6-15 años) con los que no presentaron síndrome de Fisher Evans. (Gráfica 15)

**Grafico 15. Edad al diagnóstico (años)/ Síndrome de Fisher Evans en pediátricos con SAAF primario**



El fenómeno de Raynaud se relacionó con la trombocitopenia ( $p=0.027$ ), con una media de 8,640 (46,000-122,000/mm<sup>3</sup>) vs 16,3058.82 (23000-399000/mm<sup>3</sup>) con los presentaron trombocitopenia pero sin fenómeno de Raynaud. (Grafico 16)

**Gráfico 16. Fenómeno de Raynaud/Trombocitopenia en pediátricos con SAAF primario**



## DIFERENCIA ALÉLICA Y DEL GENOTIPO

De acuerdo a la determinación del polimorfismo de nucleótido único (SNP) STAT-4 (rs7574865) se encontró una diferencia de la frecuencia de alelos G/T con un OR de 2.57 (1.079-6.130;  $p=0.03139$ ) y una diferencia entre homocigotos TT vs GG con un OR de 7.0 (IC 95% 1.044-46.949;  $p=0.03501$ ). La prueba de Hardy-Weinberg (HWE) no mostró equilibrio en la población de pacientes con SAAF primario y los controles sanos. (Tabla 2).

Al correlacionar la presencia de la mutación SNP STAT-4(rs7574865) con las características demográficas, clínicas y de laboratorio no se encontraron significancias estadísticas.

**Tabla 2. Diferencia entre frecuencia alélica y de homocigotos del SNP STAT-4 (rs7574865) en pediátricos con SAAF primario y controles**

Gen	ID SNP	HWE	Diferencia de la frecuencia entre alelos		Diferencia entre Homocigotos	
		$p^*$	OR (95% CI)	$p^*$	OR (95% CI)	$p^*$
<b>STAT4</b>	<b>rs7574865</b>					
	Casos (n = 22)	0.82	2.571 [1.079-6.130]	<b>0.03139</b>	7.000 [1.044-46.949]	<b>0.03501</b>
	Controles (n = 22)	0.69				

Se analizó la correlación entre las siguientes variables; sin embargo no se estableció significancia estadística. (Tabla 3)

**Tabla 3. Variables estudiadas en pediátricos con SAAF primario**

Variables correlacionadas		$p$
Tiempo de evolución de la enfermedad (en semanas)	Eventos trombóticos	$p=0.158$
Niveles de plaquetas	Eventos trombóticos	$p=0.078$
TTPA (en segundos)	Eventos trombóticos	$p=0.146$
TTPA prolongado (variable categórica)	Eventos trombóticos	$p=0.484$
Valor de anticoagulante lúpico	Eventos trombóticos	$p=0.92$
Valor de anticardiolipina IgG	Eventos trombóticos	$p=0.70$
Edad al diagnóstico	Trombocitopenia	$p=0.18$
Tiempo de evolución	Trombocitopenia	$p=0.66$
Valor de leucocitos	Trombocitopenia	$p=0.59$
Valor de linfocitos	Trombocitopenia	$p=0.96$
TTPA (en segundos)	Trombocitopenia	$p=0.33$
Valor de anticoagulante lupico	Trombocitopenia	$p=0.55$
Valor de anticardiolipina IgG	Trombocitopenia	$p=0.93$
Edad al diagnóstico (años)	Anemia hemolítica	$p=0.60$
Evolución (semanas)	Anemia hemolítica	$p=0.31$
Niveles de plaquetas	Anemia hemolítica	$p=0.59$
Evolución (semanas)	Síndrome de Fisher-Evans	$p=0.48$

## 15. DISCUSIÓN.

En nuestro estudio se analizaron una serie de variables demográficas, clínicas y de laboratorio en pacientes pediátricos diagnosticados con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario; encontrándose una relación hombre mujer 1:2.6, similar a la cohorte de Karakantza M. y colaboradores (col.), (2004). De acuerdo a las manifestaciones clínicas los eventos tromboticos representaron el 31.8% de los casos, el 100% de origen venoso. Las manifestaciones no tromboticos fueron las más frecuentes, entre ellas las dermatológicas ocuparon el primer lugar de afección orgánica siendo el livedo reticularis la más frecuente (63.2%), seguida de las manifestaciones hematológicas (50%) específicamente la trombocitopenia (50%) y anemia hemolítica autoinmune (50%); en tercer lugar se encontraron las manifestaciones neurológicas siendo la depresión la más frecuente (18.2%) y en cuarto lugar la asociación con nefropatía (17.8%). Nuestros datos difieren en gran proporción con las dos series más grandes realizadas en pacientes pediátricos con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario o secundario de Avcin y col., 2008 y la realizada en pediátricos mexicanos con SAAF primario y secundario por Zamora y col., 2012.<sup>(17,41)</sup>

De acuerdo a nuestros hallazgos de laboratorio, en nuestro estudio el tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPA) prolongado se presentó en 95.5%, anticoagulante lúpico positivo en el 100%, anticardiolipina IgG positiva (77.3%), anticardiolipina IgM positiva (59.1%), en solo 13.6% se determinó la beta-2-glicoproteína I por falta de reactivo en la unidad; resultando positiva en el 100% de los casos a los que se les realizó. El estudio de Zamora y col., 2012 refiere anticuerpos antifosfolípidos positivos en el 58% pero no se especifican los niveles de anticardiolipinas, anticoagulante lúpico, Beta-2-glicoproteína I, ni los valores de TTPA.<sup>41</sup>

Con respecto al tratamiento, no existen reportes previos del tipo de terapia inicial utilizada en los pacientes con SAAF primario pediátrico. En nuestro estudio se utilizó Enoxaparina (22.7%), en todos los casos de trombosis y el 9% con Acenocumaria, antiagregante plaquetario (72.7%). El 84.6% recibió prednisona más inmunosupresor, el más utilizado fue micofenolato (59.1%); más frecuente que en adultos dado que las manifestaciones no tromboticas son las más frecuentes en pediátricos con SAAF primario y responden

favorablemente al tratamiento. La terapia biológica (Rituximab) fue utilizada en el 9.1% por anemia hemolítica autoinmune refractaria.

Al momento no existen estudios que determinen riesgos. En nuestro estudio se encontró que los pacientes con mayor edad al diagnóstico (años) tuvieron más eventos trombóticos ( $p=0.015$ ); la trombocitopenia se asoció con los eventos trombóticos, con una estimación de riesgo relativo RR de 12 (IC 95% 1.11-128.8;  $p=0.022$ ). Los niveles bajos de anticardiolipina IgM se relacionó con trombosis ( $p=0.013$ ). Los niveles altos de anticardiolipina IgM se relacionaron con menor riesgo de trombocitopenia RR de 0.127 (IC 95% 0.18-0.905;  $p=0.030$ ). Los niveles altos de Anticardiolipina IgM se asociaron con anemia hemolítica autoinmune RR 5.85 (IC 95% 0.81-38.5;  $p=0.017$ ). Una edad mayor al diagnóstico se relacionó con Síndrome de Fisher-Evans ( $p=0.036$ ) y el fenómeno de Raynaud se asoció con un recuento plaquetario bajo ( $p=0.027$ )

Nuestro estudio es el único hasta el momento que ha determinado el polimorfismo (SNP) de STAT-4 (rs7574865) en pacientes pediátricos mexicanos con SAAF primario obteniendo una prevalencia considerable en pacientes portadores de una mutación homocigota TT. Kelley y col. (2010) reportaron que el SNP STAT-4 (rs7574865) está asociado a un mayor riesgo de presentar diversas enfermedades autoinmunes complejas y entre ellas el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario; <sup>(30-34)</sup> lo que sugiere que este polimorfismo de STAT-4 juega un papel crucial en la patogénesis de trastornos autoinmunes.

La determinación del polimorfismo STAT-4 (rs7574865) se encontró la frecuencia alélica del 68% de los pacientes con SAAF primario pediátrico vs el 45% en sujetos control, lo que difiere con la base de datos PubMed-SNP donde se reportaron 134 pacientes de ancestría mexicana obtenidos de una población abierta con el alelo mutante T de 0.38. (Liga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>)

De acuerdo al principio de Hardy-Weinberg (principio básico de la genética de poblaciones) la mutación del SNP STAT-4 (rs7574865) no se encuentra en equilibrio genético y no mostró significancia en la población analizada.

En la determinación de las frecuencias alélicas, la frecuencia del alelo mutante T en SAAF primario (68%) fue mayor que en los controles (45%) y la frecuencia del alelo silvestre G en pacientes con SAAF primario (32%) fue menor a los controles (55%). Estableciendo una correlación entre la presencia del alelo mutante con la enfermedad, presentando un  $OR= 2.5$  (IC 95% 1.079-6.130;  $p=0.03139$ ). Nuestros hallazgos son semejantes comparándolos según lo descrito por Horita y col. (2009) donde reportó una frecuencia del alelo mutante T en SAAF primario (48.6%) mayor que los controles (31.6%) y del alelo silvestre G en SAAF primario (51.4%) menor que los controles (68.4%). La correlación entre el alelo mutante T y la enfermedad presentó un  $OR= 2.0$  (IC 95% 1.27-3.30;  $p=0.003$ ). Contrastando los datos anteriores con los nuestros, existen discretas diferencias en el valor de OR y frecuencia del alelo mutante T, aun así la frecuencia del alelo mutante está relacionada con la presencia de la enfermedad.<sup>38</sup>

Hasta el momento el estudio de Horita y col. (2009) es el único que encontró asociación del polimorfismo con la presencia de trombosis  $OR=1.53$  (1.06-2.21;  $p=0.023$ ) y con las complicaciones obstétricas  $OR=2.16$  (IC 95% 1.12-4.15;  $p=0.018$ )<sup>38</sup>; sin embargo en pacientes pediátricos con SAAF primario las manifestaciones no trombóticas siguen siendo las más frecuentes, lo cual también se corrobora en el presente estudio; dado que en los pacientes pediátricos no existen factores de riesgo que predispongan a una mayor frecuencia de eventos trombóticos ni abortos. En nuestro estudio no existió correlación del polimorfismo STAT 4 (rs7574865) con las características demográficas, clínicas ni con los hallazgos de laboratorio.

Siguiendo la asociación del polimorfismo con la enfermedad, Liang, Y. L. y col (2012) también estudió que las probabilidades generales del OR para el alelo mutante T aumentaron significativamente en SAAF primario con un  $OR =2.15$  ( $p<0.00001$ ). Con ello demostraron que el alelo mutante T confiere un mayor riesgo de presentar síndrome antifosfolípidos primario.<sup>(37)</sup> Yin Hong y col. (2009) reportó que STAT-4 (rs7574865) muestra una fuerte asociación genética con SAAF primario con un  $OR= 2.19$  ( $<p=0.05$ )<sup>11</sup>

En nuestro estudio se reportó el genotipo GG en SAAF primario (2%) fue menor que los controles (31.8%), un genotipo GT en SAAF primario (45.5%) fue igual a los controles (45.5%) y un genotipo TT en SAAF primario (45.5%) fue mayor que los controles (22.75%). Al determinar la diferencia entre homocigotos TT se obtuvo un OR de 7 (IC 95% 1.044-46.949:  $p=0.03501$ ), encontrando un riesgo importante al presentar el genotipo TT en la población estudiada.

## 16. CONCLUSIONES.

1. El 91% de los pacientes con SAAF primario presentan el alelo mutante para STAT-4 (rs7574865).
2. No existió asociación entre la presencia del polimorfismo y las características demográficas, clínicas ni de laboratorio.
3. De las manifestaciones no trombóticas, las cutáneas son las más frecuentes siendo el livedo reticularis la manifestación principal, entre las manifestaciones trombóticas la trombosis venosa se presentó con mayor frecuencia a nivel femoral. Los eventos trombóticos tuvieron menos tiempo de evolución al momento del diagnóstico debido a la severidad de los síntomas. Los pacientes con mayor edad al diagnóstico (años) tuvieron más eventos trombóticos. La trombocitopenia se asoció con los eventos trombóticos. Los niveles bajos de anticardiolipina IgM se asociaron con trombosis; los niveles altos de anticardiolipina IgM con menor riesgo de trombocitopenia y los niveles altos de Anticardiolipina IgM con anemia hemolítica autoinmune. Una edad mayor al diagnóstico se relacionó con Síndrome de Fisher-Evans y el fenómeno de Raynaud con un recuento plaquetario bajo. El uso de terapia anticoagulante es menos frecuentes que en los adultos por ausencia de manifestaciones trombóticas, el uso de inmunosupresor es más frecuente en niños que en adultos, dado que las manifestaciones hematológicas responden mejor a este tratamiento. Los criterios de clasificación actuales no pueden aplicarse a pacientes pediátricos debido a que las manifestaciones trombóticas son las más frecuentes.
4. Nuestro estudio es el único hasta el momento que ha encontrado una frecuencia significativa de la mutación homocigota TT del polimorfismo STAT-4 (rs7574865) en pacientes pediátricos mexicanos con SAAF primario.
5. La debilidad del estudio es el número de sujetos con SAAF primario en la población pediátrica, sin embargo comparando con estudios internacionales previos, se demuestra que es un reto el diagnóstico de este padecimiento en dicha población.

## 17. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACION Y POLITICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN  
PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN:

Nombre del estudio:	<b>“CARACTERIZACIÓN DEL POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP) STAT-4 (RS7574865) EN EL SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS PRIMARIO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS ATENDIDOS EN EL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL CENTRO NACIONAL LA RAZA”</b>
Patrocinador externo (Si aplica):	NO APLICA
Lugar y fecha:	México Distrito Federal a _____ de _____ del 2018
Justificación y objetivo del estudio:	El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos es una enfermedad que ocurre cuando el sistema de defensa del cuerpo ataca las células y los tejidos sanos. Esto puede causar daño a varias partes del cuerpo como las articulaciones, piel, riñones, corazón, pulmones, vasos sanguíneos y el cerebro. Actualmente se sabe que la herencia juega un papel importante para padecer esta enfermedad, este estudio pretende saber si existe alteración en un gen.
Procedimientos:	Durante la toma de muestras sanguíneas que se le realiza a su hijo (a) para el seguimiento de su enfermedad se solicitará por única ocasión un tubo para muestra extra sin necesidad de dar otro piquete.
Posibles riesgos y molestias:	Riesgo mínimo. Molestias como dolor y moretón en el área donde se realice el piquete para la toma de muestra.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Saber si el paciente es portador de dicho error genético.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Se informará el resultado al contar con el mismo, durante su atención médica programada.
Participación o retiro:	El paciente podrá libremente acceder o negarse a participar en el estudio o retirarse en cualquier momento que desee del estudio, sin que esto afecte la atención medica que se brinda por la institución.
Privacidad y confidencialidad:	El resultado solo será conocido por el paciente, los padres y los investigadores. No se dará a conocer el nombre de los pacientes que participen en el estudio al difundir la información a la comunidad médica.
En caso de colección de material biológico (si aplica):	
<input type="checkbox"/> No autoriza que se tome la muestra sanguínea. <input type="checkbox"/> Si autorizo que se tome la muestra sanguínea solo para este estudio. <input type="checkbox"/> Si autorizo que se tome la muestra sanguínea para este estudio y estudios futuros.	
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica)	NO APLICA
Beneficios del estudio:	Contribuir en avances en investigación educativa.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigadores responsable:	Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez Correo: <a href="mailto:bekkermendez@yahoo.com">bekkermendez@yahoo.com</a>
	Dr. Alfonso Ragnar Torres Jiménez Matricula: 99155531 Celular: 5537276113 Correo: <a href="mailto:tojadr@gmail.com">tojadr@gmail.com</a>
Colaboradores	Dra. Virginia Ramírez Nova. Matricula: 97362252 Celular: 5584045865 Correo: <a href="mailto:ramireznova@hotmail.com">ramireznova@hotmail.com</a>
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a. Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS y/o al Comité de Ética e Investigación del Hospital General Centro Médico Nacional La Raza “Dr. Gaudencio González Garza” Unidad Médica de alta Especialidad” en Av. Jacarandas S/N Col. La Raza, Delegación: Azcapotzalco, Ciudad de México. Dirección de enseñanza e Investigación en Salud. Teléfono 57-42-59-00. Correo electrónico: <a href="mailto:comisión.etica@imss.gob.mx">comisión.etica@imss.gob.mx</a>	
_____	_____
Nombre y firma del sujeto	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
_____	_____
Nombre, dirección, relación y firma	Nombre, dirección, relación y firma
Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo a las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.	
<b>Clave 2810-009-013</b>	

## 18. CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO.



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

### **CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO**

El servicio de Reumatología pediátrica y la unidad de investigación del Centro Médico Nacional “La Raza” están realizando un estudio para conocer acerca de un error genético en niños que tienen tu misma enfermedad y para ello queremos pedirte que nos apoyes.

Tu participación en el estudio consistiría en que durante la toma de muestras sanguíneas que se te realiza para el seguimiento de su enfermedad se solicitará un tubo para muestra extra sin necesidad de dar otro piquete, esto será en una sola ocasión. Las posibles molestias que pudieras tener son dolor y moretón en el área donde se realice el piquete para la toma de muestra.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tus papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema.

La información obtenida de las mediciones que realicemos nos ayudará a saber si tienes un error genético.

Esta información será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie a quien pertenecen los resultados, sólo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio. Tú y tus papás serán informados del resultado obtenido.

.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una ( ✓ ) en el cuadrado de abajo que dice “Sí quiero participar” y escribe tu nombre.

Sí quiero participar

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento:

\_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## 19. BIBLIOGRAFÍA.

1. Forastiero R, Martinuzzo M. Prothrombotic mechanisms based on the deterioration of fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 872.
2. Urbanus RT, Derksen RH, Groot PG. Platelets and the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 888.
3. Chen PP, Giles I. Antibodies against serine proteases in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12:45
4. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. Resistance to the anticoagulant activity of annexin A5: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 922.
5. Raschi E, Borghi MO, Grossi C, Broggin V, Pierangeli S, Meroni PL. Toll-like receptors: another player in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 937.
6. Cockrell E, Espinola RG, McCrae KR. Annexin A2: biology and relevance for the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 943.
7. Kinev AV, Roubey RA. Tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 952.
8. Bu C, Gao L, Xie W, Zhang J, He Y, Cai G, et al. Beta2-glycoprotein is a cofactor for the activation of plasminogen mediated by the tissue plasminogen activator. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 559.
9. A. Hughes GVR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J* 1983; 287:1088-89).
10. Erkan D, Lockshin MD. What is the antiphospholipid syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6: 451.
11. Hong Y, Borghi MO, Delgado-Vega MA, Tincani A, Pier-Luigi M, Alarcón-Riquelme ME. Association of STAT-4 and BLK, but Not BANK1 or IRF5, With Primary Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, 2009. P. 2468-2471.
12. Karakantza M, Theodorou GL, Meimaris N, Mouzaki AE. Type a and type 2 cytokine-producing CD4+ and CD8+ T cells in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Hematol.*2004; 83:704-711.
13. Saca LF, Szer I, Henar E. Budd-Chiar syndrome associated with antiphospholipid antibodies in a children. Report of a case review on the literature. *J Rheumatol* 1994; 21:545-549.
14. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1992;21:275-86.
15. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1309-11.
16. Abreu MM, Danowski A, Wahi DG, Amigo MC, Tektonidou M, Pacheco MS, et al. The relevance of “non-criteria” clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Technical Task Force Report n Antiphospholipid Syndrome Clinical Features. *Autoimmunity Reviews* 2015; 14:401-14.
17. Avcin T, Kathñeen M. Antiphospholipid Syndrome. *Pediatric Rheumatology.* 7a ed. Philadelphia, Elsevier Saunders; 2015. P.318-35.
18. Simpson CR, Anderson WJ, Helms PJ, Taylor MW, Watson L, Prescott GJ, et al. Coincidence of immune-mediated diseases driven by Th1 and Th2 subsets

- suggests a common etiology. A population-based study using computerized general practice data. *Clin Exp Allergy* 2012;32:37–42.
19. Heward J, Gough SC. Genetic susceptibility to the development of autoimmune disease. *Clin Sci* 1997;93:479–491.
  20. Corporal S, Bijl M, Kallenberg CG. Familial occurrence of autoimmune diseases and autoantibodies in a Caucasian population of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2002; 21:108–113.
  21. Becker KG. The common genetic hypothesis of autoimmune/inflammatory disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:399–405.
  22. Morahan G, Peeva V, Mehta M, Williams R. Systems genetics can provide new insights into immune regulation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 2008;31:233–236.
  23. McCluskey J, Peh CA. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet* 1998;1:3–20
  24. Brand O, Gough SC, Heward J. HLA, CTLA-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med* 2005; 7:1–15.
  25. Lundström E, Gustafsson JT, Jönsen A, Leonard D, Zickert A, Elvin K, et al. The HLA-DRB1 \*04/\*13 alleles are associated with vascular disease and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1018.
  26. Sánchez ML, Katsumata K, Atsumi T, Romero F, Bertolaccini M, Funke A, et al. Association of the HLA-DM polymorphism with the production of antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1645.
  27. Korman BD, Kastner DL, Gregersen PK, Remmers EF. STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008; 8:398–403.
  28. Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kamnno Y, Muul L, O’Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immune regulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 2004; 202:139–156.
  29. Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O’Malley JT, et al. STAT3 and STAT4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol* 2007; 178:4901–4907.
  30. Lee HS, Park H, Yang S, Kim D, Park Y. STAT4 polymorphism is associated with early-onset type 1 diabetes, but not with late-onset type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1150:93–98.
  31. Kelley JM, Hughes LB, Malik A, Danila MI, Edberg Y, Alarcon GS, et al. Genetic variants of STAT4 associated with rheumatoid arthritis in persons of Asian and European ancestry do not replicate in African Americans. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:625–626.
  32. Díaz-Gallo LM, Palomino-Morales RJ, Gómez-García M, Cárdena C, Rodrigo L, Nieto A, et al. STAT4 gene influences genetic predisposition to ulcerative colitis but not Crohn’s disease in the Spanish population: a replication study. *Hum Immunol* 2010; 71:515–519.
  33. Palomino-Morales R, Vazquez-Rodriguez TR, Morado IC, Castaneda S, Ortego-Centeno N, Miranda-Fillooy JA, et al. Lack of association between STAT4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2009; 36:1021–1025.
  34. Wieczorek S, Holle JU, Muller S, Fricke H, Gross WL, Epplen JT. A functionally relevant IRF5 haplotype is associated with reduced risk to Wegener’s granulomatosis. *J Mol Med* 2009; 88:413–421.

35. Taylor KE, Remmers EF, Lee AT, Ortmann WA, Plenge RM, Tian C, et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* 2008;4:e1000084.
36. Reddy MV, Velázquez-Cruz R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L, et al. Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum Genet* 2007; 121:721–7.
37. Liang YL, Wu H, Shen X, Li PQ, Yang XQ, Liang L, et al. Association of STAT-4 rs7574865 polymorphism with autoimmune disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39:8873-8882.
38. Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, et al. STAT-4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009 68:1366-1367.
39. Hagberg N, Joelsson M, Leonard D, Reid S, Eloranta ML, Mo J, et al. The STAT4 SLE risk allele rs7574865 [T] is associated with increased IL-12-induced IFN- $\gamma$  production in T cells from patients with SLE. *Ann Rheum Dis*. 2018; 77:1070-1077.
40. Lackner KJ, Peetz D. Revision of the Sapporo criteria for the antiphospholipid syndrome Coming to grips with evidence and Thomas Bayes? *Thromb Haemost* 2006;95:917-919.
41. Zamora Ustaran A., Escarcega alarcón R.O., Garcia Carrasco M., Faugier E., Medieta Zeron S., Mendoza Pinto C., et al. Antiphospholipid Syndrome in Mexican Children. *IMAJ*, 2012; 14:286-289.

## 20. ANEXOS.

### ANEXO 1.

<b>Tabla 1. Criterios de Sydney, 2006</b>
Criterios clínicos
<ul style="list-style-type: none"><li>• Trombosis vascular (uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa, o de pequeños vasos, que ocurra en cualquier tejido u órgano, demostrado por criterios objetivos (imagen y/o anatomía patológica). Ausencia de inflamación en la pared vascular.</li></ul>
Criterios de laboratorio
<ul style="list-style-type: none"><li>• Anticuerpos anticardiolipinas (anticuerpos anticardiolipina IgG y/o IgM en plasma o suero, a títulos medio o altos (&gt;40 GPL o MPL o al percentil 99), en 2 o más ocasiones separadas 12 semanas.</li><li>• Anticoagulante lúpico (Anticoagulante lúpico detectado en plasma en 2 o más ocasiones separadas 12 semanas.</li><li>• Anticuerpos anti-<math>\beta</math>2-glicoproteína (Anticuerpos anti-<math>\beta</math>2-glicoproteína I IgG y/o IgM en plasma o suero (valores superiores al percentil 99), en 2 o más ocasiones separadas 12 semanas.</li></ul>

## ANEXO 2.

### HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

NOMBRE: \_\_\_\_\_  
 NSS: \_\_\_\_\_  
 EDAD: \_\_\_\_\_  
 SEXO: A) MASCULINO B) FEMENINO  
 FECHA AL DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_  
 EDAD AL DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_  
 TIEMPO DE EVOLUCION AL DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_

MANIFESTACIONES CLINICAS INICIALES:		
SISTEMA AFECTADO		MANIFESTACIÓN CLINICA
TROMBOSIS	1. EVENTO TROMBOTICO	0. NO 1. SI
	2. TROMBOSIS	-VENOSA 0. NO 1. SI -ARTERIAL 0. NO 1. SI
	3. SITIO DE TROMBOSIS	1. CEREBRAL 2. RETINIANA 3. PULMONAR 4. CARDIACA/CAVA INFERIOR O SUPERIOR 5. RENAL 6. MESENTERICA 7. FEMORAL 8. POPLÍTEA ESPECIFICAR SITIO _____
	4. TROMBOSIS MICROANGIOPÁTICA	0. NO 1. SI
	5. INFARTOS	0. NO 1. MIOCARDIO 2. HEPÁTICO 3. HUESO 4. RENAL 5. HUESO 6. EXTREMIDADES SUPERIORES/INFERIORES
	6. ENCEFALOPATIA ISQUÉMICA	0. NO 1. ARTERIA CEREBRAL MEDIA
HEMATOLÓGICO	7. TROMBOCITOPENIA	0. NO 1. SI VALOR DE PLAQUETAS _____
	8. ANEMIA HEMOLITICA AUTOINMUNE	0. NO 1. SI
	9. LEUCOPENIA	0. NO 1. SI VALOR DE LEUCOCITOS _____
	10. LINFOPENIA	0. NO 1. SI VALOR DE LINFOCITOS _____
	11. SINDROME DE FISHER EVANS	0. NO 1. SI
	12. COOMBS DIRECTO	0. NEGATIVO 1. POSITIVO
	13. DETERMINACIÓN DEL TIPO DE ANTICUERPO	0. NEGATIVO 1. FRIOS 2. CALIENTES 3. MIXTOS

	15. SINDROME DE HIPOPROTOMBINEMIA	0. AUSENTE 1. PRESENTE 2. NO DETERMINADO
	16. HIPOCOMPLEMENTEMIA FRACCION AFECTADA	0. NO 1. SI 1. C3 2. C4 3. AMBOS
<b>DERMATOLÓGICAS</b>	17. LIVEDO RETICULARES	0. NO 1. SI
	18. ULECRAS CUTÁNEAS	0. NO 1. SI
	19. FENOMENO DE RAYNAUD	0. NO 1. SI
<b>NEUROLÓGICAS</b>	20. EPILEPSIA	0. NO 1. SI
	21. MIGRAÑA	0. NO 1. SI
	22. COREA	0. NO 1. SI
	23. DEFECTOS COGNITIVOS	0. NO 1. SI
	24. ENFERMEDADES PSIQUIATRICAS	0. NO 1. SI
	25. MIELITIS TRANSVERSA	0. NO 1. SI
	26. ESCLEROSIS MULTIPLE LIKE	0. NO 1. SI
	27. PERDIDA DE LA AUDICIÓN NEUROSENSORIAL	0. NO 1. SI
28. SÍNDROME DE GUILLIAN-BARRÉ	0. NO 1. SI	
<b>OTRAS MANIFESTACIONES</b>	29. ENFERMEDAD VALVULAR	0. NO 1. SI
	30. OCLUSIÓN CORONARIA	0. NO 1. SI
	31. TROMBOSIS INTRACARDIACA	0. NO 1. SI
	32. CARDIOMIOPATÍA	0. NO 1. SI
	33. ENDOCARDITIS DE LIBMAN-SACKS	0. NO 1. SI
	34. NECROSIS AVASCULAR DE HUESO	0. NO 1. SI
	35. FRACTURAS NO TRAUMÁTICAS	0. NO 1. SI
	36. ABORTOS ESPONTÁNEOS	0. NO 1. SI
	37. SANGRADO Y EQUIMOSIS	0. NO 1. SI
38. SANGRADO UTERINO ANORMAL	0. NO 1. SI	
<b>PRUEBAS DE LABORATORIO INICIALES:</b>		
39. TP PROLONGADO	0. NO 1. SI VALOR DE TP: _____	
40. ANTICOAGULANTE LÚPICO	0. NEGATIVO 1. POSITIVO 3. NO REALIZADO VALOR: _____	
41. ANTICARDIOLIPINA IGG	0. NEGATIVO 1. POSITIVO 3. NO REALIZADO VALOR: _____	
42. ANTICARDIOLIPINA IGM	0. NEGATIVO 1. POSITIVO 3. NO REALIZADO VALOR: _____	
43. BETA 2 MICROBULINA	0. NEGATIVO 1. POSITIVO 3. NO REALIZADO VALOR: _____	
44. VDRL	0. NEGATIVO 1. POSITIVO 3. NO REALIZADO VALOR: _____	

<b>TRATAMIENTOS INICIALES:</b>	
45. ANTICOAGULANTE	0. NO 1. WARFARINA 2. ACENOCUMARIA 3. ENOXOPARINA
46. ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO	0. NO 1. ACIDO ACETILSALICÍLICO
47. ESTEROIDE	0. NO 1. METILPREDNISOLONA/PREDNISONA 2. PREDNISONA
48. INMUNOSUPRESOR	0. NO 1. CICLOFOSFAMIDA 2. MICOFENOLATO 3. AZATIOPRINA
49. BIOLÓGICO	0. NO 1. RITUXIMAB