

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

AUTOANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS DE LA VÍA
ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO EN ENFERMEDADES
RENALES

TESIS DOCTORAL

PILAR NOZAL ARANDA

MADRID, 2016

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

AUTOANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS DE LA
VÍA ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO EN
ENFERMEDADES RENALES

PILAR NOZAL ARANDA. LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARGARITA LÓPEZ TRASCASA

UNIDAD DE INMUNOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ

RESUMEN

La activación del sistema del complemento interviene en el desarrollo de algunas patologías renales en mayor o menor grado. En el caso de las glomerulopatías C3 (C3G) y del síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa), alteraciones en la vía alternativa están directamente implicadas en su patogénesis. Estas alteraciones pueden ser congénitas o adquiridas, en forma de autoanticuerpos dirigidos frente a los diversos componentes y reguladores de la vía alternativa.

La primera parte de esta tesis se centra en los autoanticuerpos frente al factor H (FH), principal regulador de la vía alternativa.

Los autoanticuerpos anti-FH en el SHUa impiden el reconocimiento y la unión de esta proteína a las membranas celulares para regular la activación del complemento en su superficie, siendo éste su principal mecanismo patogénico. Aunque su implicación en la patología está establecida, se sabe poco de las características individuales de estos autoanticuerpos y de su evolución a lo largo del tiempo. Aquí se presenta un estudio detallado de una serie de 19 pacientes con SHUa y autoanticuerpos anti-FH, en muestras obtenidas en algunos casos a lo largo de más de 8 años.

Sobre el papel que tienen los anticuerpos anti-FH en las C3G existen menos datos, debido a su menor frecuencia y a que, en ocasiones, aparecen junto a otros autoanticuerpos. Aquí se presenta un caso de una paciente con enfermedad por depósitos densos y autoanticuerpos anti-FH, en la que tras realizar diversos estudios, se determinó que este autoanticuerpo era el causante de la enfermedad renal.

Por último, se describen los estudios que se han llevado a cabo en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), en cuanto a la frecuencia de aparición y la especificidad de estos anticuerpos anti-FH.

La segunda parte de la tesis se enfoca en el estudio de autoanticuerpos frente a otras proteínas de la vía alternativa del complemento, en este caso, factor B, factor I, C3 y properdina.

Se ha analizado su prevalencia en cohortes de SHUa, C3G y LES; se han estudiado sus efectos en una paciente con nefritis lúpica, en la que se comprobó que estos autoanticuerpos eran capaces de activar la vía alternativa, contribuyendo a su enfermedad.

SUMMARY

Complement system activation plays an important role in several renal pathologies, including C3 glomerulopathies (C3G) and atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), in which alternative pathway alterations are directly implicated in their pathogenesis. Inherited and acquired factors leading to complement dysregulation have been reported, the latter as autoantibodies directed against alternative pathway components or regulators.

The first part of this thesis focuses in autoantibodies against complement factor H (FH), an important alternative pathway regulator.

Anti-FH autoantibodies in aHUS block FH's attachment to endothelial cells and, by doing so, inhibit complement regulation on surfaces. Although the pathogenic role of the autoantibodies is established, little is known about their molecular characteristics and changes over time. Here, a detailed characterization of autoantibodies from 19 aHUS patients is presented, including serial samples from 14 of them, with follow-up times over 8 years in some cases.

Despite the fact that anti-FH autoantibodies in C3G were described earlier than in association with aHUS, data about their role in this pathology is limited, because of their low frequency and their simultaneous presence with other autoantibodies in some cases. Here, a patient with dense deposit disease and anti-FH autoantibodies is described. After functional analysis of these autoantibodies, it can be concluded that they are the pathogenic cause of the disease.

Finally, studies of frequency and specificity of anti-FH autoantibodies in systemic lupus erythematosus (SLE) patients are presented.

The second part of this thesis focuses in autoantibodies directed against other complement alternative pathway proteins, specifically anti-factor B, factor I, C3 and properdin.

Frequencies of these autoantibodies in aHUS, C3G and SLE have been analyzed. Autoantibodies recognizing these proteins have been studied in one patient with lupus nephritis, concluding that they cause alternative pathway activation and contribute to the disease.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	III
ABREVIATURAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	3
1.1. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	4
1.1.1. Vía clásica.....	4
1.1.2. Vía de las lectinas	6
1.1.3. Vía alternativa	7
1.1.4. Vía terminal	8
1.2. REGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	9
1.2.1. Regulación a nivel del complejo de ataque a la membrana	9
1.2.2. Inactivación de C3b/C4b por Factor I.....	9
1.2.3. Disociación de las convertasas.....	10
1.2.4. Factor H.....	12
2. COMPLEMENTO Y PATOLOGÍA RENAL	14
2.2. SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO	14
2.3. GLOMERULOPATÍA C3	16
2.4. NEFRITIS LÚPICA	19
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	25
1. ELISAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	27
2. ELISAS PARA LA DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS	28
3. ELISAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS	28
3.1. Determinación de la subclase y cadena ligera de los autoanticuerpos.....	28
3.2. Competición por la unión a FH con anticuerpos monoclonales.....	29
3.3. Caracterización del dominio de reconocimiento de los anti-FH	29
3.4. Determinación del epítipo que reconocen los anticuerpos frente a FH en el SCR20.....	30
3.5. Estudio de la avidéz de los anticuerpos anti-FH	30
3.6. Detección de complejos circulantes antígeno-anticuerpo	30
4. ENSAYO DE ACTIVIDAD COFACTORA DEL FH	31
5. ELECTROFORESIS	31

6.	WESTERN-BLOT.....	31
7.	PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G	32
8.	ENSAYOS HEMOLITICOS	32
8.1.	AP-50	32
9.	ACTIVACIÓN DE LA VIA ALTERNATIVA EN FASE FLUIDA	32
10.	MUESTRAS	33
	RESULTADOS	35
1.	ANTICUERPOS ANTI-FH EN SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO	37
1.1.	NIVELES DE FACTOR H	37
1.2.	COMPLEJOS FH-AUTOANTICUERPOS.....	41
1.3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS AUTOANTICUERPOS ANTI-FH	42
1.4.	CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO DE RECONOCIMIENTO DE LOS AUTOANTICUERPOS ANTI-FH.....	44
1.5.	INHIBICIÓN DE LA UNIÓN A FH MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES	47
1.6.	DETERMINACIÓN DEL EPÍTOPO QUE RECONOCEN LOS ANTICUERPOS ANTI-FH EN EL SCR20.....	48
1.7.	EVOLUCIÓN DE LA AVIDEZ DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FH.....	49
2.	ANTICUERPOS ANTI-FH EN GLOMERULOPATÍAS C3.....	51
2.1.	CASO CLÍNICO:	51
2.2.	CARACTERIZACIÓN DEL AUTOANTICUERPO	52
2.2.1.	Estudio del dominio de reconocimiento.....	55
2.2.2.	Estudios funcionales.....	56
2.2.3.	Evolución.....	57
3.	ANTICUERPOS ANTI-FH EN LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO	58
4.	OTROS AUTOANTICUERPOS.....	59
4.1.	ESTUDIOS FUNCIONALES DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS DE LA VÍA ALTERNATIVA.....	60
4.1.1.	Caso clínico	60
4.1.2.	Ensayos funcionales	62
	DISCUSIÓN	67
1.	AUTOANTICUERPOS ANTI-FACTOR H	69
2.	AUTOANTICUERPOS FRENTE A OTRAS PROTEÍNAS DE LA VÍA ALTERNATIVA	75
	CONCLUSIONES	79
	BIBLIOGRAFÍA	83
	ANEXO	103

ABREVIATURAS

- ABTS 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato]
- BSA *Bovine Serum Albumin*, albúmina de suero bovino
- C3G Glomerulopatía C3
- C3GN Glomerulonefritis C3
- C3NeF Factor nefrítico
- *CFB* Gen del factor B
- *CFH* Gen del factor H
- *CFI* Gen del factor I
- CR1 *Complement Receptor 1*, receptor de complemento 1
- DAF *Decay Accelerating Factor*
- EDD Enfermedad por Depósitos Densos
- EDTA Ácido etilendiaminotetracético
- EGTA Ácido etilenglicoltetracético
- ELISA *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- FB Factor B
- FD Factor D
- FH Factor H
- FHL-1 *Factor H-like protein 1*
- FHRs *Factor H Related proteins*, proteínas relacionadas con el factor H
- FI Factor I
- LES Lupus Eritematoso Sistémico
- LPS Lipopolisacárido
- MAC *Membrane Attack Complex*, complejo de ataque a la membrana
- MBLs *Mannose Binding Lectin*
- MCP *Membrane Cofactor Protein*
- PBS *Phosphate Buffered Saline*, Tampón fosfato-salino
- PBS-T PBS con Tween 20

- Plg Plasminógeno
- SCR *Short Consensus Repeat*
- SDS Dodecil sulfato sódico
- SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
- SHN Suero humano normal
- SHU(a) Síndrome Hemolítico Urémico (atípico)
- VA Vía alternativa del sistema del complemento
- VBS *Veronal buffered saline*, Tampón veronal-salino
- VC Vía clásica del sistema del complemento
- VL Vía de las lectinas del sistema del complemento
- VT Vía terminal del sistema del complemento
- WB *Western Blot*

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El sistema del complemento forma parte de la inmunidad innata. Es una cascada constituida por proteínas solubles y de membrana, incluyendo receptores y reguladores, capaz de actuar en el plasma, en superficies celulares, en diferentes tejidos e incluso en el interior de las células.

Aunque inicialmente se describió como un factor capaz de lisar bacterias, las funciones en las que está implicado el complemento se han ido ampliando a lo largo de los años, y entre ellas están:

- Eliminación directa de patógenos por la activación del complemento iniciada por cualquiera de las tres vías y llegando a la formación del complejo de ataque a la membrana en su superficie.
- Oponización para favorecer la fagocitosis. La oponización por el complemento permite la eliminación de patógenos por los fagocitos antes de que se establezca una respuesta inmune adaptativa.
- Eliminación de células apoptóticas por fagocitosis sin activación de una respuesta inmune. La oponización de células apoptóticas por C1q e iC3b promueve un ambiente antiinflamatorio, permitiendo una fagocitosis “silenciosa” sin respuestas inmunogénicas durante la eliminación de estas células (Merle et al. 2015).
- Eliminación de inmunocomplejos de la circulación mediante oponización.
- Participa en la inflamación. Las anafilotoxinas inducen el “burst” oxidativo en los macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, inducen la producción de histamina en mastocitos y basófilos, y son potentes quimioatrayentes de todas estas células.
- Regulación de la inmunidad adaptativa. El C3 es necesario para la inducción y el mantenimiento de las células B de memoria, además sus productos de activación son capaces de disminuir el umbral de activación de estos linfocitos. También favorece el mantenimiento de la tolerancia periférica mediante la eliminación de restos celulares e inmunocomplejos que podrían actuar como autoantígenos (Carroll 2004, Carroll, Isenman 2012). El complemento también favorece la diferenciación de los linfocitos T a distintos subtipos y participa en la fase inductora y efectora, así como en la contracción de su respuesta, bien actuando directamente sobre los linfocitos T o bien sobre las células presentadoras de antígenos (Liszewski et al. 2013).

El sistema del complemento puede activarse por tres vías, la clásica, la de las lectinas y la alternativa. La activación por cualquiera de las tres vías conduce primero a la proteólisis del C3 en

sus fragmentos activos mediante la formación de unos complejos denominados convertasas de C3 y, posteriormente, a la activación de la vía terminal o lítica, tras la formación de las convertasas de C5 (Figura 1).

Tras la acción de las convertasas sobre el C3 y el C5, se liberan las anafilatoxinas. Las anafilatoxinas, C3a y C5a, son dos pequeños fragmentos de estas moléculas con funciones pleiotrópicas. Son potentes mediadores inflamatorios con receptores en una gran variedad de células. Son capaces de activar las respuestas oxidativas de macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, y de inducir la liberación de histamina en los mastocitos y basófilos. C5a es además una potente quimioquina, capaz de reclutar a diferentes células del sistema inmune. A parte de sus acciones proinflamatorias, en determinados contextos, poseen funciones antiinflamatorias y moduladoras sobre las células de la inmunidad adaptativa, además de estar implicadas en la regeneración tisular, la fibrosis o el desarrollo del cerebro (revisado en (Merle et al. 2015, Klos et al. 2009)).

1.1. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

1.1.1. Vía clásica

La vía clásica (VC) tiene una molécula de reconocimiento, C1q, que es la que inicia dicha vía. El C1q puede unirse a más de 100 moléculas diferentes, incluyendo complejos inmunes que tengan IgG o IgM, pentraxinas de membrana, etc. (Kishore et al. 2004)(Kishore et al. 2004, Roumenina et al. 2006, Zlatarova et al. 2006). El C1q también reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) incluyendo LPS y porinas bacterianas (Roumenina et al. 2008). Por último, también es capaz de unirse a distintas moléculas expuestas en la superficie de células apoptóticas (fosfatidil serina, anexinas, GADPH, etc. (Paidassi et al. 2008, Martin, Leffler & Blom 2012, Gaboriaud et al. 2012)).

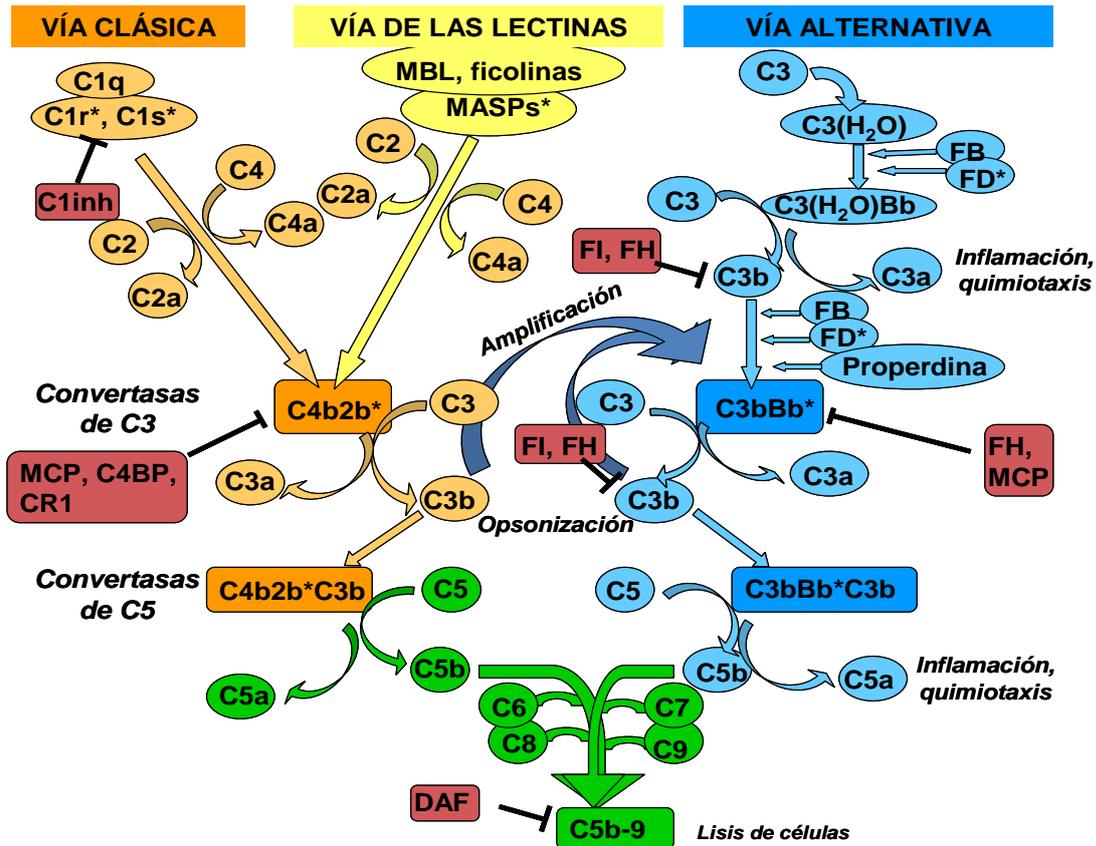


Figura 1: Esquema de la activación del complemento por las tres vías. El sistema del complemento puede activarse por tres vías, la clásica (VC), la de las lectinas (VL) y la alternativa (VA). En la VC, el C1q reconoce inmunoglobulinas y otras moléculas. En la VL la activación se produce por la presencia de motivos repetitivos de carbohidratos bacterianos. En cambio, la VA se activa ligeramente de forma continua y espontánea por la hidrólisis de un enlace tioéster presente en la molécula de C3. Tras los pasos iniciales de reconocimiento y activación, se forman las convertasas de C3 de la VC/VL (C4b2b) y de la VA (C3bBb), que cortan el C3 en C3a y C3b. C3b es una opsonina que, además de formar las convertasas de C5 al unirse a las convertasas de C3 ya existentes, es capaz de amplificar la activación al formar nuevas convertasas de C3. Las convertasas de C5 inician la vía terminal (VT) al cortar C5, lo que lleva a la generación de la anafilatoxina C5a y a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9, MAC) que es capaz de causar la lisis de las células diana. Para regular la activación del sistema del complemento existen numerosas proteínas capaces de actuar a distintos niveles.

El C1q circula unido a complejos serín-proteasas C1r-C1s inactivos de forma Ca^{2+} dependiente (Roumenina et al. 2005). Una vez unido a su superficie diana, la configuración del C1q cambia, permitiendo la autoactivación de C1r que posteriormente activa a C1s (Arlaud et al. 2002, Wallis et al. 2010, Gaboriaud et al. 2014).

Tras su activación, C1s es capaz de cortar proteolíticamente C4 y C2 para formar así la convertasa de C3 de la VC (C4b2b^1) en las proximidades del complejo de C1. Esta convertasa de C3 tiene actividad enzimática y es capaz de cortar C3 en sus dos fragmentos activos, C3a y C3b (Wallis et al. 2010).

La activación de la VC está controlada por una serpina, el C1 inhibidor (Davis, Lu & Mejia 2010). El C1 inhibidor se une a C1r y C1s y los inactiva, disociando el complejo del C1, liberando el C1q y dejando complejos de C1 inhibidor con C1r o C1s, que son inactivos. Existen también inhibidores de C1q que son liberados tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, como el condroitin sulfato 4, el grupo hemo, la calreticulina, etc. (Roumenina et al. 2011). En general, el mecanismo de acción de estos inhibidores consiste en alterar las propiedades electrostáticas del C1q al unirse a él (Roumenina et al. 2007).

1.1.2. Vía de las lectinas

Las moléculas de reconocimiento de la vía de las lectinas (VL) son MBLs (*Mannose Binding Lectin*), colectinas y ficolinas. Estas moléculas reconocen distintas estructuras de azúcares (PAMPs), muy escasas en las proteínas del huésped y en las superficies celulares propias y sanas, pero expresadas frecuentemente en bacterias, virus y células apoptóticas (Degn, Thiel 2013).

Una vez que las MBLs o las ficolinas han reconocido estos patrones de azúcares, las MASPs (*MBL associated serin-protease*) que van asociadas a ellas son activadas y pueden cortar C4 y C2, formándose la misma convertasa de C3 que en la VC, C4b2b (Wallis et al. 2010).

MASP-1 es necesaria para la activación de MASP-2, y ambas proteasas son capaces de cortar C2, mientras que MASP-2 es capaz además de activar C4 (Heja et al. 2012, Moller-Kristensen et al. 2007). MASP-1 y MASP-2 se asocian con diferentes moléculas de MBL o ficolinas, así que es necesario que estas moléculas de reconocimiento estén dispuestas de forma yuxtapuesta en las

¹ Según las recomendaciones del Comité para la Nomenclatura del sistema del Complemento, el fragmento de C2 que forma parte de la convertasa se denominará C2b, por analogía a los fragmentos de los demás componentes (Kemper, Pangburn & Fishelson 2014).

superficies de activación para facilitar la activación de las proteasas (Degn, Thiel 2013, Degn et al. 2013).

La activación de la VL está regulada por las proteínas MASP-3, MAp44, y MAp19 fundamentalmente. Estas proteínas compiten con MASP-1 y MASP-2 en su unión a las moléculas de reconocimiento pero no tienen capacidad para cortar otras MASPs, C2 o C4 (Degn et al. 2009)(Degn et al. 2013, Degn et al. 2009). Además, el C1inhibidor también puede inhibir la activación de MASP-1 y MASP-2.

1.1.3. Vía alternativa

La vía alternativa (VA) no tiene una molécula de reconocimiento e iniciación como la VC y la VL, aunque la properdina puede funcionar como tal en ciertas situaciones, uniéndose a algunas superficies como bacterias y células apoptóticas o necróticas, y sirviendo de plataforma para la formación de convertasas al reclutar moléculas de C3b para iniciar la activación de la VA (Spitzer et al. 2007, Kemper, Atkinson & Hourcade 2010).

Una de las principales funciones de la VA en condiciones fisiológicas es la detección de “superficies activadoras” como microorganismos, materiales artificiales o células o *debris* que carezcan de proteínas reguladoras. Para ello, la VA mantiene una activación basal constitutiva conocida como “*tick-over*”. El “*tick-over*” consiste en la hidrólisis espontánea de un enlace tioéster en la molécula de C3, convirtiéndola en C3(H₂O) (Pangburn, Schreiber & Muller-Eberhard 1981). Esta transformación expone en el C3(H₂O) un sitio de unión a factor B (FB), que una vez fijado al C3(H₂O) es susceptible de ser cortado y activado por una serín-proteasa, el factor D (FD), generando una convertasa de C3 en fase fluida (C3(H₂O)Bb) (Bexborn et al. 2008, Forneris et al. 2010). Este complejo proteico puede cortar moléculas de C3 en sus fragmentos activos, C3a y C3b. Este C3b es capaz de unirse a casi cualquier superficie situada en las proximidades, aunque la mayoría de estas moléculas son inactivadas rápidamente en las células del huésped, imposibilitando su difusión lejos del lugar donde se han generado. El C3b unido a las superficies expone de igual manera que el C3(H₂O) sitios de unión a FB, que al unirse a C3b es a su vez activado por el FD.

El FD es una proteasa sintetizada como zimógeno (Yamauchi et al. 1994). Tras su activación, se une y corta al complejo C3bB, liberando el fragmento Ba del FB y formándose así la convertasa de la VA (C3bBb).

El complejo C3bBb tiene una vida media corta, por lo que es necesario que sea estabilizado para asegurar una respuesta eficiente (Kemper, Atkinson & Hourcade 2010). Este papel estabilizador recae en la properdina, que aumenta la vida media de la convertasa de la VA de 5 a 10 veces (Fearon, Austen 1975). La unión de la properdina al complejo de la convertasa distorsiona el sitio de unión del factor H (FH) al C3b, lo que explica la resistencia de las convertasas estabilizadas a la disociación mediada por el FH (Kouser et al. 2013, Alcorlo et al. 2013).

La activación del complemento por cualquiera de las tres vías conduce a la formación de las convertasas de C3, C4b2b y C3bBb. El producto generado por estos complejos con actividad proteolítica, C3b, es a su vez necesario para la formación de más convertasas de la VA, de manera que cada nueva molécula de C3b que se genera puede formar nuevas convertasas, constituyendo el *loop* de amplificación del complemento a través de la VA (Lachmann 2009). La unión de una segunda molécula de C3b a cualquiera de los complejos de las convertasas de C3, ya sea de la VC/VL como de la VA, cambia la especificidad de estos complejos, dando lugar a las convertasas de C5 (C4b2bC3b o C3bBbC3b), e iniciando así la etapa lítica del sistema del complemento (Pangburn, Rawal 2002).

1.1.4. Vía terminal

Las convertasas de C5 cortan C5 generando C5a, una potente anafilatoxina, y el fragmento C5b. A este C5b se unen progresivamente los componentes C6, C7, C8 y varias unidades de C9, formando el complejo de ataque a la membrana (MAC), que forma un poro al insertarse en la membrana de la célula diana (Tegla et al. 2011, Hadders et al. 2012)(Tegla et al. 2011, Hadders et al. 2012). Una sola unidad de MAC es capaz de lisar por ósmosis las células metabólicamente inactivas, como lo son los eritrocitos, pero para lisar mediante el complemento células nucleadas es necesario que numerosos MACs se inserten en la membrana de la célula, generando un flujo de Ca^{2+} y que haya transducción de diversas señales no muy conocidas, constituyendo un proceso activo (Koski et al. 1983).

1.2. REGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

La activación del complemento puede ser perjudicial para el huésped en algunos casos, por lo que debe ser finamente regulada para evitar el daño autólogo en casos de activación inespecífica o excesiva (Ricklin et al. 2010).

Existe una serie de mecanismos que limitan la acción del complemento a las superficies activadoras, ya sean patógenos, células apoptóticas, inmunocomplejos, etc. Estos mecanismos, a cargo de diversas proteínas solubles y de membrana, pueden actuar a distintos niveles de la cascada, bloqueando los primeros pasos de la activación, inhibiendo las convertasas o el MAC. Debido a que el paso central de la activación del complemento es la generación de las convertasas de C3, éste es un punto que está sometido a una regulación muy estrecha. Las convertasas de C3 se inhiben mediante la inactivación enzimática de C3b y C4b o promoviendo la disociación de los complejos en la llamada aceleración de la disociación de las convertasas.

Otro punto clave de la activación del sistema del complemento es el corte y activación de C5 y la formación del MAC. A este nivel también existen diferentes reguladores (Noris, Remuzzi 2013).

1.2.1. Regulación a nivel del complejo de ataque a la membrana

CD59 es una proteína de membrana anclada a GPI (Glicofosfatidilinositol) que se expresa en casi todos los tipos celulares (Yamashina et al. 1990). Su función es impedir la polimerización de C9 para formar el MAC. Además la clusterina impide la unión de C9 al complejo C5b-8 (Tschopp et al. 1993, McDonald, Nelsestuen 1997) y la vitronectina inhibe la inserción del complejo C5b-7 en las membranas celulares (Podack, Kolb & Muller-Eberhard 1977). Por último, los complejos líticos que se forman en las membranas pueden ser eliminados en minutos mediante la liberación de vesículas de la membrana o mediante su internalización y degradación (Moskovich, Fishelson 2007).

1.2.2. Inactivación de C3b/C4b por Factor I

El Factor I (FI) es una serín-proteasa circulante que corta C3b en presencia de diferentes cofactores, generando un producto de degradación del C3b, iC3b, que es incapaz de interaccionar

con el FB y formar así convertasas de C3. De igual manera es capaz de cortar proteolíticamente C4b, inactivándolo y evitando la formación de convertasas de la vía clásica (Nilsson et al. 2011).

El FI circula en su forma proteolítica pero con una conformación inactiva. Su unión a cualquiera de sus cofactores produce un cambio en su conformación, pasando a ser activo y capaz de cortar proteolíticamente al C3b (Roversi et al. 2011).

Los cofactores del FI pueden ser solubles, como C4BP (*C4 Binding Protein*) o FH, del que se hablará en detalle más adelante, o de membrana, como MCP (*Membrane Cofactor Protein*, CD46) o CR1 (Receptor de complemento 1, CD35) (Noris, Remuzzi 2013).

MCP se encuentra en todas las células nucleadas y CR1 se expresa en leucocitos, eritrocitos y podocitos. Ambas proteínas sirven como cofactores para la proteólisis de C3b y C4b mediada por FI (Cardone, Le Friec & Kemper 2011, Liszewski, Atkinson 2015, Java et al. 2015). Además, CR1 es capaz de inducir otro corte en iC3b, generando el fragmento C3dg y C3c (Kim, Song 2006).

C4BP es una proteína plasmática que actúa como cofactor en la inactivación de C4b (Ermert, Blom 2016).

1.2.3. Disociación de las convertasas

Para evitar el daño celular provocado por un depósito excesivo de C3b en su superficie que sea capaz de formar convertasas, éstas han de ser disociadas. Para ello existen múltiples proteínas reguladoras capaces de liberar el fragmento Bb, permitiendo que el C3b que queda sea inactivado por el FI (Hourcade et al. 2002).

C4BP y FH son proteínas solubles, que además de actuar como cofactores del FI, son capaces de disociar las convertasas de C3 de la VC y VA, respectivamente. DAF (*Decay Accelerating Factor*, CD55) y CR1 son proteínas de membrana que actúan sobre todas las convertasas de C3 y sobre las de C5 (Noris, Remuzzi 2013, Hourcade et al. 2002)(Noris, Remuzzi 2013, Hourcade et al. 2002). Además, CR1 también es cofactor del FI para la proteólisis de C4b y C3b.

Tabla 1. Principales reguladores del sistema del complemento

Regulador	Tipo de proteína	Vía que regula	Punto de regulación	Función
C1 Inhibidor	Soluble	VC, VL	Complejo C1q-C1r-C1s, MASP1/2	Disociación de los complejos de C1 y de MBL-MASP1/2 inhibiendo las serín proteasas
FI	Soluble	VC, VL, VA	C4b, C3b	Inactiva proteolíticamente C3b y C4b, utilizando cofactores
FH	Soluble	VA	C3b y convertasa de C3	Compite con FB por la unión a C3b, acelera la disociación de las convertasas y es cofactor del FI
C4BP	Soluble	VC, VL	C4b, convertasa de C3	Acelera la disociación de la convertasa, cofactor del FI para de inactivación de C4b
MCP (CD46)	Membrana	VC, VL, VA	C4b, C3b	Cofactor del FI para la inactivación de C3b y C4b
CR1 (CD35)	Membrana	VC, VL, VA	C4b, C3b, convertasas de C3 y C5	Disocia la convertasa de C3/C5 y es cofactor del FI para la inactivación de C3b y C4b
DAF (CD55)	Membrana	VC, VL, VA	Convertasas de C3 y C5	Acelera la disociación de las convertasas
CD59	Membrana	VT	C9	Impide la polimerización de C9 para formar el MAC
Clusterina	Soluble	VT	C5b-8, C9	Impide la incorporación de C9 en la formación del MAC
Vitronectina	Soluble	VT	C5b-7	Inhibe la inserción del complejo C5b-7 en la membrana

1.2.4. Factor H

El FH es el principal regulador de la VA, actuando tanto en fase fluida como en las superficies celulares, a través de los siguientes mecanismos (Rodriguez de Cordoba et al. 2004, Ferreira, Pangburn & Cortes 2010):

1. Compite con el FB por la unión a C3(H₂O) y C3b, evitando la formación de nuevas convertasas.
2. Acelera la disociación de las convertasas de C3 ya formadas.
3. Actúa como cofactor del FI para la inactivación proteolítica de C3b.

El FH es una glicoproteína de unos 150kD, organizada en 20 dominios globulares llamados SCRs (*Short Consensus Repeats*) (Figura 2). Cada dominio SCR está formado por 60 aminoácidos con unos puentes disulfuro altamente conservados.

Los 4 SCRs situados en posición N-terminal del FH (SCRs 1-4) incluyen un sitio de unión a C3b, y es en ellos donde reside la actividad de aceleración de la disociación de las convertasas así como la actividad como cofactor del FI. De esta forma se define una zona con actividad reguladora en el FH (Kuhn, Zipfel 1996).

En la zona central se encuentra una región implicada en el reconocimiento y unión a superficies en los SCRs 6 a 8, que reconocen heparina y otros glicosaminoglicanos, y otra región de unión a C3b, situada entre los SCRs 12 y 14 o muy próxima a ellos (Jokiranta et al. 2000)

Los SCRs C-terminales, SCRs 19-20, interaccionan con C3b y con polianiones presentes en las superficies celulares, entre ellos ácido siálico, heparina, heparan sulfato, y diferentes glicosaminoglicanos (Ferreira, Pangburn & Cortes 2010). La unión de estos dominios C-terminales a estas moléculas permite al FH diferenciar las células propias de superficies activadoras, evitando la activación del complemento en las células del huésped y el daño autólogo que éste causaría (Weiler et al. 1976, Pangburn 2000, Blaum et al. 2015).

Además del FH, existen otras seis proteínas relacionadas con él, que conforman la familia de proteínas relacionadas con el FH (FHRs), compuesta por FHL-1 y los FHRs 1-5 (Skerka et al. 2013, Jozsi, Meri 2014)(Skerka et al. 2013, Jozsi, Meri 2014) (Figura 2).

El FHL-1 es un producto del *splicing* alternativo del gen del FH que contiene los 7 primeros SCRs seguidos de 4 aminoácidos adicionales (Ser-Phe-Thr-Leu) en su extremo N-terminal. El FHL-1 es capaz de regular el complemento en fase fluida ya que contiene los dominios con capacidad de

disociar convertasas y con la actividad cofactora del FI, pero al carecer de los SCRs C-terminales es incapaz de unirse a las membranas (Kuhn, Zipfel 1996).

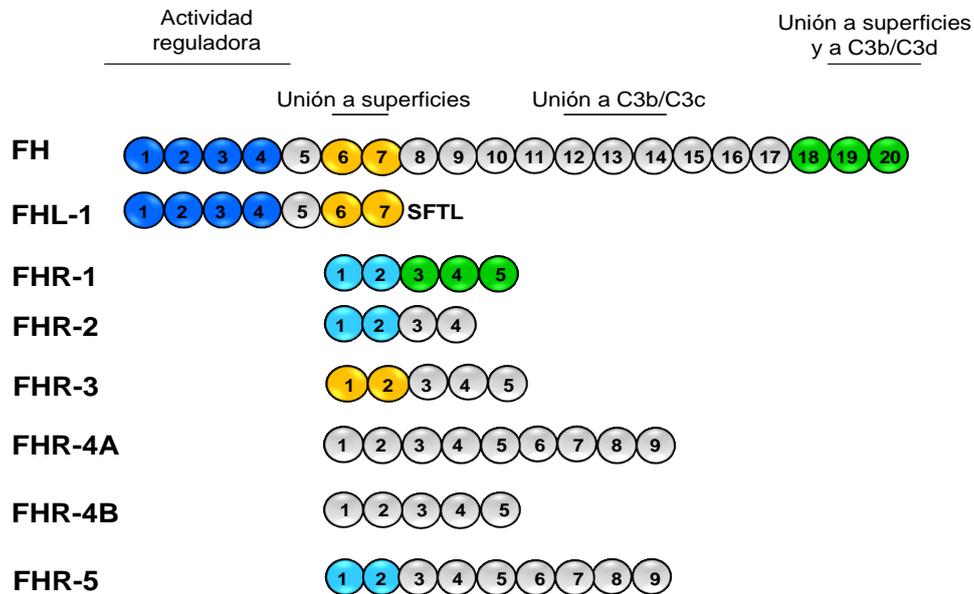


Figura 2: Factor H y proteínas relacionadas con el FH (FHRs): Esquema de la estructura del FH y de las FHRs. Las zonas de unión a distintos ligandos, así como la zona con actividad cofactora y de disociación de la convertasa del FH aparecen indicadas. Los colores indican homología (de más del 75%) entre los SCRs de las distintas proteínas. FHL-1 es una forma de *splicing* alternativo de FH, que contiene los siete primeros SCRs de FH seguidos de cuatro aminoácidos en su extremo C-terminal (SFTL). Los dos primeros SCRs de FHR-1, FHR-2 y FHR-5, son dominios de polimerización (en azul claro), con elevada homología entre ellos. Los tres dominios C-terminales de FHR-1 (SCRs 3 a 5) comparten entre un 97 y 100% de homología con los SCRs 18-20 del FH (en verde).

Las proteínas FHRs están codificadas por 6 genes diferentes situados en el cromosoma 1, en la región RCA (reguladores de la activación del complemento), a continuación del FH. El segmento que comprende los genes de la familia del FH incluye largas repeticiones con alta homología de secuencia. Estas regiones permiten procesos de recombinación no homólogos, que producen la pérdida o duplicación de algunas de estas proteínas o la generación de proteínas híbridas ((Skerka et al. 2013, Jozsi, Meri 2014).

Los FHRs están formados por un número variable de SCRs, que conservan distintos grados de homología con los SCRs de la región C-terminal (SCRs 18-20) y los SCRs 6-7 del FH, ambas zonas implicadas en el reconocimiento de superficies. Además FHR-1, 2 y 5 poseen los denominados dominios de polimerización en sus SCRs 1 y 2 (Goicoechea de Jorge et al. 2013) (Figura 2).

La función de estas proteínas aún no está clara del todo, pero parece que mediante la competición con el FH por la unión a los mismos ligandos favorecen la activación del complemento en determinadas circunstancias (Jozsi et al. 2015), aunque en algunos casos parece que inhiben la vía terminal, al menos *in vitro*.

2. COMPLEMENTO Y PATOLOGIA RENAL

Existen numerosas enfermedades inflamatorias, autoinmunes, relacionadas con el envejecimiento, etc., asociadas tanto a una activación defectuosa del complemento como a una activación excesiva y no controlada de éste, en el lugar y/o en la duración de la respuesta.

Entre ellas existen varias enfermedades renales en cuya patogénesis está directamente implicado el sistema del complemento, sugiriendo que este órgano es particularmente susceptible al daño mediado por complemento. Entre ellas están el síndrome hemolítico urémico atípico, las glomerulopatías C3 y la nefritis lúpica.

2.2. SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO

El Síndrome hemolítico urémico (SHU) es una entidad clínica definida por la aparición de anemia hemolítica no inmune, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (Figura 3). La mayoría de los casos de SHU están causados por infecciones de *E. coli* productoras de toxina de Shiga, lo que se conoce como SHU típico. Esta enfermedad afecta predominantemente a niños y tiene en general buen pronóstico. En cambio, aproximadamente en el 10% de los casos, este SHU se produce por una desregulación genética o adquirida de la VA del complemento. Este SHU relacionado con el complemento es el SHU atípico (SHUa), con una incidencia anual de entre 0,5 y 3 casos por millón de habitantes (Noris, Remuzzi 2015). A diferencia del típico, el SHUa tiene mal pronóstico con un alto porcentaje de pacientes llegando a la insuficiencia renal terminal (Loirat, Fremeaux-Bacchi 2011, Nester, Thomas 2012), al menos hasta el uso del Eculizumab

(anticuerpo monoclonal anti-C5). El SHUa puede presentarse a cualquier edad, aunque es más frecuente en niños y adultos jóvenes, con una distribución por sexos similar (revisado en (Nester et al. 2015, Campistol et al. 2015)).

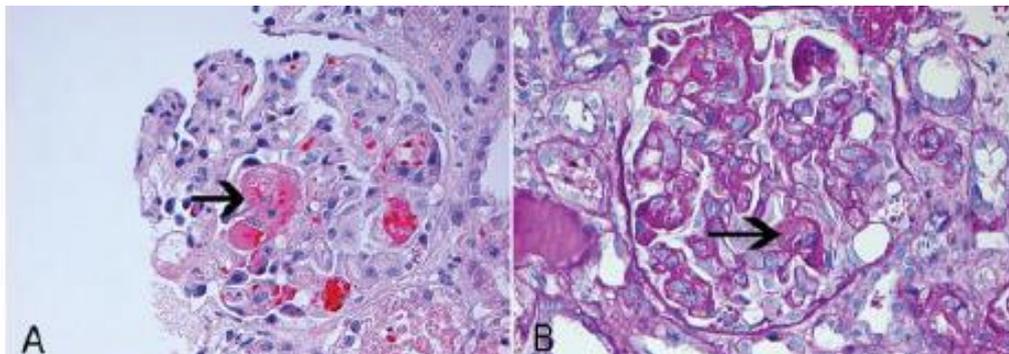


Figura 3: Biopsia renal representativa de SHUa. En ambas imágenes se observan trombos de fibrina en los capilares glomerulares, con fragmentos de hematíes en su interior (flechas negras), hallazgo característico en las biopsias renales de pacientes de SHUa. A) Hematoxilina-Eosina. B) Ácido periódico de Schiff, ambas 40x. De (Sethi, Fervenza 2014)

El SHUa está asociado a una desregulación de la VA. Aproximadamente un 60% de los pacientes de SHUa son portadores de alguna mutación en los genes de proteínas reguladoras o de componentes de la convertasa de la VA. Las mutaciones en *CFH*, *CFI*, o *MCP* causan un defecto de regulación y las mutaciones en *CFB* o *C3* resultan en una convertasa más activa o resistente a la acción de las proteínas reguladoras. En esta patología, el complemento induce un daño en el endotelio glomerular, debido a una activación no controlada de la VA con depósito de C5b-9 en las superficies celulares (Mele, Remuzzi & Noris 2014). Este C5b-9 depositado en concentraciones sublétricas promueve un estado protrombótico del endotelio, que favorece la adhesión y agregación plaquetaria, e induce que la matriz subendotelial quede expuesta (Noris, Remuzzi 2015). Dado que las lesiones están causadas por la activación de C5, la aparición del Eculizumab, que impide la proteólisis y activación de la molécula de C5, ha tenido un gran impacto en la práctica clínica mejorando considerablemente el pronóstico que tenían estos pacientes.

La penetrancia del SHUa en portadores de mutaciones en genes del complemento es del 50%, con gran variabilidad en la presentación clínica entre pacientes con la misma mutación, incluso

dentro de la misma familia. Esto se debe a la existencia de más factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, que modulan el desarrollo de esta enfermedad. Esta penetrancia incompleta se explicaría por la teoría de los “*multiple hits*”, en la que para el desarrollo de la enfermedad es necesario que coincidan mutaciones y/o polimorfismos de riesgo, con autoanticuerpos o algún desencadenante ambiental (infecciones, medicamentos, parto, trasplantes, etc.) (Nester et al. 2015).

Las mutaciones en *CFH* son el hallazgo más frecuente, encontrándose en aproximadamente el 25% de los pacientes (Rodríguez de Cordoba et al. 2014). Estas mutaciones no están distribuidas de forma homogénea a lo largo del gen, si no que se agrupan en el extremo C-terminal (Rodríguez de Cordoba et al. 2014, Perez-Caballero et al. 2001)(Rodríguez de Cordoba et al. 2014, Perez-Caballero et al. 2001), que es la región que está implicada en la unión y el reconocimiento de las superficies celulares (Pangburn 2000, Perez-Caballero et al. 2001, Pickering et al. 2007). De esta forma disminuyen la protección de las células frente a una activación del complemento, pero no afectan a la regulación en plasma (Sanchez-Corral et al. 2004).

También se han encontrado autoanticuerpos dirigidos frente al FH en el 3-56% de los pacientes dependiendo del origen étnico de las series y de la edad de los pacientes (Dragon-Durey et al. 2005, Hofer, Giner & Jozsi 2014, Sinha et al. 2014). Estos autoanticuerpos causan un defecto funcional similar al de las mutaciones, ya que bloquean el extremo C-terminal del FH (Jozsi et al. 2007, Strobel et al. 2010a). La presencia de estos autoanticuerpos, en la mayoría de los casos, está asociada a la deficiencia de FHR-1 (Abarrategui-Garrido et al. 2009, Dragon-Durey et al. 2009, Hofer et al. 2013).

De igual manera que los anticuerpos anti-FH producen un efecto análogo al de las mutaciones en FH, se han buscado autoanticuerpos frente a otras proteínas del sistema del complemento implicadas en la patogénesis de SHUa. En este sentido, existe una publicación en la que se describen los autoanticuerpos anti-FI hallados en tres pacientes de una amplia serie. Aunque la unión de estos autoanticuerpos a FI era específica, no se demostró que éstos tuvieran un efecto sobre este regulador (Kavanagh et al. 2012).

2.3. GLOMERULOPATÍA C3

Las glomerulopatías C3 (C3G) son un conjunto de enfermedades crónicas renales caracterizadas por presentar depósitos de C3 en el glomérulo, principalmente en mesangio y en la membrana basal glomerular, con inmunoglobulinas ausentes o escasas (Fakhouri et al. 2010,

Pickering et al. 2013) (Figura 4). De esta forma se separan las glomerulonefritis mediadas por el complemento de otras glomerulonefritis.

Bajo la denominación de C3G se agrupan tres patologías, la nefropatía CFHR5 (Gale et al. 2010), la glomerulonefritis C3 (C3GN) y la enfermedad por depósitos densos (EDD), ésta última caracterizada por la presencia de depósitos electrón-densos en la membrana basal glomerular distinguibles por microscopía electrónica (Servais et al. 2013) (Figura 4).

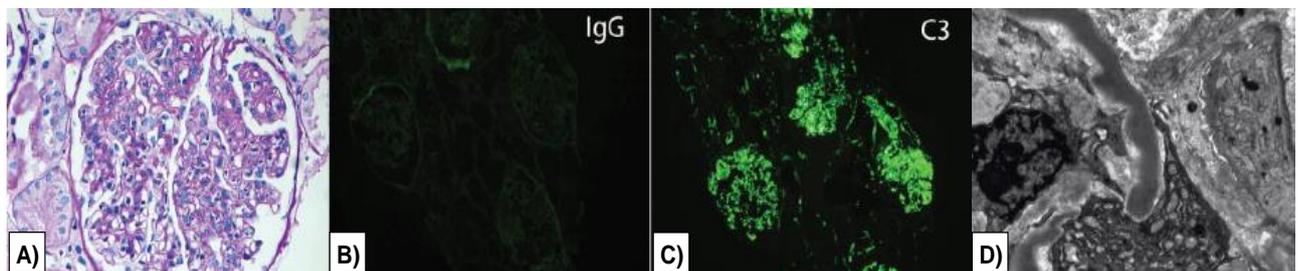


Figura 4: Imágenes de biopsias representativas de C3G. A) Glomérulo renal con glomerulonefritis membranoproliferativa (Ácido peryódico de Schiff, 40x). B y C) Inmunofluorescencia, negativa para IgG y con tinción brillante para C3 en el mesangio y en las paredes capilares (10x)(Sethi, Fervenza 2014). D) Depósito electrón-denso, osmiofílico a lo largo de la membrana basal glomerular que se puede observar en EDD, con un patrón típico en forma de “ristra de salchichas”(Barbour, Pickering & Terence Cook 2013).

En el caso de las dos últimas, el mecanismo patogénico es debido a una activación descontrolada de las convertasas de C3/C5, lo que lleva al depósito de C3 y sus productos de activación y de componentes de la vía terminal, provocando la inflamación glomerular (Pickering et al. 2013, Sethi et al. 2009)(Pickering et al. 2013, Sethi et al. 2009). Tanto en la C3GN como en la EDD se observa una sobreactivación de la VA, con una mayor desregulación de la convertasa de C3 en los pacientes de EDD, y de la vía terminal en los de C3GN.

Clínicamente pueden presentarse con proteinuria en rango variable, hematuria, hipertensión e insuficiencia renal. La EDD se presenta más frecuentemente en niños y la C3GN tiene una edad al diagnóstico mayor. Estas glomerulopatías están asociadas con el desarrollo de una insuficiencia

renal crónica, que en un alto porcentaje de los casos acaba en insuficiencia renal terminal, con una alta tasa de recurrencia post-transplante (Servais et al. 2013).

En la C3G se han encontrado mutaciones en los genes de *C3*, *CFH*, *CFB*, *CFHR5* y variaciones en el número de copias en los genes de las FHRs (revisado en(Zhang et al. 2012)). Estas mutaciones producen una convertasa resistente a la disociación por los reguladores, en el caso de C3 o FB, o una incapacidad para regular el complemento en fase fluida (FHRs, FH).

En el caso del FH, estas mutaciones están situadas en los siete primeros SCRs generalmente, provocando una desregulación de la VA en fase fluida, o una deficiencia cuantitativa de este regulador.

También se han descrito diferentes variaciones en el número de copias que afectan a la familia de los FHRs asociadas a la C3G. Estas inserciones, duplicaciones y deleciones pueden afectar a algunos SCRs o a las proteínas completas y en muchos casos generan proteínas híbridas o anómalas.

La desregulación de la VA observada en las C3G además de una causa genética, puede ser adquirida. En aproximadamente el 80% de los pacientes con EDD y en un 50% de los pacientes con C3GN aparece un autoanticuerpo frente a la convertasa de C3 denominado factor Nefrítico (C3NeF) (Daha, Fearon & Austen 1976). El C3NeF es un autoanticuerpo que reconoce un neoepítipo que se genera en la convertasa y la estabiliza, manteniéndola activa más tiempo y provocando una hipocomplementemia secundaria. Los C3NeF son un grupo heterogéneo de anticuerpos, que además del complejo de la convertasa pueden reconocer alguno de sus componentes de forma aislada en algunos casos, y que producen diferentes efectos sobre la activación del complemento. También se ha hallado el C3NeF en otros tipos de glomerulonefritis (Appel et al. 2005, Servais et al. 2012)(Appel et al. 2005, Servais et al. 2012), en algunos casos de lupus eritematoso sistémico (Walport et al. 1994) y en individuos sanos, por lo que en algunos casos es difícil determinar si el autoanticuerpo es la causa de la patología o si aparece de forma secundaria por la presencia continua de estos neoepítipos, sobre todo porque no se ha llegado a establecer una correlación con la clínica en los pacientes.

También se han descrito casos aislados de pacientes con autoanticuerpos anti-FB (Strobel et al. 2010b) y anti-FB y anti-C3b de forma simultánea (Chen et al. 2011). En ambos casos estos anticuerpos producían un aumento de la actividad de la convertasa.

Por último, se han descrito también anticuerpos anti-FH en pacientes con C3G (Meri et al. 1992, Jokiranta et al. 1999, Goodship et al. 2012, Blanc et al. 2015, Nozal et al. 2012). Esta asociación es mucho menos frecuente que en el caso del SHUa a pesar de estar descritos por

primera vez con anterioridad (Meri et al. 1992). En los casos en los que se ha estudiado el efecto de estos anticuerpos, se ha comprobado que inhiben la actividad reguladora del FH al reconocer y bloquear su región N-terminal (Goodship et al. 2012, Blanc et al. 2015, Nozal et al. 2012).

2.4. NEFRITIS LÚPICA

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica, en la que se producen numerosos autoanticuerpos y en la que los inmunocomplejos circulantes se depositan en varios órganos, principalmente en riñón, piel y articulaciones, causando inflamación y daño en los diversos tejidos. La nefritis lúpica es una de sus manifestaciones más graves y comunes, pudiendo afectar a más del 50% de los pacientes (Birmingham et al. 2010). En las biopsias renales de pacientes con nefritis lúpica se encuentran depósitos de inmunoglobulinas, C1q, C3, C4, etc., en lo que se denomina un patrón “*full-house*”, prácticamente exclusivo de esta entidad (Figura 5). El sistema del complemento tiene un papel relevante y dual en la patogénesis del LES. Por un lado, deficiencias de alguno de los componentes de la vía clásica están fuertemente asociadas a la aparición del LES, pero a su vez el complemento es uno de los principales causantes de la inflamación y del daño tisular que se observa en los tejidos (Truedsson, Bengtsson & Sturfelt 2007). El doble papel del sistema del complemento se debe, por una parte, a su participación en la correcta eliminación de los inmunocomplejos de la circulación y en la modulación sobre el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia, y por otra parte, a su participación en la inflamación.

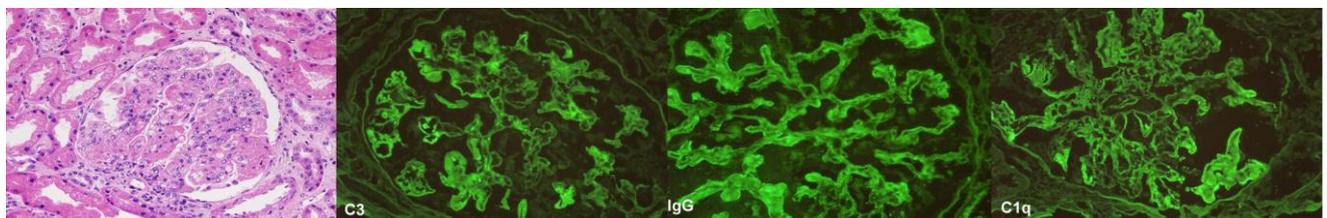


Figura 5: Biopsia renal en una paciente con nefritis lúpica. Tinción con hematoxilina-eosina en la que se observa un patrón de glomerulonefritis proliferativa difusa y global. En las imágenes de inmunofluorescencia se observan depósitos intensos de C3, IgG y C1q.

Una vez que los inmunocomplejos se depositan en el glomérulo renal, se activa la VC, produciendo el depósito de C1q, C4b, C3b y la liberación de las anafilatoxinas que inducen la infiltración y activación leucocitaria. Aunque inicialmente el complemento se active por la VC en estas circunstancias, la VA es necesaria para el desarrollo de la nefritis (Birmingham, Hebert 2015). Los niveles de C3 y C4 circulantes reflejan este hecho, de forma que los niveles bajos de C4 indican una activación de la VC que se puede producir con meses de antelación a la aparición de un episodio de nefritis, mientras que los niveles bajos de C3 se asocian con el desarrollo de las manifestaciones clínicas (Birmingham et al. 2010). Esto sugiere que la activación de la VC no es suficientemente potente para provocar el daño renal, y que es necesaria la activación de la VA para generar suficientes mediadores inflamatorios y conducir a las lesiones glomerulares. De hecho, la aparición de depósitos de proteínas de la VA en el glomérulo renal, indicativo de la activación de esta vía, se asocia con una mayor duración de la nefritis, una mayor fibrosis y un mayor grado de proteinuria (Sato et al. 2011). La implicación de la VA en el desarrollo de la nefritis lúpica también se ha comprobado en modelos animales. En ratones MRL/lpr, modelo de LES, las deficiencias de componentes de la VA que impiden su activación reducen el daño en el glomérulo (Watanabe et al. 2000, Elliott et al. 2004), y la deficiencia de FH, que causa una activación descontrolada de esta vía, acelera y agrava la aparición de la nefritis (Bao, Haas & Quigg 2011).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterizar en profundidad los autoanticuerpos frente al FH.
 - 1.1. Analizar el efecto que tiene la presencia de autoanticuerpos anti-FH sobre los niveles de FH circulantes y su cuantificación.
 - 1.2. Determinar la región/regiones que reconocen los autoanticuerpos anti-FH dentro de la molécula en pacientes de SHUa, C3G y LES.
 - 1.3. Estudiar las características biológicas de los autoanticuerpos anti-FH y su evolución a lo largo del tiempo en pacientes con SHUa.
 - 1.4. Estudiar los efectos funcionales de los autoanticuerpos anti-FH en C3G.

2. Determinar la frecuencia de la presencia de autoanticuerpos frente a otras proteínas de la VA distintas a FH (FI, FB, C3 y properdina) en enfermedades renales mediadas por complemento.

3. Estudiar el posible papel patogénico de los autoanticuerpos frente a FI, FB, C3 y properdina en las diferentes patologías.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ELISAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la cuantificación de proteínas del sistema del complemento mediante ELISA, el protocolo general es el siguiente:

En placas de 96 pocillos se siembra el anticuerpo correspondiente diluido en tampón $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ 0,1M pH 9,3 durante toda la noche a 4°C. La placa se lava entre cada paso tres veces con PBS-Tween 20 0,1% (PBS-T). Tras el lavado se satura con PBS-BSA 1%, salvo si se indica otra cosa, durante 1h a 37°C. Posteriormente se añaden las muestras a las diluciones que corresponda y se incuban 1 h a 37°C. Para detectar la proteína problema, se añade un nuevo anticuerpo frente a ésta diluido en PBS-T, y tras incubar y lavar, se añade un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. La reacción se revela usando ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato]) como sustrato, parando la reacción con azida sódica al 1% y leyendo la absorbancia a 405 nm.

- **Cuantificación de FI:** se pega en la placa el anticuerpo monoclonal anti- FI 2 (A231, Quidel) como anticuerpo de captura y se utiliza un antisuero de cabra anti-FI humano (A313, Quidel) para detectar el FI. Posteriormente se añade un anticuerpo frente a las inmunoglobulinas de cabra marcado con peroxidasa. Los valores de FI en los sueros se expresan en porcentaje frente a un pool de sueros humanos normales (SHN).
- **Cuantificación de properdina:** se usan como anticuerpos de captura el anticuerpo monoclonal FP_1 o FP_2 (A233 o A235, Quidel) indistintamente, ya que ambos reconocen la properdina de forma análoga, obteniendo con ambos curvas estándar equivalentes (Corvillo et al. 2016). Como curva estándar se usa properdina purificada (Comptech, a 1mg/ml) empezando en una dilución 1/375 en PBS-BSA 1%. La properdina unida se detecta mediante un anticuerpo policlonal anti-properdina humana (Quidel).
- **Cuantificación de FB:** en dos placas se siembra la fracción IgG proveniente de un antisuero anti-FB humano (Calbiochem). Como curva se utiliza factor B purificado (Comptech), además de un SHN previamente cuantificado. Para detectar el FB unido se usan dos anticuerpos monoclonales, anti-Bb y anti-Ba (A227 y A225 respectivamente, Quidel), uno en cada placa.
- **Cuantificación FH:** se siembran dos monoclonales, A229 (Quidel) y Ox24 (proporcionado por el Dr. Rodríguez de Córdoba), dirigidos cada uno frente a un extremo de la molécula. Como curva estándar se usa un SHN previamente valorado frente a FH purificado, y después de incubar las muestras se añade un anticuerpo policlonal anti-FH (Nozal et al. 2014).

2. ELISAS PARA LA DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS

En general, para estos ELISAS se pegan a la placa 100 ng/pocillo de la proteína purificada frente a la que se van a buscar autoanticuerpos, bien en $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0,1M pH 9,3 o en PBS, incubándola toda la noche a 4°C. Tras lavar y saturar, se añaden las muestras diluidas en PBS-BSA 0,1% de 1/50 a 1/200, incubándolas 1h a 37°C, a no ser que se indique otra cosa. Después de lavar la placa, se añade un anticuerpo policlonal frente a la IgG humana marcado con peroxidasa (Jackson) diluido 1/5000 en PBS-T y se revela usando ABTS como sustrato. Para los anti-FB, FI, C3 y properdina, se utiliza como curva una muestra de un paciente a la que se le ha asignado de forma arbitraria un título de 2000 UA/ml.

- **Anticuerpos anti-FB:** se siembran 100 ng/pocillo de FB (A408, Quidel) diluido en PBS y la placa se satura con PBS-BSA 3%.
- **Anticuerpos anti-Properdina:** se usan 100 ng/pocillo de properdina (Calbiochem) en PBS, saturando después con PBS-BSA 3%.
- **Anticuerpos anti-FI:** se pegan 100 ng/pocillo de FI (A411, Quidel) en PBS, saturando la placa con PBS-BSA 0,1%.
- **Anticuerpos anti-C3:** se siembran 100 ng/pocillo de C3 purificado (procedente del laboratorio del Dr. Rodríguez de Córdoba) en PBS y se utiliza PBS-BSA 0,1% para saturar.
- **Anticuerpos anti-FH:** se pegan 200 ng/pocillo de FH diluido en PBS, y se utiliza PBS-T tanto como para lavar como para bloquear. Las muestras de suero se diluyen en PBS-T-BSA 0,1%. Como referencia se utiliza una muestra titulada en 2000 AU/ml, proporcionada por la Dra. Dragon-Durey (Hôpital Georges Pompidou, Paris).

3. ELISAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS

3.1. Determinación de la subclase y cadena ligera de los autoanticuerpos.

Para caracterizar los autoanticuerpos anti-FH con más detalle, se realizaron ELISAs análogos a los de detección de estos autoanticuerpos pero usando anticuerpos monoclonales anti-IgG1, 2 y 3 conjugados con peroxidasa para determinar la subclase de IgG (Southern Biotech), o anticuerpos frente a la cadena ligera lambda y kappa (Dako).

3.2. Competición por la unión a FH con anticuerpos monoclonales

Para determinar los sitios de unión de los autoanticuerpos anti-FH a esta proteína, se llevaron a cabo ELISAS de competición con anticuerpos monoclonales con epítipo conocido. Sobre placas con FH pegado, 20 µg/ml de los diferentes anticuerpos monoclonales se incuban durante 15 min. Tras esta incubación se añaden los sueros de los pacientes, y después de una hora de incubación, los autoanticuerpos se detectan mediante un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa.

En el caso de los pacientes de SHUa y autoanticuerpos se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales, con las siguientes especificidades:

- A254: SCR1
- A255: región central del FH
- A229: región C-terminal
- IXF9: SCR18
- VIG8: SCR19-20
- C-18: SCR20

En el caso de la paciente con EDD, se usaron un anticuerpo monoclonal dirigido frente a los SCRs 1 a 4 y otro dirigido frente a los SCR 19 y 20, además de un anticuerpo policlonal.

3.3. Caracterización del dominio de reconocimiento de los anti-FH

Para determinar frente a qué región del FH están dirigidos los autoanticuerpos de los pacientes se usaron diferentes fragmentos recombinantes de FH obtenidos de levaduras (proporcionados por el Dr. Jokiranta). Se siembran 50 ng/ pocillo de cada fragmento (SCRs 1-4, SCRs 6-8, SCRs 19-20), de FH y de albúmina humana en una placa usando $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0,1M pH 9,3 e incubando toda la noche a 4°C. La placa se satura con PBS-BSA 0,1% (1 hora a 37°C), y a continuación se añaden las muestras de los pacientes. Después de incubar 1 hora a 37°C, los anticuerpos unidos a los distintos fragmentos o a la albúmina humana (uniones inespecíficas) se detectan mediante un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Jackson) y usando ABTS como sustrato.

3.4. Determinación del epítopo que reconocen los anticuerpos frente a FH en el SCR20

Para determinar en detalle el epítopo que reconocen los anti-FH en el SCR 20 del FH, se usó una batería de 13 fragmentos recombinantes, cada uno de los cuales presenta una mutación puntual asociada al SHUa (proporcionados por el Dr. Jokiranta). Se siembran 50 ng/ pocillo de cada fragmento mutante, del fragmento "*wild type*" (SCR 19-20) y de albúmina humana como control de uniones inespecíficas en una placa de ELISA, dejándola a 4°C toda la noche. Posteriormente se añade una dilución del suero en función del título de autoanticuerpos de cada muestra y se incuba 1h a 37°C. La IgG unida se detecta usando un anticuerpo frente a la IgG humana marcado con peroxidasa.

Las mutaciones incluidas en los fragmentos fueron las siguientes: D119G, Q1139A, W1157L, R1182A, W1183L, T1184R, K1186A, K1188A, L1189R, E1198R, R1203A, R1210A y R1215Q.

3.5. Estudio de la avidéz de los anticuerpos anti-FH

La avidéz de los anticuerpos se estudió por ELISA. En este caso, se usó una dilución del suero de cada paciente, previamente determinada, en la que la unión al FH no esté en saturación. Tras incubar las muestras 1h a temperatura ambiente, se añaden distintas concentraciones de NaSCN (de 0 a 5M) y se incuba la placa 15 minutos a temperatura ambiente para disociar los complejos de FH con los autoanticuerpos. Después de lavar, los autoanticuerpos que permanecen unidos se detectan mediante un anticuerpo frente a la IgG humana.

La relación entre la cantidad de anticuerpo que permanece unida tras la elución con NaSCN 0,5M y la cantidad de anticuerpo unida en ausencia de esta sal, es el índice de avidéz, que se calculó para todas las muestras ensayadas con el fin de poder compararlas.

3.6. Detección de complejos circulantes antígeno-anticuerpo

En función del complejo a detectar, se usaron anticuerpos monoclonales anti-properdina, anti-FB o anti-FH como anticuerpos de captura. Tras incubar las muestras de suero, los complejos se detectan mediante un anticuerpo que reconoce la IgG humana marcado con peroxidasa.

4. ENSAYO DE ACTIVIDAD COFACTORA DEL FH

La actividad del FH como cofactor para la inactivación proteolítica del C3b mediada por FI, y el efecto de los anticuerpos anti-FH sobre ella, se analizaron usando proteínas purificadas. Cuatro μg de C3b, 0,8 μg de FI y 400 ng de FH fueron incubados en presencia/ausencia de IgG purificada de los pacientes (1,5 μg) durante 1 h a 37°C en tampón Tris HCl 20mM pH 7.5 NaCl 150mM. La proteólisis del C3b se evidenció por el corte de la cadena α' del C3b y la formación de los fragmentos de esta cadena, que se observan mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

5. ELECTROFORESIS

Las muestras a analizar se diluyen en tampón de carga con/sin agentes reductores (β mercaptoetanol) en función de lo que se desee visualizar. Estas muestras se aplican a geles de poliacrilamida con SDS a diferentes porcentajes (10 o 12%), según los tamaños de las proteínas a analizar. La electroforesis se lleva a cabo a 25 mA, hasta que el frente alcance el final del gel.

Tras la electroforesis, los geles se tiñen con azul Coomassie o se transfieren a una membrana para su análisis por *Western-Blot* (WB).

6. WESTERN-BLOT

Después de la electroforesis, los geles se transfieren a una membrana de PDVF (fluoruro de polivinilideno) en cámara húmeda a 250 mA. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloquea con leche en polvo desnatada al 1% diluida en PBS y, tras lavarla con PBS-T, se aplican los anticuerpos correspondientes diluidos en PBS-T. La membrana se revela con fosfatasa alcalina usando NBT/BCIP como sustrato.

7. PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINA G

La fracción de IgG de pacientes y controles sanos se purificó por cromatografía de afinidad con columnas de proteína G-Sepharosa (Amershan Biosciences) o mediante cromatografía de intercambio aniónico en columnas DEAE-Sepharcel en tampón fosfato 20mM pH 7,5, tras detectar uniones inespecíficas de algunas de las IgGs purificadas mediante proteína G en algunos ensayos de ELISA.

8. ENSAYOS HEMOLITICOS

8.1. AP-50

Para estudiar el efecto global de la fracción IgG purificada sobre la VA del complemento, diferentes concentraciones de estas IgGs (de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se incubaron con SHN durante 15 minutos a 37°C en tampón VBS-EGTA con MgCl_2 (Barbital 2,5mM, Barbiturato sódico 1,5mM, NaCl 144mM, MgCl_2 7mM, EGTA 10mM, pH 7,2-7,4), que permite la activación de la VA pero no de la VC ni de la de las lectinas. Tras esta incubación, se añadieron eritrocitos de conejo (E_R) a 1×10^7 células/ml y las muestras se incubaron de nuevo 15 minutos a 37°C. Después de este paso, la reacción se paró añadiendo a todos los tubos 1 ml de VBS-EDTA (Barbital 2,5mM, Barbiturato sódico 1,5mM, NaCl 144mM, EDTA 20mM) y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 412 nm, tras centrifugar las muestras 5 minutos a 2500 rpm. Se calculó el porcentaje de lisis de cada muestra en base a un control de 100% de lisis al que se le añade agua en lugar de VBS-EDTA.

9. ACTIVACIÓN DE LA VIA ALTERNATIVA EN FASE FLUIDA

El corte proteolítico de C3 de un SHN tras la activación de la VA se estudió mediante Western-Blot. Para ello, las IgGs purificadas se incubaron con SHN en presencia de EDTA o EGTA-Mg (VBS-EDTA o VBS-EGTA con MgSO_4 (Barbital 2,5mM, Barbiturato sódico 1,5mM, NaCl 144mM, MgSO_4 2,4mM, EGTA 10mM, pH 7,2-7,4)), a 37°C durante 1 h o a distintos tiempos. Un μl de cada una de estas muestras se cargó en un gel SDS-PAGE al 12% y posteriormente fueron transferidas a una membrana de PDVF. El C3 y sus diferentes fragmentos se visualizaron usando un anticuerpo policlonal anti-C3.

10. MUESTRAS

Las muestras de sangre procedentes de pacientes o controles sanos se mantienen a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y posteriormente se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C para la obtención de suero. El suero se alícuota y se almacena a -80°C hasta su uso.

En este estudio se han analizado muestras de una cohorte de pacientes de SHUa y de una de pacientes de glomerulonefritis, que incluye aproximadamente 90 pacientes con diagnóstico probado de C3G.

Los estudios que se realizan en las muestras de pacientes de SHUa y C3G incluyen las siguientes determinaciones, que se llevan a cabo en el laboratorio de Inmunoquímica de la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz:

- Cuantificación de inmunoglobulinas mediante nefelometría
- Cuantificación de los niveles de C3 y C4 por nefelometría
- Cuantificación de FI y FH por ELISA (descritos en el punto 1 de la sección material y Métodos)
- Detección de autoanticuerpos anti-FH por ELISA (descrito en el punto 2 de la sección Material y Métodos)
- Niveles de expresión de MCP y CD55 en linfocitos y neutrófilos por citometría de flujo
- Detección de C3NeF mediante ensayo hemolítico y/o ELISA en pacientes con C3G (Corvillo et al. 2016, Rother 1982)
- Ensayo hemolítico de regulación de la VA por el FH en los pacientes con SHUa (Sanchez-Corral et al. 2004)

Además, a todos estos pacientes se les realiza el cribado de deficiencias y formas anómalas de las proteínas FHRs mediante WB en el laboratorio del grupo de investigación del complemento del IdiPAZ (Dra. Sánchez-Corral), y el estudio genético en la Unidad U-738 del Ciberer en el CIB-CSIC (Dr. Rodríguez de Córdoba).

RESULTADOS

1. ANTICUERPOS ANTI-FH EN SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO

Se ha realizado el cribado de autoanticuerpos anti-FH en una cohorte de 367 pacientes de SHUa. Esta cohorte está formada principalmente por pacientes españoles, aunque también incluye pacientes procedentes de otros países europeos, del norte de África y de América; comprendiendo tanto pacientes adultos como pediátricos.

De los 367 pacientes estudiados, se han encontrado autoanticuerpos frente al FH en 14 de ellos, todos excepto uno con debut de la enfermedad en edad pediátrica. Además, 11 de estos pacientes son homocigotos para la deficiencia de *CFHR1*, lo que confirma la asociación entre esta deficiencia y la generación de estos autoanticuerpos.

En 10 de estos casos se obtuvieron muestras durante tiempos de seguimiento variables (tiempo medio de seguimiento: 3,7 años, desde 2 meses hasta 8 años), lo que ha permitido evaluar la variación de estos autoanticuerpos a lo largo del tiempo.

Para el estudio de las características de los autoanticuerpos anti-FH y su posible variación a lo largo del tiempo, además de la cohorte española, se han analizado muestras de 5 pacientes con anticuerpos procedentes de una serie de pacientes de SHUa de Hungría, en colaboración con el Dr. Jozsi (MTA-ELTE “Lendület” Complement Research Group, Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest).

Las características de estos pacientes se detallan en la tabla 2.

1.1. NIVELES DE FACTOR H

En términos generales los niveles de FH en los pacientes de SHUa con anticuerpos no se ven alterados, pero una parte de este FH circula formando complejos con los autoanticuerpos, lo que condiciona un defecto funcional.

La cantidad de estos complejos y de FH libre circulante puede ser estimada al cuantificar el FH presente en suero con dos anticuerpos monoclonales, uno de los cuales reconoce la misma región que los autoanticuerpos.

Tabla 2: Características de los pacientes de SHUa con autoanticuerpos anti-FH

Paciente	Edad de debut	Genotipo <i>CFHR1</i>	Tiempo de seguimiento desde el debut en meses (nº de muestras analizadas)	Título de autoanticuerpos (AU/ml)
P1	5 a	-/-	19 (1)	380
P2	4 a	-/-	63 (7)	6840-570
P3	8 a	-/-	79 (6)	2625-525
P4	7 a	-/-	2 (3)	1000-800
P5	6 a	-/-	90 (1)	1700
P6	5 a	-/-	37 (12)	1811-252
P7	8 a	-/-	24 (5)	8160-175
P8	10 a	-/-	Una muestra	3250
P9	11 a	-/-	3 (3)	851-220
P10	8 a	-/-	21 (3)	4817-653
P11	8 a	-/-	63 (2)	1539-100
P12	8 a	-/-	40 (2)	9433-421
P13	6 a	-/-	22 (3)	3718-628
P14	6 a	+/-	15 (3)	8600-2682
P15	3 a	+/+	75 (4)	3600-Negativo
P16	11 a	+/+	3 (2)	Positivo débil
P17	2 m	+/+	27 (1)	378
P18	9 a	+/+	3 (2)	353-Negativo
P19	42 a	+/+	13 (2)	224-204

De esta forma, en un estudio retrospectivo que incluía muestras de 45 pacientes de SHUa con mutaciones en el gen de FH o con anticuerpos frente a él, se comprobó que la cuantificación del FH medida con el anticuerpo monoclonal A229, dirigido frente a los SCRs C-terminales, es menor en pacientes con autoanticuerpos que en otros pacientes de SHUa y que

en controles sanos (Tabla 3 y figura 2). Las muestras analizadas se agruparon de la siguiente forma:

- Muestras de controles sanos (n=40)
- Muestras de pacientes con mutaciones en los SCRs 19-20 del FH (n=24)
- Muestras de pacientes con mutaciones en los SCRs 1-17 del FH (n=11)
- Muestras de pacientes con anticuerpos anti-FH (n=111)
- Muestras de pacientes con deficiencia completa de FI (n=13)

Tabla 3: Cuantificación de FH con los anticuerpos monoclonales A229 y Ox24. En la tabla se recogen los valores medios obtenidos con cada anticuerpo monoclonal para cada grupo en mg/dl, la diferencia entre ambas medidas y los índices de correlación intraclase (ICC) para cada grupo. n: número de muestras analizadas

Grupos (n)	<u>Ox24</u> (media±SD)	<u>A229</u> (media±SD)	<u>Ox24-A229</u> (media±SD)	<u>ICC</u>
Controles (40)	28,4±6,6	25,9±7,3	2,4±7,8	0,757
Pacientes con mutaciones en SCRs 19-20 (24)	29,7±12,2	27,8±13,1	4,9±8,1	0,619
Pacientes con mutaciones en SCRs 1-17 (11)	34,0±14,1	28,2±11,7	5,8±6,5	0,873
Pacientes con anticuerpos (111)	24,8±12,8	13,6±8,9	11,1±11,5	0,358
Pacientes con deficiencia completa de FI (13)	17,7±7,7	8,8±4,4	8,9±4,3	0,497

Para evaluar la discrepancia entre los niveles de FH medidos con los dos anticuerpos monoclonales en cada grupo, se calculó el coeficiente de correlación intraclase, ICC (Tabla 3). Este coeficiente resume las diferencias entre los valores de FH obtenidos para cada grupo con los dos anticuerpos. El grupo de pacientes con anticuerpos anti-FH y un grupo control de

pacientes con deficiencia de FI mostraron la correlación más baja entre ambas medidas. Posteriormente, para poder comparar esta variación entre los diferentes grupos, se calculó la diferencia media entre las medidas de FH obtenidas con cada anticuerpo monoclonal, es decir, el valor medio obtenido con el anticuerpo Ox24 menos el valor medio obtenido con el anticuerpo A229 en cada grupo. Cuando se comparó esta diferencia, se encontraron diferencias significativas entre los controles y los pacientes con anticuerpos ($p < 0,001$). El grupo de pacientes con deficiencia de FI no llegó a alcanzar diferencias significativas, a pesar de estar descrito que el FH circula unido a C3b, posiblemente debido al reducido número de muestras disponibles (Figura 6).

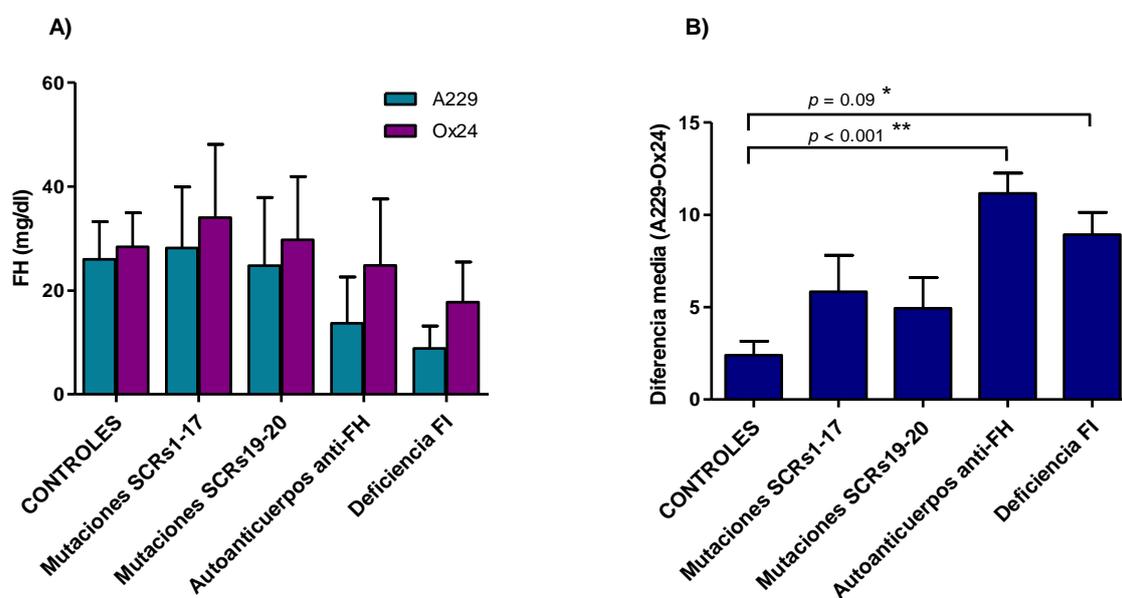


Figura 6: Valores medios de las cuantificaciones de FH con los anticuerpos Ox24 y A229, y las diferencias entre ambas. A) Niveles medios de FH obtenidos con cada anticuerpo, en mg/dl. B) Diferencia media entre las medidas de FH obtenidas con Ox24 y A229. (**) representa diferencias estadísticamente significativas; (*) $p=0,09$, no significativo.

En el caso de los pacientes con autoanticuerpos, la diferencia entre los niveles de FH obtenidos con ambos anticuerpos, fundamentalmente debidos a una reducción en el valor obtenido con el A229, es indicativo de la presencia de complejos circulantes de FH. Por tanto,

esta aproximación permite inferir la cantidad de inmunocomplejos circulantes formados por el autoanticuerpo unido al FH, con una capacidad reducida de unirse a las membranas de las células, y la cantidad de FH que circula libre en suero, que sí puede realizar sus funciones como regulador.

1.2. COMPLEJOS FH-AUTOANTICUERPOS.

Se analizó la presencia de complejos FH: anti-FH circulantes en las muestras de suero de los pacientes, usando diferentes anticuerpos monoclonales como anticuerpos de captura (Figura 7). En todas las muestras se detectaron estos complejos y en los pacientes de los que se disponían muestras durante el seguimiento, se comprobó que la cantidad de complejos circulantes variaba paralelamente a los títulos de autoanticuerpos (Figura 8).

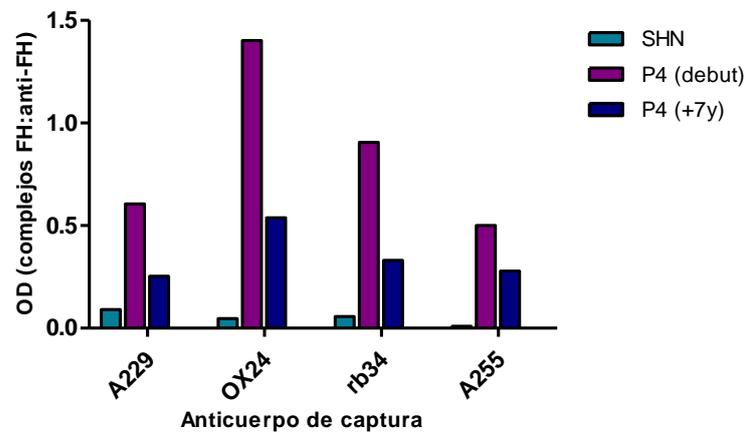


Figura 7: Complejos FH: anti-FH. Complejos circulantes de FH-autoanticuerpos detectados en dos muestras de un mismo paciente y en un SHN (negativo), usando tres anticuerpos monoclonales (A229, Ox24 y A255) y uno policlonal (rb34) anti-FH como anticuerpos de captura en un ELISA.

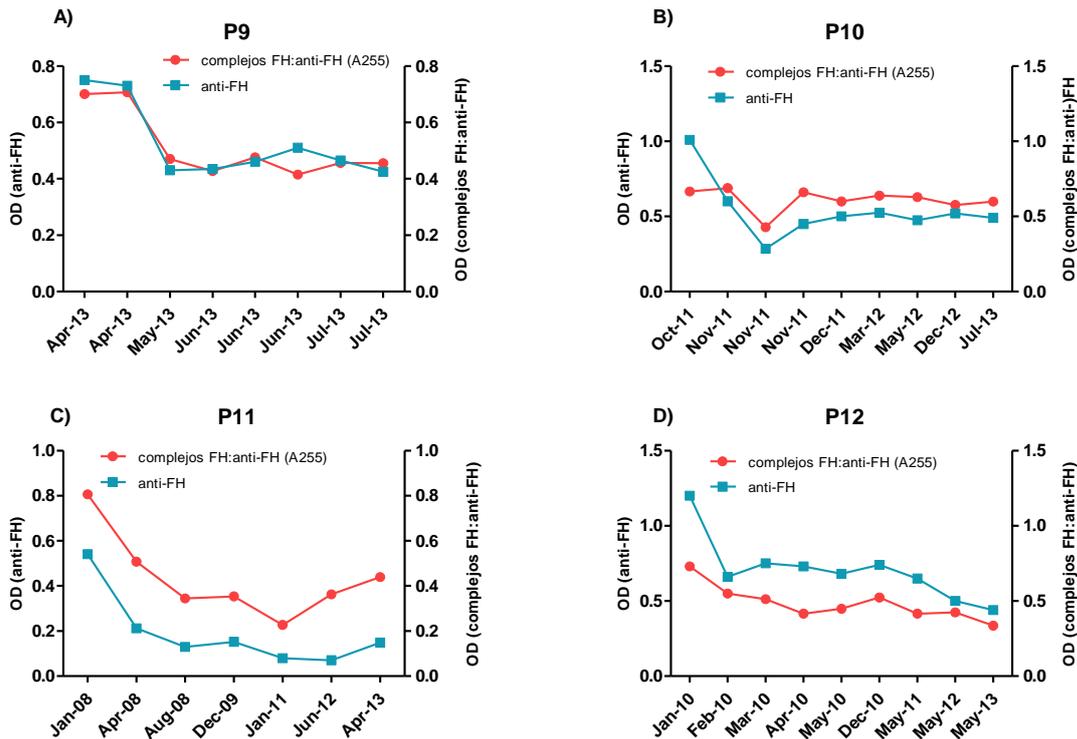


Figura 8: Evolución de los complejos circulantes FH-autoanticuerpo junto con el título de autoanticuerpos. Evolución del título de autoanticuerpos y de la cantidad de complejos circulantes a lo largo del tiempo en cuatro pacientes.

1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS AUTOANTICUERPOS ANTI-FH

Se determinó la subclase de la IgG con actividad anti-FH en los pacientes con autoanticuerpos y la cadena ligera de esa IgG. Todos los autoanticuerpos eran de isotipo IgG3, excepto en un caso que eran de isotipo IgG1, y en otro paciente en el que los anticuerpos anti-FH estaban formados por inmunoglobulina IgG1 e IgG3. En todos los pacientes se halló que estas IgG con actividad anti-FH presentaban un sólo tipo de cadena ligera, lambda o kappa, exceptuando tres de ellos en los que se encontraron ambos tipos de cadenas ligeras (Tabla 4).

En los pacientes en los que había muestras seriadas disponibles no se encontró variación ni en el isotipo de inmunoglobulina ni en la cadena ligera.

Tabla 4: Caracterización de los autoanticuerpos anti-FH en pacientes de SHUa

Paciente	Subclase de IgG	Cadena ligera
P1	IgG3	$\kappa+\lambda$
P2	IgG3	$\kappa+\lambda$
P3	IgG3	κ
P4	IgG3	λ
P5	IgG3	κ
P6	IgG3	λ
P7	IgG3	κ
P8	IgG3	κ
P9	IgG3	λ
P10	IgG3	λ
P11	IgG3	λ
P12	IgG3	λ
P13	IgG1+IgG3	$\kappa+\lambda$
P14	IgG3	λ
P15	IgG3	κ
P16	IgG3	κ
P17	IgG3	κ
P18	IgG1	κ
P19	IgG3	κ

1.4. CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO DE RECONOCIMIENTO DE LOS AUTOANTICUERPOS ANTI-FH

Mediante el uso de fragmentos recombinantes del FH se determinó la región del mismo que reconocen los autoanticuerpos de los pacientes. Los anticuerpos de todos los pacientes reconocían el fragmento que contenía los SCRs C-terminales, y también la proteína FHR-1, aunque el único paciente heterocigoto para FHR-1 lo hacía débilmente.

Además, en los pacientes con dos copias del gen *CFHR1*, se observó reactividad frente al fragmento que contenía los SCRs 1 a 4 producido en levaduras. Esta reactividad también se encontró en 7 de los pacientes con deficiencia de FHR-1, aunque en dos de ellos era débil. De estos 12 pacientes cuyos anticuerpos reconocían este fragmento recombinante producido en levaduras, algunos se pudieron reanalizar frente al mismo fragmento producido en células de insecto, y en este caso sólo dos resultaron débilmente positivos (Figura 9). Teniendo en cuenta estas discrepancias y que algunos sueros procedentes de controles también presentaban cierta reactividad únicamente frente al fragmento compuesto por los SCRs 1-4 producido en levaduras, no se pudo descartar que la unión de los anticuerpos observada en algunos pacientes sea inespecífica.

Para analizar y comparar distintas muestras de un mismo paciente o los diferentes pacientes entre ellos, se calculó el cociente entre la unión de estos autoanticuerpos a los diferentes fragmentos y al FH completo (OD obtenida con cada fragmento/ OD obtenida con FH completo). En la figura 9 aparecen representados los cocientes calculados, agrupados en función del origen de los fragmentos recombinantes y del genotipo para *CFHR1*.

A pesar de las diferencias encontradas en la unión de los anticuerpos de diferentes pacientes, al estudiar muestras seriadas de algunos de ellos no se vio variación en la especificidad de los autoanticuerpos (Figura 10 A), excepto en un caso (P6, Figura 10 B), en el que los autoanticuerpos en las muestras iniciales reconocían los SCRs 1-4 y SCRs 19-20 y posteriormente, sólo se unían al fragmento con los dos SCRs C-terminales.

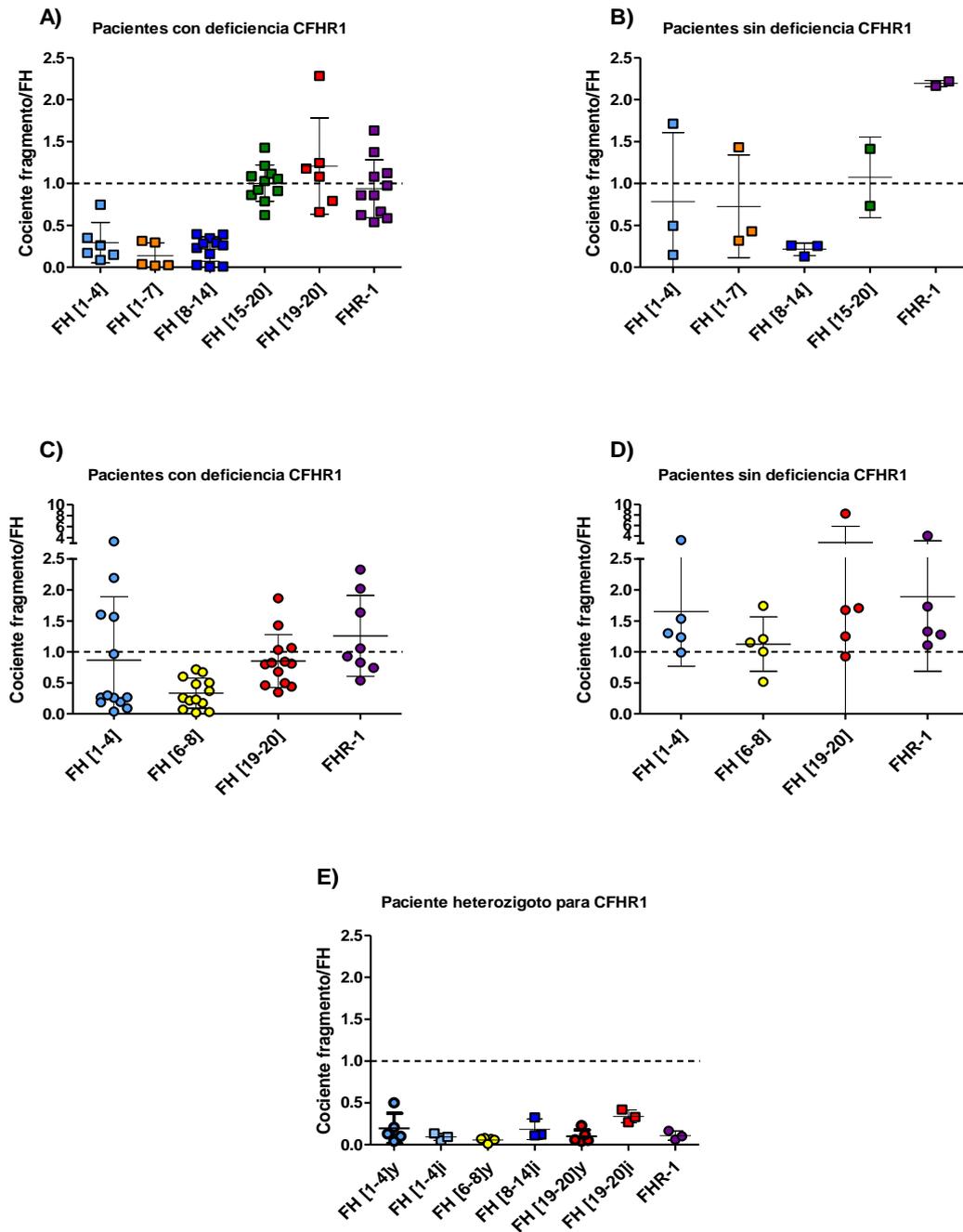


Figura 9: Unión de los autoanticuerpos a los diferentes fragmentos recombinantes del FH.

En la figura aparecen representados los cocientes entre la unión de los autoanticuerpos a cada fragmento respecto al FH completo, calculados como O.D. obtenida para el fragmento/ O.D obtenida para el FH completo, y agrupados en función del genotipo para *CFHR1* de cada paciente. A y B incluyen los pacientes analizados con los fragmentos recombinantes producidos en células de insecto; C y D incluyen los pacientes analizados con los fragmentos recombinantes producidos en levaduras. E) Cociente de unión a los diferentes fragmentos en

el único paciente heterocigoto, incluye los valores obtenidos tanto en fragmentos producidos en insectos (FH [1-4]i, FH [8-14]i, FH [19-20]i, en cuadrados) como en levaduras (FH [1-4]y, FH [6-8]y, FH [19-20]y, en círculos) .

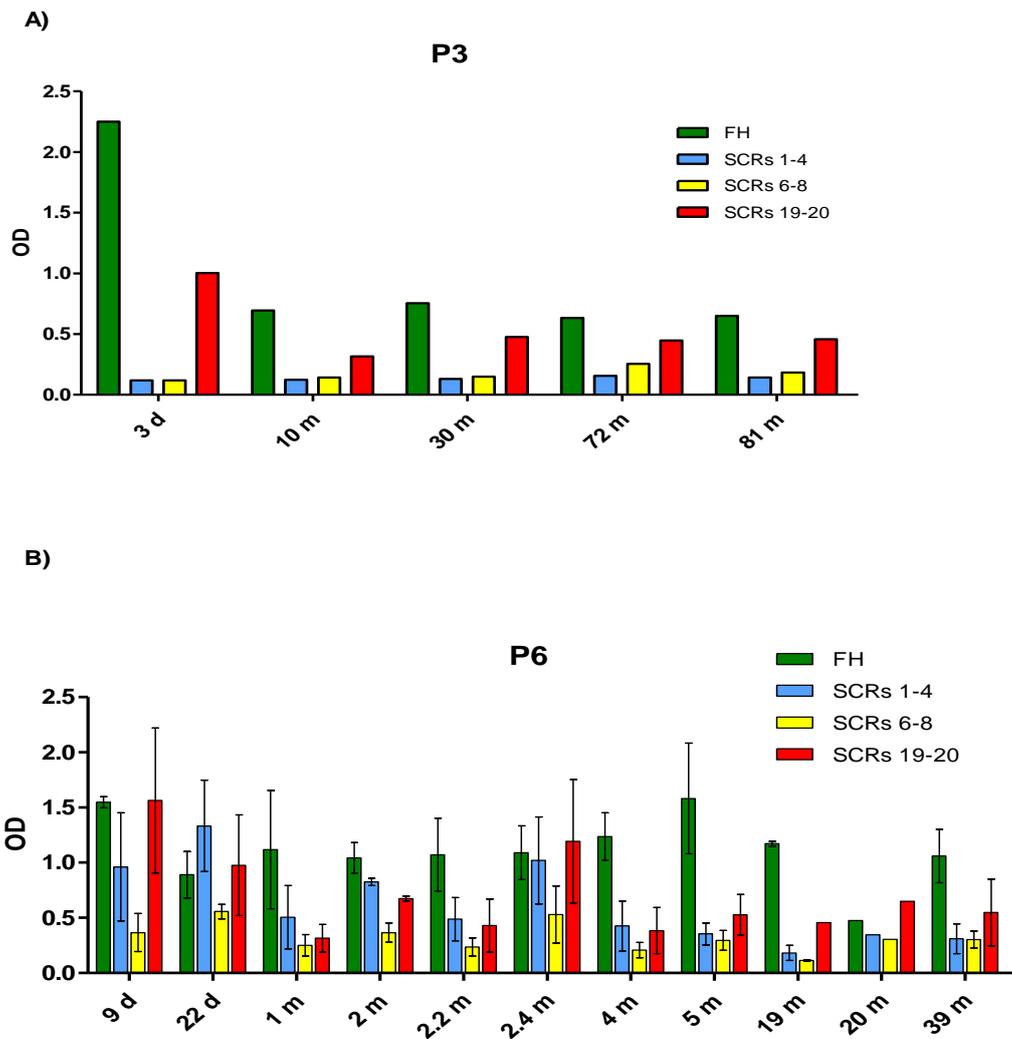


Figura 10: Evolución en el dominio de reconocimiento de los anticuerpos anti-FH. A)

Evolución en el dominio de reconocimiento de los anticuerpos anti-FH en un paciente, en el que el único cambio que se observa es la disminución del título de anticuerpos, sin variación en la región que reconocen. B) Evolución en el dominio de reconocimiento de los anticuerpos anti-FH en el único paciente en el que se observó variación respecto a la zona de unión de los autoanticuerpos a lo largo del tiempo.

1.5. INHIBICIÓN DE LA UNIÓN A FH MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para analizar los sitios de unión de los anticuerpos anti-FH de los pacientes, como una aproximación alternativa, se analizó el reconocimiento de los autoanticuerpos frente al FH en presencia de diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen distintas regiones de la proteína, en muestras de 11 pacientes (Figura 11). Estos ensayos mostraron que el anticuerpo C-18, que reconoce una región del SCR 20, inhibe la interacción de los autoanticuerpos de todos los pacientes analizados, excepto uno (P19). Además, otros anticuerpos monoclonales que reconocen también los SCRs C-terminales (A229, IXF9 y VIG8) tenían también efectos inhibitorios variables, lo que confirmaba la especificidad de los autoanticuerpos de los pacientes por estos SCRs implicados en la unión a superficies del FH. El anticuerpo monoclonal A254, que reconoce el SCR1, no inhibía la unión de los autoanticuerpos al FH.

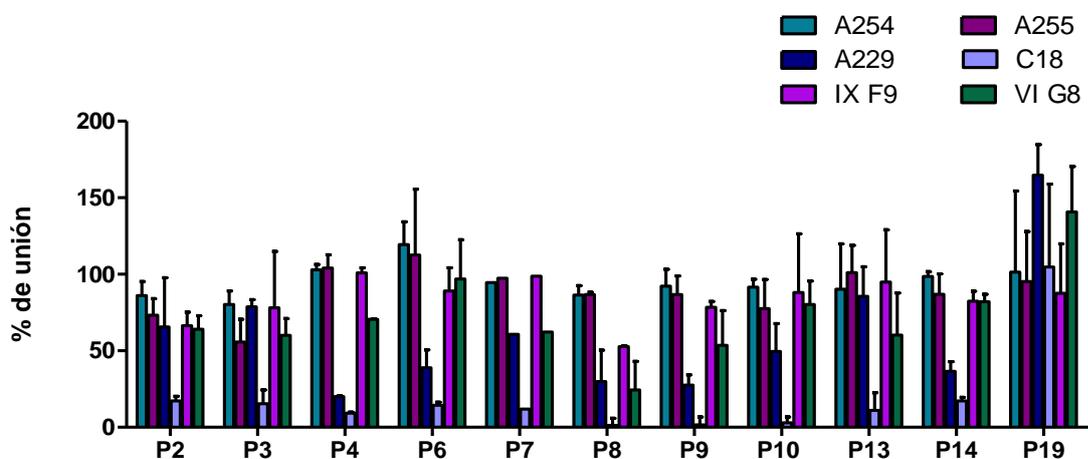


Figura 11: Inhibición de la unión de los autoanticuerpos al FH mediante anticuerpos monoclonales. La figura muestra los porcentajes de unión al FH en presencia de los distintos anticuerpos monoclonales, tomando como 100% la unión a FH en ausencia de anticuerpo monoclonal. Los datos son la media y la desviación estándar obtenidos en tres experimentos, excepto para P7, en el que sólo está representado un experimento.

1.6. DETERMINACIÓN DEL EPÍTOPO QUE RECONOCEN LOS ANTICUERPOS ANTI-FH EN EL SCR20

Para determinar con más exactitud el epítipo que reconocían los autoanticuerpos de estos pacientes, se usaron 13 constructos recombinantes de los SCR 19-20 que contenían cambios puntuales de aminoácidos. Las dos regiones del SCR 20 en las que la unión de los autoanticuerpos se veía más frecuentemente alterada eran las comprendidas entre los residuos 1183-1189 y 1210-1215 (Tabla 5). Estos residuos se encuentran frecuentemente mutados en pacientes con SHUa, indicando su relevancia en la función del FH. Esta disminución en el reconocimiento de los autoanticuerpos parece agruparse en torno a esa primera subregión en los pacientes con deficiencia de FHR-1, y en torno a la segunda en los pacientes que presentan FHR-1. Además, el epítipo que reconocen estos autoanticuerpos en torno a los residuos 1183-1189 está situado en una zona adyacente a los dos aminoácidos que diferencian el SCR 20 del FH del SCR 5 del FHR-1 y que adquiere una configuración diferente en estas proteínas tras la unión a ciertos ligandos.

Tabla 5: Mapeo del epítipo de los autoanticuerpos en los SCR 19-20 del FH. Unión de los autoanticuerpos a los diferentes SCR 19-20 recombinantes con mutaciones puntuales expresada como porcentaje respecto a la unión al fragmento SCR 19-20 “wild type”. Los datos incluyen la media obtenida de al menos tres experimentos diferentes.

Paciente	D1119G	Q1139A	W1157L	R1182A	W1183L	T1184R	K1186A	K1188A	L1189R	E1198A	R1203A	R1210A	R1215Q
P1													
P2													
P3													
P4													
P5													
P6													
P7													
P8													
P15													
P16													
P17													
P18													
P19													

>100 80-99 60-79 40-59 <40

1.7. EVOLUCIÓN DE LA AIDEZ DE LOS ANTICUERPOS ANTI-FH

Para estudiar la evolución de la avidéz de los autoanticuerpos anti-FH a lo largo del tiempo, primero se determinaron los perfiles de avidéz de cada paciente en varias muestras (porcentaje de anticuerpo que permanece unido tras la elución con diferentes concentraciones de NaSCN; figura 12) y, posteriormente, se calcularon los índices de avidéz (ratio entre los autoanticuerpos unidos tras elución con NaSCN 0,5M y sin NaSCN). En la mayoría de los casos, el índice de avidéz entre la primera y la última muestra analizada variaba menos del 10%, incluso en los tiempos de seguimiento más largos (Figura 13). También se determinó que no existía correlación entre el título de anticuerpos anti-FH y la avidéz de estos (coeficiente de correlación de Spearman $r=0,338$, $p=0,0674$; figura 13).

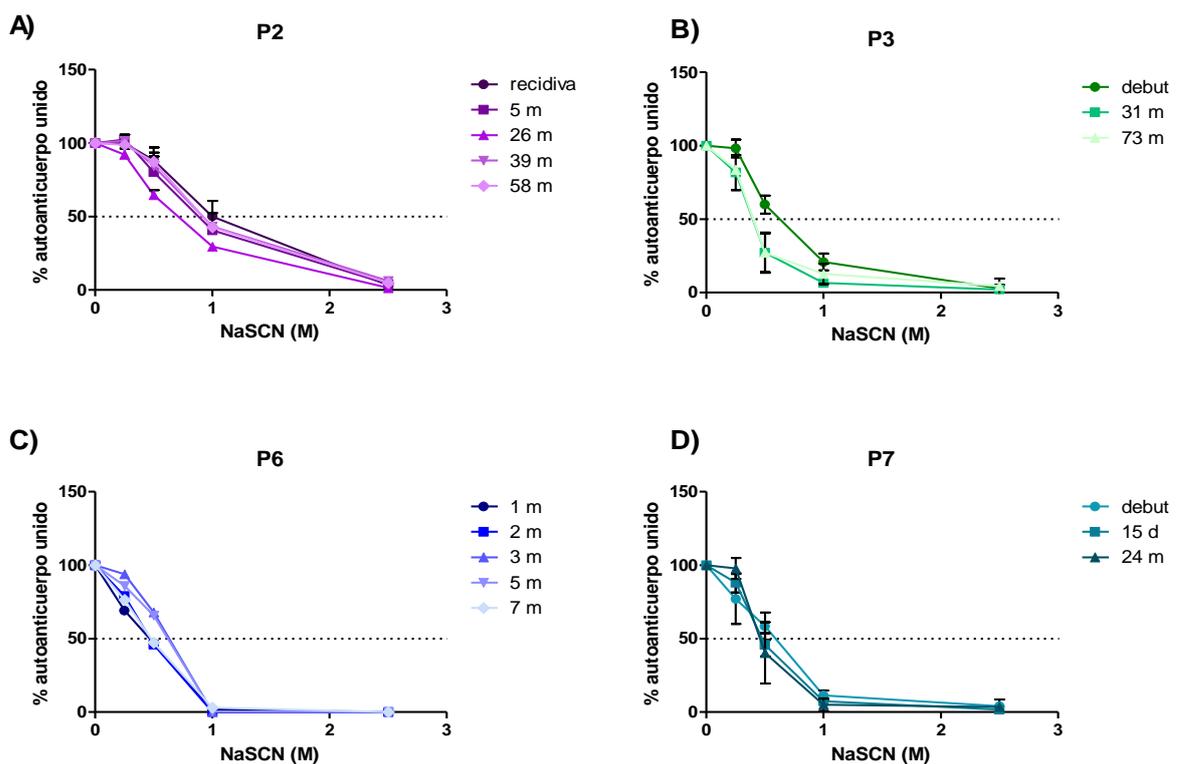


Figura 12: Perfiles de avidéz de los autoanticuerpos anti-FH. A-D muestran los perfiles de avidéz de los autoanticuerpos anti-FH en muestras seriadas de cuatro pacientes de SHUa.

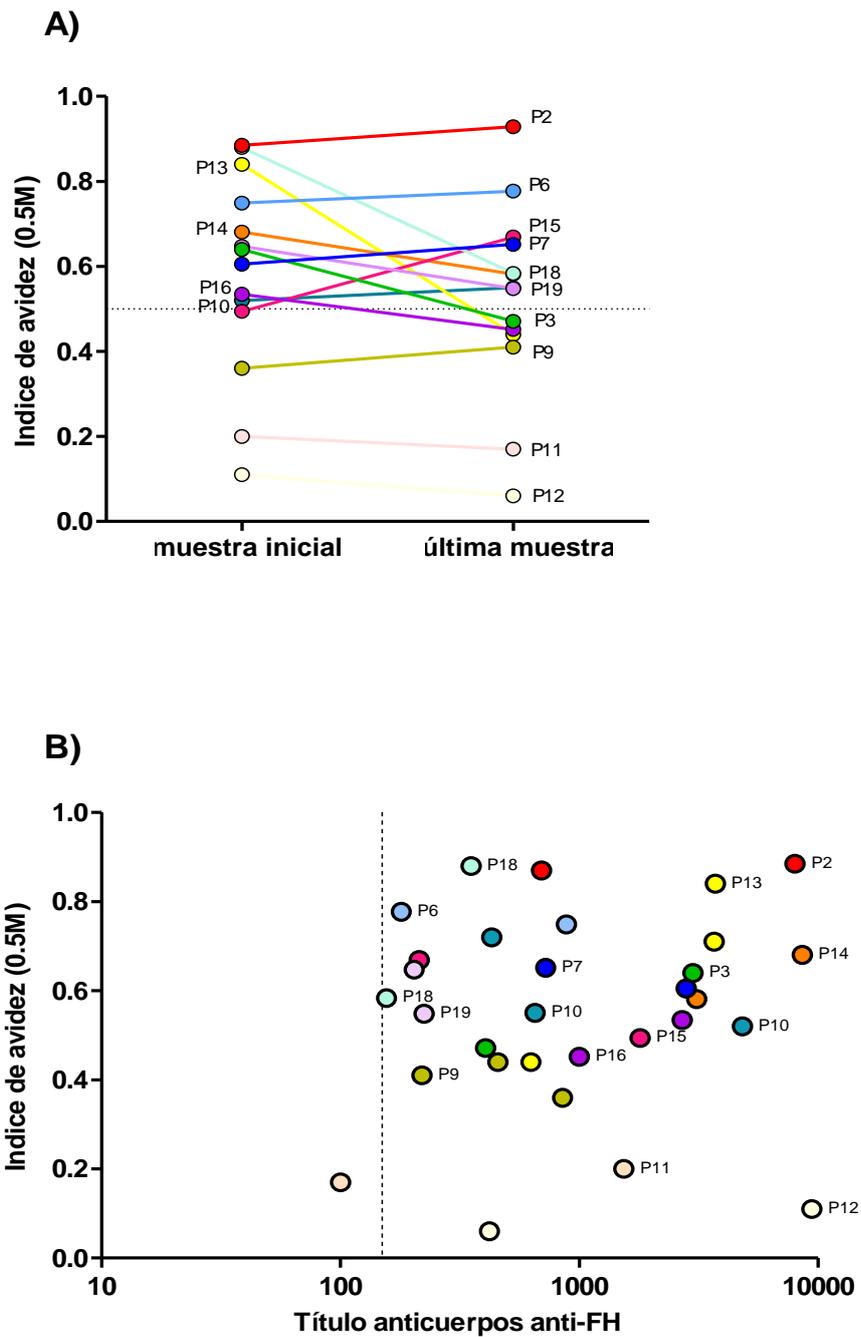


Figura 13: Variación de la avididad de los autoanticuerpos anti-FH. A) Variación en el índice de avididad entre la primera y la última muestra analizadas de cada paciente. Esta variación fue menor de un 10% en la mayoría de los pacientes. En B) se muestra la falta de correlación entre el título de autoanticuerpos anti-FH y el índice de avididad de éstos, en diferentes muestras de pacientes ($r=0,338$, $p=0,0674$).

2. ANTICUERPOS ANTI-FH EN GLOMERULOPATÍAS C3

Con una prevalencia mucho menor que en el SHUa, también existen casos descritos de pacientes con C3G y autoanticuerpos frente al FH. Por este motivo, el cribado de estos anticuerpos también se realiza en estos pacientes de forma análoga a los de SHUa.

De la serie estudiada (n=97), se han encontrado 8 pacientes con anticuerpos; llevándose a cabo un estudio funcional e involucrando a estos autoanticuerpos en la patología en uno de ellos, que se detalla a continuación.

Este caso fue la segunda descripción de un paciente con EDD asociada a autoanticuerpos anti-FH, que inhibían la función de este regulador, causando una activación sistémica de la VA y conduciendo al desarrollo de esta patología.

2.1. CASO CLÍNICO:

La paciente (GN34) era una mujer de 74 años con antecedentes de hipertensión arterial que ingresó para estudio de síndrome nefrótico con deterioro de la función renal y macrohematuria. Presentaba, además, síndrome tóxico de un año de evolución con pérdida de peso (6kg) y anemia (9gr/dl). La analítica fue compatible con un fallo renal agudo (creatinina sérica 1,8 mg/dl; urea 183 mg/dl) con niveles de proteínas totales y albúmina disminuidos y se identificó un componente monoclonal IgG-lambda. En la orina se detectó proteinuria en rango nefrótico (5,26 gr/24h) y hematuria. En un aspirado de médula ósea se contaron un 9% de células plasmáticas, y en el estudio inmunológico, las crioglobulinas y los anticuerpos antinucleares fueron negativos.

Se realizó una biopsia renal en la que se encontró una expansión mesangial con hiper celularidad y depósitos inmunes. Estos depósitos se encontraban distribuidos por todo el mesangio y en las paredes capilares con un patrón subendotelial. La tinción rojo Congo fue negativa y tampoco se detectaron cadenas ligeras mediante inmunohistoquímica. En el estudio ultraestructural se localizaron depósitos fibrilares en el mesangio y en las paredes capilares, con fibras situadas al azar y un diámetro de unos 27 nm. También se encontró un engrosamiento discontinuo e irregular de la membrana basal glomerular debido a un depósito homogéneo y electrón-denso, pero no hubo material adecuado para realizar el estudio por

inmunofluorescencia. Por los hallazgos de la biopsia la paciente fue diagnosticada de glomerulonefritis fibrilar y enfermedad por depósitos densos.

Debido a este último diagnóstico, se amplió el estudio inmunológico, encontrándose niveles normales de inmunoglobulinas y C4 pero un C3 reducido, lo que sugería una activación de la VA. La IgG-lambda monoclonal se identificó por inmunofijación, en la que se halló también IgG-kappa policlonal residual (Figura 14). Debido al perfil de complemento que presentaba la paciente, y por la frecuente asociación del autoanticuerpo C3NeF con la EDD, se llevó a cabo el ensayo para su determinación, que fue negativo. Los niveles de FH medidos por ELISA estaban disminuidos y se detectaron anticuerpos anti-FH en suero a títulos bajos.

Por todo esto, se purificó IgG de suero de la paciente mediante una cromatografía de afinidad (proteína G-Sepharosa) para caracterizar este autoanticuerpo.

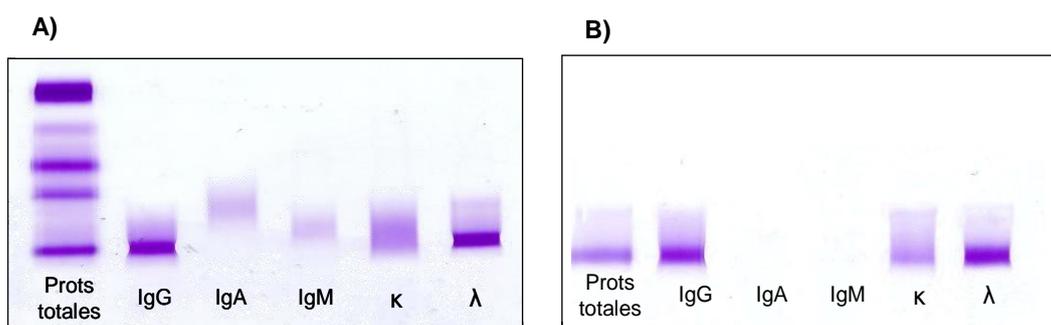


Figura 14: Inmunofijación en la paciente GN34. A) Inmunofijación de suero, en la que se observa la presencia de una paraproteína monoclonal IgG-lambda. B) Inmunofijación de la fracción IgG purificada de la misma muestra de suero que se muestra en A, en la que se observa que además de la IgG monoclonal, en la fracción purificada existe también una parte de IgG policlonal.

2.2. CARACTERIZACIÓN DEL AUTOANTICUERPO

Tras la purificación de la IgG se comprobó por ELISA que la actividad anti-FH se mantenía en la fracción purificada (Figura 15). En este caso, se observó que el título de autoanticuerpos de esta fracción aumentaba significativamente respecto al suero, sugiriendo que el componente

monoclonal era el responsable de la reactividad frente al FH. La presencia de estos autoanticuerpos, tanto en el suero como en la IgG purificada, se confirmó también mediante Western-Blot, evidenciándose además que la IgG reconocía otra proteína de unos 70 KDa, que se identificó posteriormente como plasminógeno mediante espectrofotometría de masas en el Servicio de Proteómica de la Universidad Complutense. Esta reactividad se comprobó después mediante ELISA y WB con plasminógeno purificado (Figura 16).

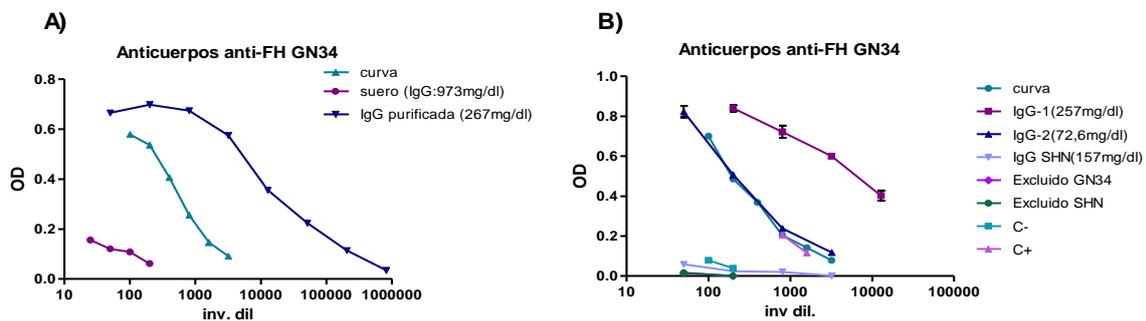


Figura 15: Detección de autoanticuerpos anti-FH. A) Anticuerpos anti-FH en la muestra inicial de suero de GN34 y en la fracción de IgG purificada de esa muestra. B) Anticuerpos anti-FH en dos fracciones IgG obtenidas a partir de dos muestras diferentes de GN34 (IgG-1, fracción IgG purificada a partir de la muestra inicial e IgG-2 , fracción IgG purificada a partir de una muestra obtenida 2 meses después), en la que se puede observar que la actividad anti-FH es exclusiva de la IgG de la paciente y no se encuentra ni en una IgG purificada a partir de suero humano normal (IgG SHN) ni en el suero sin IgG de la paciente (excluido GN34). Inv dil, inversa de la dilución de la muestra; C+, control positivo; C-, control negativo.

Mediante ELISA, usando anticuerpos específicos de cadenas ligeras, se tipificó el anticuerpo anti-FH, determinando que el reconocimiento de esta proteína estaba mediado fundamentalmente por la proteína monoclonal, aunque no era exclusivo de ésta (Figura 17).

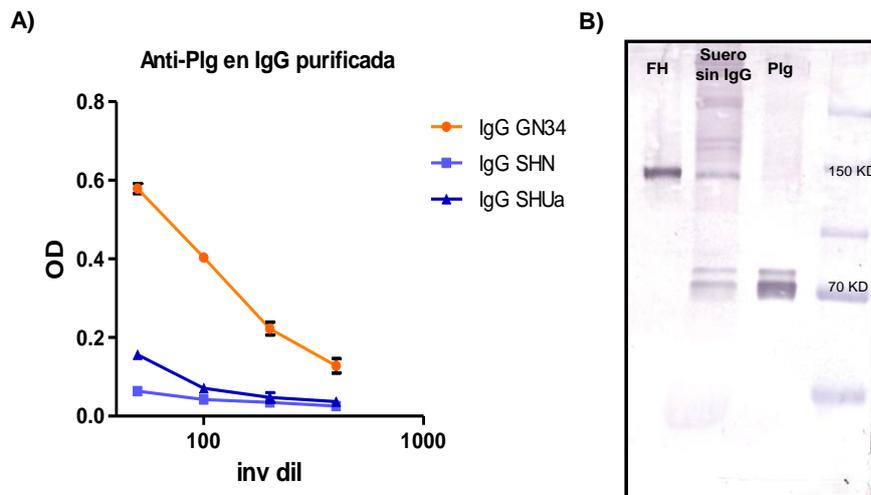


Figura 16: Detección de anticuerpos anti-Plasminógeno. A) Detección de autoanticuerpos frente al plasminógeno (Plg) en la fracción de IgG purificada de la paciente (IgG GN34), de un suero humano normal (IgG SHN) y de un paciente con SHUa y anticuerpos anti-FH (IgG SHUa) por ELISA. B) Confirmación de la presencia simultánea de autoanticuerpos frente al FH y al plasminógeno en la paciente GN34 mediante WB. Se realizó una electroforesis de FH y plasminógeno (Plg) purificados y de un suero humano agammaglobulinémico (suero sin IgG), y tras su transferencia, la membrana fue revelada con la fracción IgG purificada de GN34 como anticuerpo primario.

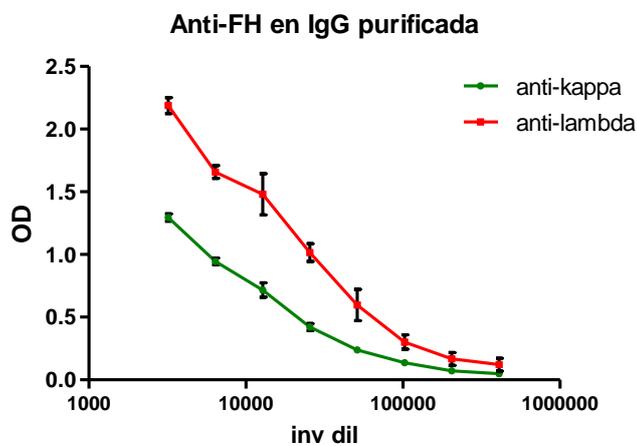


Figura 17: Tipificación de la cadena ligera del anticuerpo anti-FH en GN34 mediante ELISA. ELISA para determinar la cadena ligera del autoanticuerpo anti-FH.

2.2.1. Estudio del dominio de reconocimiento

Parte de la IgG purificada se envió al Dr. Jozsi (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knöll Institute, Jena) donde se analizó qué parte del FH era reconocida por los autoanticuerpos. Para ello, se realizó un ELISA de competición con FH pegado en la placa y preincubado con distintos anticuerpos monoclonales, que indicó que el autoanticuerpo reconocía la región de los SCRs 1-4 del FH (Figura 18). En otro ELISA con el fragmento que comprende los SCRs 15 a 20, FHR-1 y FHL-1 recombinantes, se determinó que el autoanticuerpo se unía al FHL-1, que es una forma de *splicing* alternativo del FH que contiene los 7 primeros SCRs de la proteína. Esto se comprobó también mediante WB con la fracción IgG purificada de la paciente.

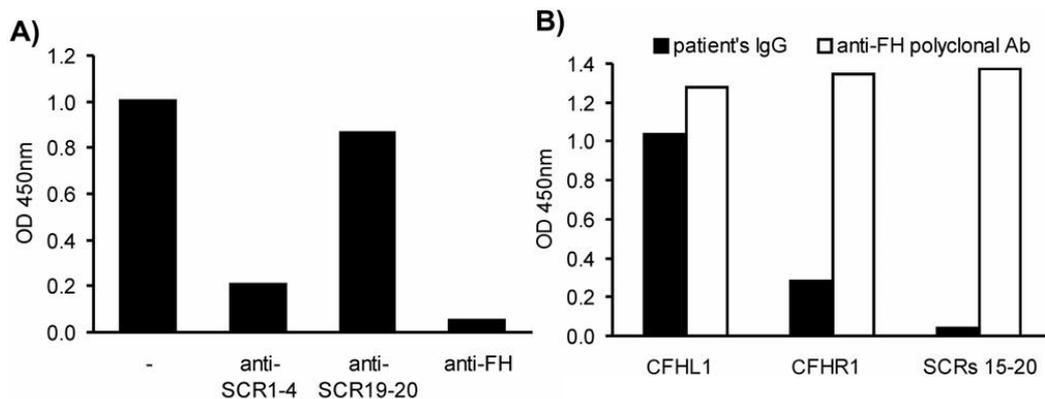


Figura 18: Identificación del dominio de reconocimiento del autoanticuerpo anti-FH. A) ELISA de competición con anticuerpos anti-FH de epítipo conocido. (-), control sólo con FH, anti-SCR1-4 y anti-SCR19-20, monoclonales frente a los SCRs 1-4 y 19-20 del FH; anti-FH, anticuerpo policlonal frente al FH. B) Unión del autoanticuerpo (patient's IgG) a proteínas recombinantes; como control se usó un anticuerpo policlonal frente al FH (anti-FH polyclonal Ab).

2.2.2. Estudios funcionales

Debido a que la región del FH con actividad reguladora está situada en los dominios N-terminales, que en este caso eran los reconocidos por el autoanticuerpo, se analizó el efecto de éste sobre la actividad cofactora del FH en fase fluida. En este ensayo se observó que en presencia de la IgG de la paciente, no se producía la degradación de la cadena α' del C3b en presencia de FI y FH (Figura 19).

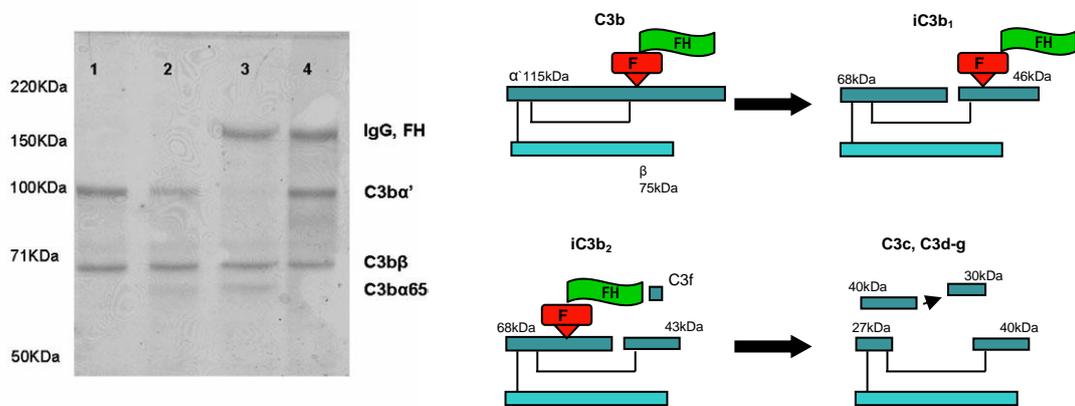


Figura 19: Bloqueo de la actividad cofactora del FH en fase fluida por el autoanticuerpo.

A) Ensayo de actividad cofactora del FH, en el que se observa como la adición de la fracción IgG de la paciente bloquea la inactivación proteolítica del C3b por el FI con el FH como cofactor. 1: C3b; 2: C3b+FI; 3: C3b+FI+FH, en el que se observa el corte de la cadena α' del C3b; 4: C3b+FI+FH+IgG de la paciente, en donde se observa que el FI es incapaz de cortar la cadena α' del C3b debido a que el FH está bloqueado por los anticuerpos de la paciente. B) Esquema de la inactivación proteolítica del C3b.

Estos ensayos permiten afirmar que la IgG con actividad anti-FH, en el caso de esta paciente mayoritariamente de carácter monoclonal, es capaz de bloquear la actividad reguladora que ejerce el FH en fase fluida, induciendo un consumo excesivo del C3 circulante, y cuyos fragmentos acaban depositados en la membrana basal glomerular.

2.2.3. Evolución

Debido a la probable asociación de la gammapatía monoclonal con la enfermedad glomerular, se empezó a tratar a la paciente con ciclofosfamida y dexametasona, consiguiendo una reducción de la proteinuria. La cantidad de IgG monoclonal también disminuyó y, junto con ella, el título de los anticuerpos anti-FH, hasta negativizarse (Figura 20). A lo largo del tratamiento, mejoró la función renal y los niveles de proteínas del complemento circulantes se normalizaron (Tabla 6).

Tabla 6: Niveles de IgG, C3 y FH en muestras sucesivas de suero de GN34

	01/04/2009	29/05/2009	30/07/2009
IgG (mg/dl)	1030	324	434
C3 (mg/dl)	54	71	92,9
FH (mg/dl)	2,69	5,51	27

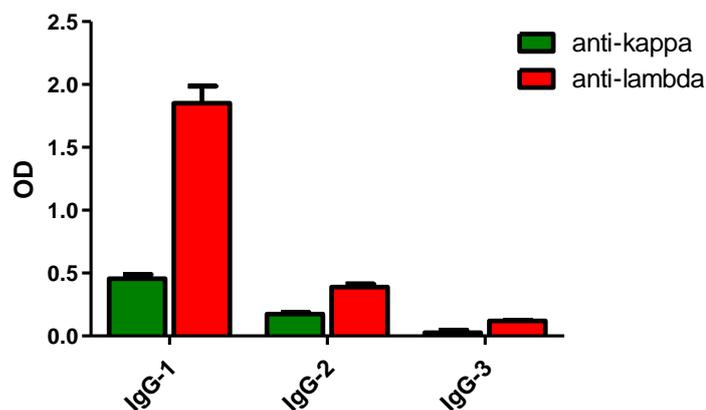


Figura 20: Evolución de los anticuerpos anti-FH en las IgGs purificadas de muestras sucesivas. IgG-1: 1/04/2009; IgG-2: 29/05/2009; IgG-3: 30/07/2009. Debido a las diferentes concentraciones de cada fracción de IgG purificada, el ELISA se realizó con diluciones preparadas a la misma concentración final de IgG para todas las muestras.

3. ANTICUERPOS ANTI-FH EN LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Debido a la descripción de autoanticuerpos anti-FH en el LES y en la artritis reumatoide (Foltyn Zadura et al. 2012), se analizó también la presencia de anticuerpos anti-FH en las muestras recogidas de la cohorte de pacientes con LES para el estudio de los anticuerpos frente a otras proteínas de la VA. En este caso, se encontraron un 3% de positivos (3/110). Este porcentaje es similar al encontrado en la serie de pacientes de SHUa globalmente (4%) y menor que en las C3G (8%). En cambio a diferencia de los pacientes de SHUa y anticuerpos anti-FH, la presencia de estos autoanticuerpos no está asociada a la delección de los genes *CFHR1-CFHR3*, ni parecen comportarse igual que en ellos en cuanto al dominio de FH que reconocen (Figura 21).

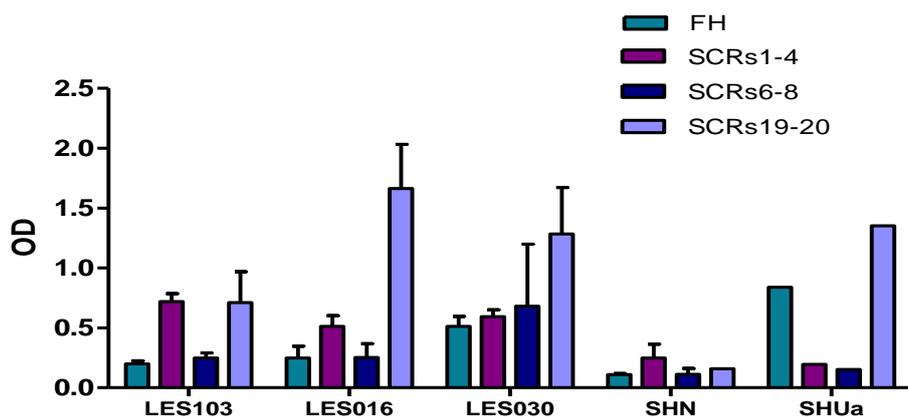


Figura 21: Dominio de reconocimiento de los autoanticuerpos anti-FH en los pacientes con LES. ELISA de unión a fragmentos recombinantes del FH de las muestras de los tres pacientes con anticuerpos anti-FH encontrados, de un suero humano normal (SHN) y de un paciente de SHUa con deficiencia de FHR-1 (SHUa).

4. OTROS AUTOANTICUERPOS.

Además de los ya conocidos autoanticuerpos anti-FH en el SHUa y el C3NeF en la EDD, en los últimos años han aparecido casos y pequeñas series de pacientes en los que se han encontrado autoanticuerpos frente a componentes de la vía alternativa que provocan su desregulación. Por esto, se han analizado muestras de las series de pacientes de SHUa y glomerulonefritis disponibles en el laboratorio.

Además, se ha incluido en este estudio una cohorte de pacientes con LES. El LES es una patología compleja, con un claro componente autoinmune, en la que el sistema del complemento juega un papel importante, tanto en su establecimiento como en su desarrollo y en la que se ha descrito la aparición de anticuerpos anti-FH (Foltyn Zadura et al. 2012). Por todo esto, y porque es una enfermedad mucho más prevalente que el SHUa y la C3G, se ha incluido esta cohorte de pacientes en el estudio de autoanticuerpos, con el fin de buscar mecanismos patogénicos que pudieran ser comunes a este subgrupo de patologías renales con autoanticuerpos frente a proteínas de la VA del complemento.

Se ha realizado el cribado de la presencia de anticuerpos frente al FI, FB, C3 y properdina en muestras procedentes de 92 pacientes de SHUa, de 97 pacientes con diversos tipos de glomerulonefritis (GNs), 59 de ellos con C3G probada y de 110 pacientes de LES. En la tabla 7 aparecen recogidos los datos de la prevalencia de estos autoanticuerpos en las series de pacientes analizadas.

Tabla 7: Frecuencia de aparición de los autoanticuerpos frente a Factor I, Factor B, Properdina y C3 en las series de pacientes analizadas.

		Anti-FI	Anti-FB	Anti-Prop	Anti-C3
SHUa (n=92)		7%	10,8%	11,9%	13%
GNs (n=97)	Todas (n=97)	25,7%	34%	27,8%	19%
	C3G (n=59)	20%	25%	20%	17%
LES (n=110)		25%	25%	18%	19%

Como se puede observar en la tabla 7, la frecuencia de aparición de autoanticuerpos frente a las distintas proteínas de la VA es similar en pacientes de C3G y LES y menor en los pacientes de SHUa. Además, en estos últimos pacientes, la mayoría de los que presentan alguno de estos autoanticuerpos han tenido un debut de la enfermedad en la edad adulta.

Tras el despistaje de estos autoanticuerpos, se seleccionaron algunos pacientes con niveles bajos de C3, títulos elevados de autoanticuerpos y/o especificidad para sólo una de las proteínas testadas, para realizar en ellos ensayos funcionales.

4.1. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS DE LA VÍA ALTERNATIVA

4.1.1. Caso clínico

En 1997, la paciente (GN19), una mujer de 20 años de edad con LES, acudió al hospital debido a una insuficiencia renal y síndrome nefrótico. Al ingreso presentaba edema de miembros inferiores y presión arterial elevada, pero ninguna manifestación articular ni cutánea. Los análisis realizados mostraron una creatinina sérica de 1,9 mg/dl, con una albúmina sérica de 2,2 g/dl y una proteinuria de 4,7 g/24h con hematuria. Los niveles de C3 y C4 estaban bajos (12,2 y 5,9 mg/dl, respectivamente), en concordancia con un episodio activo de su enfermedad de base. Los anticuerpos anti-nucleares (ANAs) y anti-DNA fueron positivos. También se analizaron otros autoanticuerpos, incluyendo anti-GBM y C3NeF, y todos resultaron negativos. Se efectuó una biopsia renal que mostró una afectación glomerular difusa, con marcado incremento de la celularidad endocapilar y un infiltrado inflamatorio agudo. Se observaron gruesos depósitos subendoteliales y trombos intracapilares. En la inmunofluorescencia indirecta se observaron depósitos granulares e irregulares con anti-IgA (++) , IgG (+++) , IgM (+) , C3 (+++) , C1q (+++) y cadenas ligeras kappa y lambda (++) , diagnosticándose por tanto una nefropatía lúpica.

Fue tratada con esteroides intravenosos y prednisona oral en pauta descendente, y con ciclofosfamida durante un año, ajustando las dosis en función del número de leucocitos. La función renal mejoró progresivamente y un año después de su hospitalización, la paciente estaba en remisión completa y el tratamiento fue suspendido. Se mantuvo en remisión

completa, tanto clínica como analíticamente durante 5 años, a excepción de los niveles circulantes de C3, que siempre estaban por debajo de la normalidad con un C4 normal. En 2003, fue nuevamente hospitalizada por una insuficiencia renal con síndrome nefrótico, alcanzando una proteinuria de 5,9 g/24h y con datos de actividad de su enfermedad de base: niveles bajos de C3 y C4 (10,3 y 1,8 mg/dl), anticuerpos antinucleares y anti-DNA positivos. Se realizó una nueva biopsia renal, con hallazgos similares a la anterior, aunque con mayor grado de cronicidad.

Fue tratada de forma análoga al episodio inicial, con una rápida remisión de la nefropatía, pero manteniendo siempre los niveles bajos de C3. Por ello, se realizó un estudio familiar midiendo los niveles de circulantes de C3 en su madre y su hermano, encontrando niveles reducidos en la madre (entre 58 y 70 mg/dl) pero normales en su hermano.

Posteriormente, la paciente fue estudiada para determinar las posibles alteraciones en la VA del complemento, tanto genéticas como adquiridas, que pudieran justificar los niveles persistentemente reducidos de C3. El estudio genético determinó que tanto la paciente como su madre eran portadoras de una mutación en heterocigosis en el gen de C3 (c.131_146del; p.Leu44Argfs*19). Esta mutación genera un codón de stop prematuro y posiblemente genere una proteína trunca no funcional. Además de la mutación, al analizar muestras de suero retrospectivamente, se encontraron autoanticuerpos frente a diversas proteínas de la VA. Inicialmente, la paciente presentaba anticuerpos anti-C3, anti-Properdina, anti-FB y anti-FI. El título de estos autoanticuerpos ha ido variando a lo largo del tiempo, aumentando desde la primera hospitalización y llegando a ser negativos durante un corto periodo de tiempo tras el segundo ingreso, probablemente como resultado de los niveles bajos de IgG por la proteinuria y el tratamiento que recibió. Posteriormente se han mantenido los anticuerpos frente a properdina y FB a títulos altos, apareciendo después los anticuerpos frente al FI y el C3, e incluso autoanticuerpos anti-FH (Figura 22).

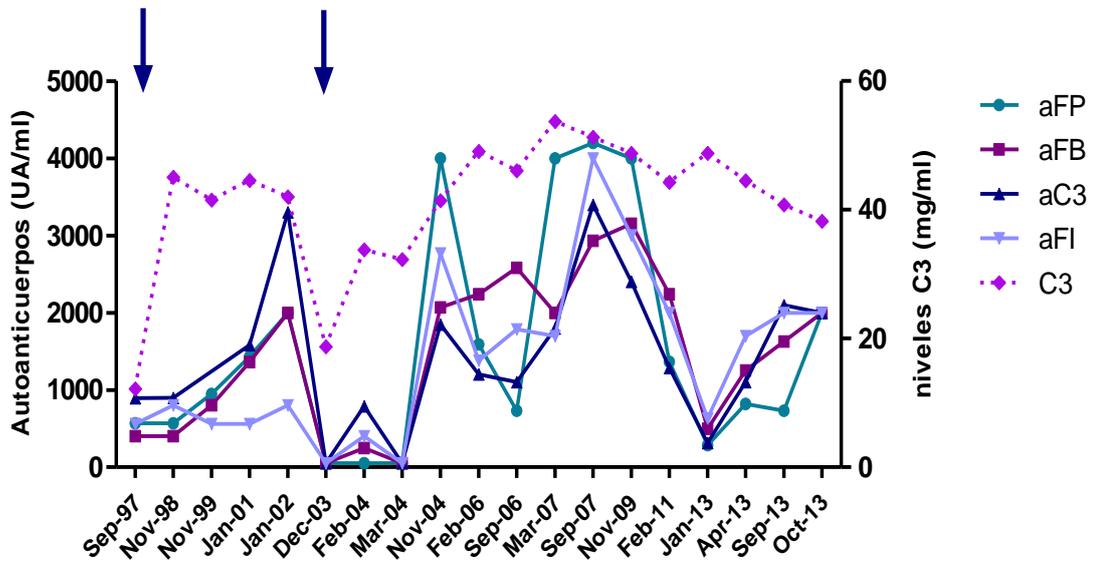


Figura 22: Evolución de los anticuerpos anti-Propertina, anti-FB, anti-FH, anti-C3 y de los niveles de C3 en la paciente GN19 a lo largo de 16 años. Las flechas verticales indican las dos hospitalizaciones de la paciente por insuficiencia renal y síndrome nefrótico.

4.1.2. Ensayos funcionales

Debido a que los niveles de C3 que presentaba la paciente eran siempre menores que en su madre, a pesar de ser portadoras de la misma mutación, y que sólo la paciente presentaba autoanticuerpos frente a estas proteínas de la VA, se intentó determinar si estos anticuerpos dirigidos frente a proteínas que son componentes o reguladoras de la convertasa tenían alguna repercusión sobre el complemento circulante.

Inicialmente, y por el elevado título de los anticuerpos anti-Propertina y anti-FB en casi todas las muestras analizadas, se determinó la existencia de complejos circulantes de IgG con sus respectivas proteínas diana, complejos que no se encontraron en sueros procedentes de controles sanos (Figura 23).

Para analizar el efecto de los autoanticuerpos sobre la VA, primero se purificó la fracción IgG de suero de la paciente mediante una cromatografía de intercambio aniónico en columnas DEAE-Sephadex.

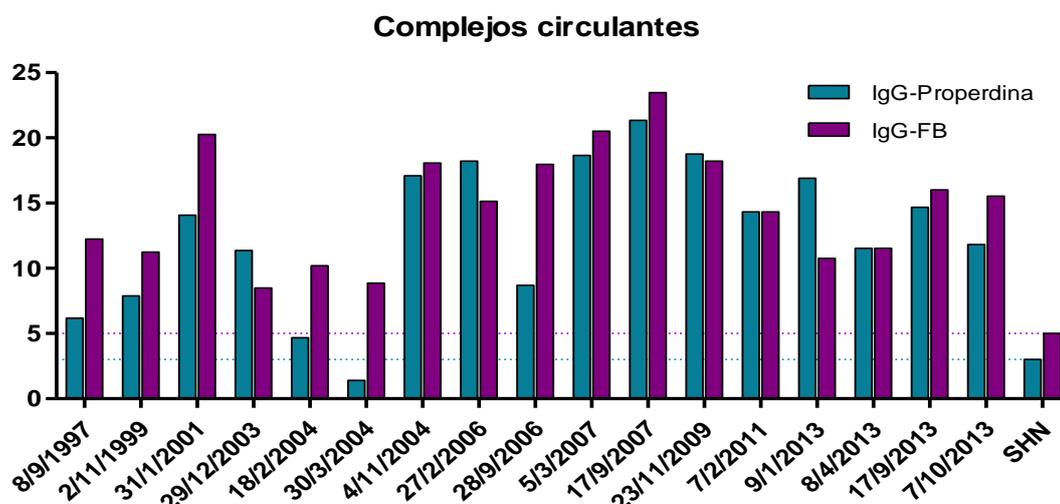


Figura 23: Complejos circulantes de IgG-Propertina e IgG-FB de la paciente GN19 a lo largo del tiempo. Se asignaron valores arbitrarios en relación a la OD media obtenida de 15 controles sanos, a la que se le asignó el valor 1, considerando positivos aquellos valores por encima de la media más dos desviaciones estándar de los controles (líneas punteadas).

El efecto de la fracción IgG purificada sobre la actividad del complemento se analizó en un ensayo hemolítico específico de la VA, sobre eritrocitos de conejo (Figura 24). En estos ensayos se observó que al preincubar la fracción IgG de la paciente con suero procedente de controles sanos (SHN), la lisis de los eritrocitos se reducía en función de la cantidad de IgG añadida y que esta lisis se restauraba hasta sus niveles basales al añadir más SHN junto con los eritrocitos.

Se llevaron a cabo ensayos funcionales en fase fluida, análogos a los diseñados con eritrocitos. En ellos se comprobó que la disminución en la lisis se correlacionaba con una disminución en los niveles de C3 en un SHN, inducido por la IgG de la paciente, analizando el procesamiento proteolítico de C3 mediante WB.

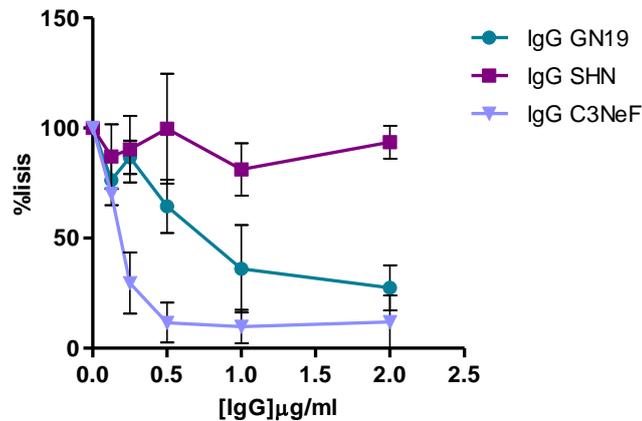


Figura 24: Efecto de la IgG de la paciente GN19 sobre la actividad total del complemento en un ensayo hemolítico. Las IgGs purificadas (desde 2 µg/µl a 0,125 µg/µl) se preincubaron con suero humano normal en un tampón que permite la activación de la VA. Posteriormente, se añadieron los eritrocitos de conejo, y tras incubar nuevamente y centrifugar, se midió la absorbancia de los sobrenadantes y se calculó el porcentaje de lisis. IgG GN19, IgG purificada de la paciente; IgG SHN, IgG purificada de SHN; IgG C3NeF, IgG purificada de suero de un paciente con C3NeF, usada como control positivo para la activación de la VA.

Un ejemplo de este procesamiento se muestra en la figura 25, en la que se observa la disminución de intensidad de la banda correspondiente a la cadena α' del C3, en algunos casos hasta su completa desaparición; y la aparición de las bandas que corresponden a los fragmentos C3 $\beta\alpha$ y α' . La variación media de la intensidad de estas bandas en el tampón que permite la activación de la VA (EGTA-MgSO₄) respecto al tampón en el que no hay activación del complemento (EDTA) se calculó en seis experimentos para esta paciente, normalizando con la intensidad de la cadena β (invariable) en cada muestra, y aparece representada en la figura 25 (B).

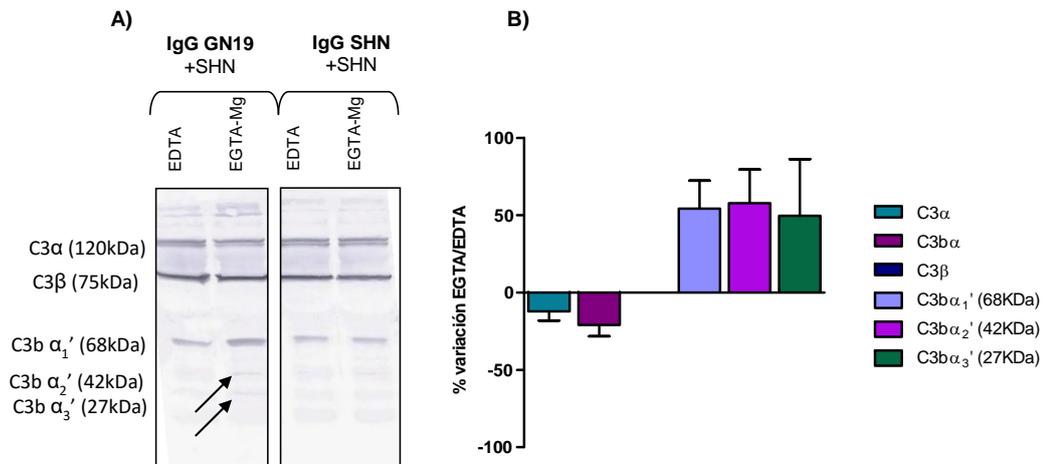


Figura 25: Activación de la vía alternativa en fase fluida inducida por la fracción IgG purificada de GN19. A) Procesamiento proteolítico de C3 visualizado por WB. B) Análisis cuantitativo del corte de C3. La intensidad de las bandas de las cadenas de C3 se cuantificó por densitometría, y se normalizaron usando la intensidad de la cadena β como control de carga, ya que ésta no varía. Posteriormente se calculó el porcentaje de variación que experimentaba cada banda entre la muestra incubada en tampón con EDTA y la muestra incubada con EGTA-Mg, considerando las muestras con EDTA como 100%. La gráfica muestra la variación media calculada para 6 experimentos.

DISCUSIÓN

1. AUTOANTICUERPOS ANTI-FACTOR H

El sistema del complemento es un efector de la respuesta inmune muy potente que debe ser correctamente regulado. Una activación no controlada, por un exceso, por ocurrir en un lugar erróneo (superficies endógenas) o por una incorrecta regulación, puede provocar diversas enfermedades (Ricklin et al. 2010, Ricklin, Lambris 2013). Este es el caso del SHUa y la C3G, en las que es frecuente encontrar mutaciones y/o polimorfismos en proteínas de la VA, o de forma más ocasional, autoanticuerpos que reconocen alguno de sus componentes y que pueden alterar su correcto funcionamiento (Dragon-Durey et al. 2013, Jozsi et al. 2014). Los autoanticuerpos más estudiados son el C3NeF, que reconoce y estabiliza a la convertasa de C3, asociado frecuentemente a la EDD, y los autoanticuerpos anti-FH, que pueden aparecer en el SHUa y en algunas glomerulonefritis (Skerka et al. 2009).

Los anticuerpos anti-FH asociados al SHUa se describieron por primera vez en el año 2005 (Dragon-Durey et al. 2005), y se estima que están presentes aproximadamente en un 10% de los pacientes pediátricos en las series europeas y de forma ocasional en pacientes con debut en la edad adulta (Dragon-Durey et al. 2010). Estos autoanticuerpos producen una deficiencia funcional de FH al circular formando inmunocomplejos con él y bloqueándolo. Inicialmente, se determinó que estos autoanticuerpos reconocían la región C-terminal de la molécula, implicada en el reconocimiento y unión a las superficies de las células (Jozsi et al. 2007, Strobel et al. 2010a). Posteriormente se ha comprobado que, especialmente en la fase aguda, estos anticuerpos también son capaces de bloquear la actividad del FH como cofactor del FI y la aceleración de la disociación de las convertasas de la VA (Blanc et al. 2012).

En la mayoría de los casos, la aparición de estos autoanticuerpos está asociada a la delección de los genes *CFHR1* y *CFHR3* (Abarrategui-Garrido et al. 2009, Dragon-Durey et al. 2009), aunque parece que, aunque éste sea el defecto genético más frecuente, es la ausencia de FHR-1 la que se relaciona con la aparición de los autoanticuerpos (Hofer et al. 2013, Moore et al. 2010)(Hofer et al. 2013, Moore et al. 2010). En este contexto, se ha comprobado que la mayoría de los autoanticuerpos anti-FH reconocen y bloquean el extremo C-terminal de la molécula de FH y que además también se unen a FHR-1, debido a la alta homología que presentan sus SCRs terminales con los SCRs 19 y 20 del FH (Moore et al. 2010, Strobel et al. 2011).

A pesar de los numerosos estudios que se han llevado a cabo respecto a los autoanticuerpos anti-FH en el SHUa, se sabe poco de su evolución a lo largo de la enfermedad en cada paciente y si esto se relaciona de algún modo con el curso de la enfermedad. Debido a esto, se analizaron distintas características de estos anticuerpos, como el isotipo de IgG, el dominio de reconocimiento o la avidéz, en muestras de pacientes de SHUa de las cohortes española y húngara obtenidas a lo largo del tiempo, para determinar si las características moleculares de estos autoanticuerpos varían en cada paciente de forma individual y si existen diferencias entre pacientes.

De los 19 pacientes con autoanticuerpos analizados, todos excepto uno debutaron en la infancia, lo que corresponde aproximadamente al 10% de los casos pediátricos de la serie española, de acuerdo con otras cohortes de pacientes europeas.

La subclase de IgG más frecuente de los autoanticuerpos anti-FH fue la IgG3 (18/19). De ellos, un paciente además de IgG3 presentaba IgG1, y los autoanticuerpos de otro de los pacientes eran únicamente de tipo IgG1. Aunque las características de las distintas subclases de IgG sean diferentes y podrían determinar de alguna forma el curso de la enfermedad por su vida media, capacidad de unirse a receptores Fc, etc, no es de esperar que presenten grandes diferencias en su capacidad de bloquear al FH, su principal efecto patogénico. En cuanto a las cadenas ligeras de estas inmunoglobulinas, exceptuando tres pacientes en los que se encontraron cadenas kappa y lambda de forma simultánea, el resto presentaban únicamente una de las dos y ésta no variaba en ninguno de ellos. Esto sugiere oligoclonalidad de la respuesta de generación de los autoanticuerpos.

Los autoanticuerpos anti-FH en los pacientes de SHUa son capaces de formar inmunocomplejos que pueden ser detectados en suero. La cantidad de estos complejos se correlaciona mejor con la clínica que el título total de autoanticuerpos (Blanc et al. 2012), debido a que el FH que circula unido a los autoanticuerpos en forma de inmunocomplejos está funcionalmente “secuestrado”. La cuantificación de los niveles de FH usando dos anticuerpos monoclonales dirigidos frente a ambos extremos de la proteína (A229 y Ox24) es un sistema que permite no sólo determinar los niveles de FH, si no también estimar cuánto de este FH circula libre en suero y es capaz de regular la VA. En el caso de los pacientes de SHUa con anticuerpos anti-FH, la diferencia que se obtiene entre ambas medidas es significativamente mayor que la obtenida en controles sanos y en pacientes con mutaciones en *CFH*, y esta

diferencia es reflejo de la cantidad de inmunocomplejos que circulan en plasma. En algunos casos, se ha observado que la medida de FH obtenida con el anticuerpo monoclonal dirigido frente a los SCRs C-terminales, equivalente al FH libre, capaz de unirse a las membranas de las células y regular las convertasas formadas en ellas, es prácticamente indetectable, mientras que el valor obtenido con el anticuerpo que reconoce los primeros SCRs puede encontrarse dentro del rango normal, indicando que los autoanticuerpos pueden bloquear casi por completo la capacidad del FH de unirse a las células pero no su acción en fase fluida, poniendo de manifiesto el problema de desregulación en las superficies que existe en el SHUa (Nozal et al. 2014).

En la mayoría de los casos estudiados, la tasa de complejos FH:anti-FH circulantes disminuía en las muestras obtenidas en periodos de remisión respecto a las obtenidas en los episodios activos de la enfermedad. Al analizar muestras seriadas de los pacientes, se comprobó que la cantidad de complejos FH:anti-FH variaba paralelamente al título de autoanticuerpos. En un análisis más detallado de los perfiles de avidéz y del índice de avidéz de las diferentes muestras, se comprobó que, aunque existía heterogeneidad entre los pacientes, la avidéz de los autoanticuerpos a lo largo del tiempo no experimentaba variaciones significativas en un mismo paciente. Sólo se observó una disminución de un 20% aproximadamente en el índice de avidéz entre la primera y la última muestra estudiada en dos pacientes y un incremento en uno, independientemente del genotipo para *CFHR1*.

Al estudiar el epítipo que reconocían los autoanticuerpos dentro del FH, se encontró que prácticamente la mayoría de los autoanticuerpos reconocían el extremo C-terminal del FH y la molécula FHR-1, y en algunos casos se observó además unión a la región N-terminal, especialmente cuando se usó el constructo recombinante producido en levaduras. Muestras de 7 de los 12 pacientes que presentaban reactividad frente al fragmento recombinante SCR 1-4 producido en levaduras pudieron ser reanalizadas frente al mismo fragmento producido en células de insecto, y en este caso la positividad sólo se mantuvo en dos. Debido a esto y a que la unión de los autoanticuerpos no se veía afectada por los anticuerpos monoclonales que van dirigidos a los primeros SCRs del FH, no se puede afirmar que esta reactividad sea totalmente específica.

A pesar de la heterogeneidad observada en la unión a los distintos fragmentos, en términos generales, los pacientes se podían agrupar en función de su genotipo para *CFHR-1*. Los autoanticuerpos de los pacientes con deficiencia de FHR-1 reconocían fundamentalmente los fragmentos que contenían los SCRs 19-20 y en algún paciente, de forma excepcional, el

fragmento N-terminal. En el caso de los pacientes sin esta deficiencia, sus autoanticuerpos además de reconocer los SCRs 19-20, se unían a otras zonas a lo largo de la molécula. Sólo se observaron cambios en el dominio de reconocimiento de los autoanticuerpos anti-FH en un paciente, en el que las muestras próximas al episodio inicial de SHU reconocían los SCRs 1-4 y 19-20, y a lo largo del seguimiento durante más de 3 años, la reactividad frente al fragmento N-terminal iba desapareciendo.

Recientemente se ha delimitado con más precisión el epítipo que reconocen los autoanticuerpos usando fragmentos recombinantes de los SCRs 19-20 conteniendo mutaciones puntuales (Bhattacharjee et al. 2015). En este trabajo se ha encontrado que en los pacientes con deficiencia de FHR-1, los anticuerpos anti-FH reconocen una región que adquiere una configuración diferente en FH y FHR-1 tras la unión a ciertos ligandos, incluyendo diversas proteínas bacterianas, lo que ha permitido sugerir un modelo en el que la ausencia de FHR-1 juega un papel en la pérdida de la tolerancia al FH y en la generación de autoanticuerpos frente a él, explicando así la frecuente asociación entre la presencia de los anticuerpos anti-FH y la delección *CFHR1-CFHR3* en el SHUa.

En los experimentos realizados con los mismos fragmentos recombinantes que contienen las mutaciones en nuestra serie de pacientes, se han obtenido resultados concordantes con los del grupo de Bhattacharjee, al menos en los pacientes con deficiencia de FHR-1, lo que apoya el modelo propuesto para la generación de los autoanticuerpos en estos pacientes. Aun así, el mecanismo de aparición de estos autoanticuerpos en los pacientes con SHUa sin deficiencia de FHR-1 está aún por determinar.

Con el análisis de los autoanticuerpos en muestras seriadas obtenidas durante el seguimiento en algunos de estos pacientes, se ha evidenciado que, aunque existe heterogeneidad entre los pacientes, las características de sus autoanticuerpos permanecen constantes a lo largo del tiempo, con la excepción de los títulos totales que, en general, disminuyen con el tiempo. Todos estos resultados sugieren una respuesta oligoclonal y restringida durante la generación de los autoanticuerpos anti-FH asociados al SHUa (Nozal et al. 2016).

A pesar de que los autoanticuerpos anti-FH asociados a C3G fueron descritos con bastante anterioridad que en el SHUa (Meri et al. 1992), parecen ser mucho menos frecuentes y existen menos estudios sobre ellos. El primer caso, descrito en 1992, era un “minianticuerpo” formado

por dímeros de cadenas lambda monoclonales, que reconocía el SCR 3 del FH, bloqueando su capacidad de unirse al C3b y de regular la VA en plasma (Meri et al. 1992); (Jokiranta et al. 1999). No ha sido hasta los últimos cuatro años cuando se han descrito más pacientes, aunque éstos siguen siendo escasos (Goodship et al. 2012, Blanc et al. 2015, Nozal et al. 2012, Lorcyc et al. 2011, Sethi et al. 2011).

En el caso descrito aquí (Nozal et al. 2012), la paciente presentaba una gammapatía monoclonal IgG- λ que se asociaba con la actividad frente al FH, junto con una EDD. Al comenzar el tratamiento dirigido a la eliminación de esta paraproteína, los títulos de autoanticuerpos anti-FH disminuyeron paralelamente a los de la inmunoglobulina monoclonal, mejorando la función renal y los niveles séricos de proteínas del complemento. Esta mejoría con el tratamiento confirma el papel patogénico de los autoanticuerpos.

Los autoanticuerpos de la paciente reconocían la región con actividad reguladora del FH, como se comprobó mediante ELISAS de competición con anticuerpos monoclonales y con proteínas recombinantes. Mediante ensayos de funcionales, se comprobó que estos autoanticuerpos bloqueaban la actividad del FH como cofactor del FI para la inactivación proteolítica del C3b, lo que producía una activación permanente de la VA.

En los otros casos descritos en los que se han estudiado con más detalle los anticuerpos anti-FH, éstos también estaban dirigidos frente a la región N-terminal de la proteína y provocaban una desregulación de la VA en fase fluida, pero no afectaban a la regulación en superficies ejercida por el FH (Blanc et al. 2015).

Esta diferencia en la zona hacia la que van dirigidos los anticuerpos anti-FH en la C3G y el SHUa es la principal característica que los diferencia y que determina las distintas consecuencias funcionales sobre la regulación de la VA que se observan en ambas patologías. Los primeros cuatro SCRs del FH, diana de los autoanticuerpos en la C3G, están involucrados en la regulación de la VA en fase fluida, mientras que los SCRs 19-20, diana fundamental de los anti-FH en pacientes con SHUa, son cruciales para controlar la activación del complemento en las superficies celulares. El bloqueo de una u otra función tiene distintos efectos, en el primer caso, el efecto inhibitorio de los autoanticuerpos provoca una activación sistémica del complemento que se refleja en unos niveles bajos de C3 en suero. Esta excesiva activación permite que distintos componentes de la VA y VT, fundamentalmente C3, acaben depositados en el glomérulo renal. En el caso del SHUa, al reconocer los SCRs 19-20, los autoanticuerpos impiden la unión entre el FH y el C3b depositado en la superficie del endotelio, limitando la

capacidad del FH de regular la activación del complemento en las superficies celulares. Esto produce un daño localizado en las células endoteliales del glomérulo renal, pero no la activación sistémica que se observa en la C3G.

Otra característica que distingue a los autoanticuerpos anti-FH en el SHUa y en la C3G, es la frecuente asociación con la delección de los genes *CFHR1-CFHR3* en homocigosis. La mayoría de los pacientes que desarrollan autoanticuerpos anti-FH en el SHUa tienen deficiencia completa de FHR-1 (Dragon-Durey et al. 2009), y la ausencia de esta proteína parece jugar un papel determinante en la aparición de estos autoanticuerpos (Bhattacharjee et al. 2015). La asociación de los autoanticuerpos con la delección *CFHR1-CFHR3* no se ha encontrado en los pacientes con C3G, aunque sí es frecuente que aparezcan junto al C3NeF, lo que hace muchas veces difícil establecer un claro papel patogénico (Goodship et al. 2012, Blanc et al. 2015).

En cualquier caso, aunque la presencia de los autoanticuerpos frente al FH en pacientes con C3G sea mucho menos frecuente que en SHUa, no deben descartarse como posible causa de desregulación del complemento, ya que en todos los casos donde se han estudiado en profundidad, incluyendo el descrito aquí, han resultado ser capaces de inhibir la función reguladora del FH.

El sistema del complemento también está implicado en la patogénesis del LES y en la progresión de sus lesiones, y particularmente en la nefritis lúpica (Birmingham, Hebert 2015, Leffler, Bengtsson & Blom 2014). Deficiencias en homocigosis de algunos de los componentes de la VC se asocian a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, pero a su vez, el complemento también participa en la respuesta inflamatoria que se observa en los diferentes tejidos afectados (Truedsson, Bengtsson & Sturfelt 2007, Ballanti et al. 2013).

En los pacientes con LES y otras enfermedades autoinmunes, se ha descrito una mayor frecuencia de aparición de autoanticuerpos frente a FH respecto a controles sanos (Foltyn Zadura et al. 2012). A diferencia de los anticuerpos anti-FH presentes en el SHUa, los epítomos que reconocen los anticuerpos anti-FH parecen estar distribuidos a lo largo de toda la proteína, y su aparición no se asocia a la deficiencia de FHR-1.

En nuestro caso, hemos analizado la presencia de autoanticuerpos anti-FH en una cohorte de 110 pacientes con LES, encontrando un 3% de pacientes positivos. Al analizar los dominios que reconocían estos anticuerpos usando fragmentos recombinantes del FH, se observó unión de los autoanticuerpos a todos los fragmentos analizados. En esta serie se estudió también la

presencia/ausencia de las proteínas FHRs mediante WB. La frecuencia observada de la deficiencia de FHR-1 y FHR-3 fue de un 5%, pero ninguno de los pacientes con autoanticuerpos era portador de esta deficiencia. Estos resultados están en concordancia con trabajos anteriores (Foltyn Zadura et al. 2012). Aunque son pocos pacientes, dos de los casos con anticuerpos anti-FH de nuestra serie, presentan niveles reducidos de C3, mientras que el C4 se mantiene dentro de los límites de la normalidad. Esto podría apoyar el papel patogénico que tendrían estos anticuerpos al bloquear la capacidad reguladora del FH, tanto en fase fluida como en superficies, favoreciendo la inflamación generalizada que se observa en el LES y la progresión hacia la nefritis lúpica.

2. AUTOANTICUERPOS FRENTE A OTRAS PROTEÍNAS DE LA VÍA ALTERNATIVA

Tras la comprobación de que el principal efecto patogénico de los autoanticuerpos anti-FH es análogo al de las mutaciones descritas en *CFH* en las zonas que reconocen los anticuerpos (Jozsi et al. 2007, Strobel et al. 2010a, Jokiranta et al. 1999, Nozal et al. 2012)(Jozsi et al. 2007, Strobel et al. 2010a, Jokiranta et al. 1999, Nozal et al. 2012), y dada existencia de mutaciones en otros genes de la VA asociados a patología renal, se han buscado autoanticuerpos frente a otras proteínas, que pudieran alterar su funcionamiento.

En este sentido, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos frente al FI en pacientes de SHUa (Kavanagh et al. 2012) , aunque no se demostró que tuvieran un efecto sobre la función de este regulador. En EDD existe un caso publicado con autoanticuerpos anti-FB, que impedía la disociación de la convertasa de C3 (Strobel et al. 2010b), y dos casos con autoanticuerpos anti-FB y anti-C3b que producían un aumento de actividad de la convertasa (Chen et al. 2011). Al igual que ocurre en el caso de los C3NeF, no está claro si estos últimos son la causa de la enfermedad o si aparecen de forma secundaria por el aumento de productos de activación del complemento que circulan en plasma.

Siguiendo esta línea, aquí se ha analizado la presencia de autoanticuerpos frente a FI, FB, C3 y properdina en muestras de 92 pacientes de SHUa y de 97 pacientes con glomerulonefritis, 59 de ellos con C3G probada. Además se incorporó al estudio de autoanticuerpos frente a

proteínas de la VA una serie de 110 pacientes con LES, con el fin de intentar buscar mecanismos patogénicos comunes en una enfermedad mucho más prevalente que las anteriores, con un fuerte componente autoinmune y una clara implicación del sistema del complemento en su desarrollo (Birmingham, Hebert 2015, Leffler, Bengtsson & Blom 2014, Walport 2002).

Uno de los casos estudiados, GN19, es una paciente con nefritis lúpica que era portadora de una mutación en heterocigosis en C3 y con autoanticuerpos frente al FI, C3, FB y properdina a títulos elevados, especialmente los dos últimos. En esta paciente se demostró que la fracción IgG activaba de forma específica la VA en fase fluida, aunque no se pudo separar las distintas especificidades para comprobar si alguna en concreto era la responsable de esta activación (Nozal et al. 2015).

Los niveles reducidos de C3 que presentaba esta paciente por la mutación pueden favorecer la aparición de autoinmunidad, no sólo por el papel del C3 en el desarrollo y establecimiento de la tolerancia, sino también por el defecto en el transporte y eliminación de inmunocomplejos causado por la hipocomplementemia. Además los anticuerpos frente a proteínas de la VA contribuirían a reducir aún más los niveles de C3 al activar esta vía, produciendo una mayor generación y depósito de productos de activación del complemento en el glomérulo renal.

El daño orgánico en las enfermedades mediadas por inmunocomplejos se produce por el depósito de estos complejos circulantes y la activación del complemento por la VC. Los autoanticuerpos de esta paciente pueden acumularse en el glomérulo como inmunocomplejos y activar la VA además de la VC, incrementando el daño y contribuyendo de esta forma a la patogénesis de las lesiones glomerulares (Sato et al. 2011). Además, en este caso, la continua activación en fase fluida causada por los autoanticuerpos frente a proteínas de la VA podría explicar la ausencia de lesiones en otros órganos aparte de los riñones. Este daño restringido a los riñones también aparece en otras enfermedades causadas por una activación generalizada del sistema del complemento como la EDD. Además, en el modelo de ratón para la nefritis lúpica (ratones MRL-lpr), la activación descontrolada de la VA acelera la progresión de la enfermedad (Bao, Haas & Quigg 2011) apoyando la implicación de la activación de la VA en las enfermedades mediadas por inmunocomplejos (Sato et al. 2011, Bao, Quigg 2007).

Recientemente se han descrito autoanticuerpos anti-C3 en una serie de pacientes con nefritis lúpica (Vasilev et al. 2015). Estos anticuerpos interferían en la regulación de la VA, al

menos *in vitro*, lo que explicaría los niveles de C3 bajos que se encontraban en estos pacientes y contribuiría al proceso patológico, aportando evidencia al papel que tiene la VA en esta enfermedad.

Estos autoanticuerpos frente a proteínas de la VA parecen ser mucho más escasos que los anticuerpos anti-FH, pero es necesario ampliar el número de muestras analizadas para poder establecer su frecuencia real en las distintas patologías. Además, es necesario caracterizarlos en profundidad para poder determinar su implicación en la regulación de la VA, y por tanto su repercusión en cada enfermedad. La identificación de alguno de estos autoanticuerpos y de sus efectos sobre el sistema del complemento podría determinar la elección de tratamiento en estos pacientes, dirigiéndolo hacia la eliminación de los autoanticuerpos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han analizado las características moleculares de los autoanticuerpos anti-FH presentes en 19 pacientes de síndrome hemolítico urémico atípico procedentes de una cohorte española y húngara, entre ellas la subclase y cadena ligera del autoanticuerpo, la especificidad y el epítipo que reconocen y la avidéz que presentan. De 15 de estos pacientes se disponían de muestras seriadas obtenidas durante tiempos de seguimiento que iban desde 2 meses a 8 años, lo que ha permitido estudiar la evolución de los anticuerpos a lo largo del tiempo.
2. A pesar de la heterogeneidad que se encuentra entre los autoanticuerpos de los diferentes pacientes, sus características biológicas no varían a lo largo del tiempo. Tampoco existen diferencias significativas en el dominio que reconocen, que, especialmente en los pacientes con deficiencia de FHR-1, está limitado a unos pocos aminoácidos en el SCR 20 del FH. Este hecho, junto con la presencia de una única cadena ligera en los autoanticuerpos de la mayoría de los pacientes parecen indicar una respuesta restringida y oligoclonal en la generación de estos autoanticuerpos.
3. Se ha descrito en profundidad un anticuerpo anti FH en una paciente con enfermedad por depósitos densos y gammapatía monoclonal. Este autoanticuerpo, a diferencia de los presentes en el SHUa, reconoce la zona con actividad cofactora del FH y se ha podido determinar mediante ensayos funcionales que este autoanticuerpo era el causante de la patología.
4. Se han puesto a punto ELISAs para la detección de autoanticuerpos frente a factor B, factor I, C3 y properdina en muestras de suero de pacientes, y se han analizado muestras procedentes de 92 pacientes de síndrome hemolítico urémico atípico, de 59 glomerulopatías C3, 38 pacientes con otras glomerulonefritis y de 110 pacientes con lupus eritematoso sistémico.
5. Se ha analizado la frecuencia de la presencia de autoanticuerpos frente al factor B, factor I, C3 y properdina, encontrándose una frecuencia de aparición de estos autoanticuerpos de alrededor del 20% de los casos de glomerulopatía C3 y lupus eritematoso sistémico, y de en torno a un 10% en los pacientes con síndrome hemolítico urémico atípico.
6. Se ha estudiado un caso de una paciente con nefritis lúpica que presentaba autoanticuerpos dirigidos frente al factor B, factor I, C3 y properdina. Mediante ensayos funcionales se ha determinado que estos autoanticuerpos eran capaces de causar activación de la vía alternativa del complemento en fase fluida, lo que creemos que contribuye al desarrollo de su patología.
7. La existencia de estos autoanticuerpos frente a proteínas de la vía alternativa en patologías mediadas por el sistema del complemento, con repercusiones funcionales sobre la regulación de esta vía, abre la posibilidad en cuanto a la elección de tratamientos en estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abarategui-Garrido, C., Martinez-Barricarte, R., Lopez-Trascasa, M., de Cordoba, S.R. & Sanchez-Corral, P. 2009, "Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome", *Blood*, vol. 114, no. 19, pp. 4261-4271.
- Alcorlo, M., Tortajada, A., Rodriguez de Cordoba, S. & Llorca, O. 2013, "Structural basis for the stabilization of the complement alternative pathway C3 convertase by properdin", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 33, pp. 13504-13509.
- Appel, G.B., Cook, H.T., Hageman, G., Jennette, J.C., Kashgarian, M., Kirschfink, M., Lambris, J.D., Lanning, L., Lutz, H.U., Meri, S., Rose, N.R., Salant, D.J., Sethi, S., Smith, R.J., Smoyer, W., Tully, H.F., Tully, S.P., Walker, P., Welsh, M., Wurzner, R. & Zipfel, P.F. 2005, "Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 16, no. 5, pp. 1392-1403.
- Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Budayova-Spano, M., Rossi, V. & Fontecilla-Camps, J.C. 2002, "Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity", *Molecular immunology*, vol. 39, no. 7-8, pp. 383-394.
- Ballanti, E., Perricone, C., Greco, E., Ballanti, M., Di Muzio, G., Chimenti, M.S. & Perricone, R. 2013, "Complement and autoimmunity", *Immunologic research*, vol. 56, no. 2-3, pp. 477-491.
- Bao, L., Haas, M. & Quigg, R.J. 2011, "Complement factor H deficiency accelerates development of lupus nephritis", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 22, no. 2, pp. 285-295.
- Bao, L. & Quigg, R.J. 2007, "Complement in lupus nephritis: the good, the bad, and the unknown", *Seminars in nephrology*, vol. 27, no. 1, pp. 69-80.

- Barbour, T.D., Pickering, M.C. & Terence Cook, H. 2013, "Dense deposit disease and C3 glomerulopathy", *Seminars in nephrology*, vol. 33, no. 6, pp. 493-507.
- Bexborn, F., Andersson, P.O., Chen, H., Nilsson, B. & Ekdahl, K.N. 2008, "The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb)", *Molecular immunology*, vol. 45, no. 8, pp. 2370-2379.
- Bhattacharjee, A., Reuter, S., Trojnar, E., Kolodziejczyk, R., Seeberger, H., Hyvarinen, S., Uzonyi, B., Szilagy, A., Prohaszka, Z., Goldman, A., Jozsi, M. & Jokiranta, T.S. 2015, "The major autoantibody epitope on Factor H in atypical Hemolytic Uremic Syndrome is structurally different from its homologous site in Factor H related protein 1 supporting a novel model for induction of autoimmunity in this disease", *The Journal of biological chemistry*, .
- Birmingham, D.J. & Hebert, L.A. 2015, "The Complement System in Lupus Nephritis", *Seminars in nephrology*, vol. 35, no. 5, pp. 444-454.
- Birmingham, D.J., Irshaid, F., Nagaraja, H.N., Zou, X., Tsao, B.P., Wu, H., Yu, C.Y., Hebert, L.A. & Rovin, B.H. 2010, "The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare", *Lupus*, vol. 19, no. 11, pp. 1272-1280.
- Blanc, C., Roumenina, L.T., Ashraf, Y., Hyvarinen, S., Sethi, S.K., Ranchin, B., Niaudet, P., Loirat, C., Gulati, A., Bagga, A., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Jokiranta, T.S., Fremeaux-Bacchi, V. & Dragon-Durey, M.A. 2012, "Overall neutralization of complement factor H by autoantibodies in the acute phase of the autoimmune form of atypical hemolytic uremic syndrome", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 189, no. 7, pp. 3528-3537.
- Blanc, C., Togarsimalemath, S.K., Chauvet, S., Le Quintrec, M., Moulin, B., Buchler, M., Jokiranta, T.S., Roumenina, L.T., Fremeaux-Bacchi, V. & Dragon-Durey, M.A. 2015, "Anti-Factor H Autoantibodies in C3 Glomerulopathies and in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: One Target, Two Diseases", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 194, no. 11, pp. 5129-5138.

- Blaum, B.S., Hannan, J.P., Herbert, A.P., Kavanagh, D., Uhrin, D. & Stehle, T. 2015, "Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H", *Nature chemical biology*, vol. 11, no. 1, pp. 77-82.
- Campistol, J.M., Arias, M., Ariceta, G., Blasco, M., Espinosa, L., Espinosa, M., Grinyo, J.M., Macia, M., Mendizabal, S., Praga, M., Roman, E., Torra, R., Valdes, F., Vilalta, R. & Rodriguez de Cordoba, S. 2015, "An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document", *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*, vol. 35, no. 5, pp. 421-447.
- Cardone, J., Le Friec, G. & Kemper, C. 2011, "CD46 in innate and adaptive immunity: an update", *Clinical and experimental immunology*, vol. 164, no. 3, pp. 301-311.
- Carroll, M.C. 2004, "A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus", *Nature reviews.Immunology*, vol. 4, no. 10, pp. 825-831.
- Carroll, M.C. & Isenman, D.E. 2012, "Regulation of humoral immunity by complement", *Immunity*, vol. 37, no. 2, pp. 199-207.
- Chen, Q., Muller, D., Rudolph, B., Hartmann, A., Kuwertz-Broking, E., Wu, K., Kirschfink, M., Skerka, C. & Zipfel, P.F. 2011, "Combined C3b and factor B autoantibodies and MPGN type II", *The New England journal of medicine*, vol. 365, no. 24, pp. 2340-2342.
- Corvillo, F., Bravo Garcia-Morato, M., Nozal, P., Garrido, S., Tortajada, A., Rodriguez de Cordoba, S. & Lopez-Trascasa, M. 2016, "Serum properdin consumption as a biomarker of C5 convertase dysregulation in C3 glomerulopathy", *Clinical and experimental immunology*, vol. 184, no. 1, pp. 118-125.
- Daha, M.R., Fearon, D.T. & Austen, K.F. 1976, "C3 nephritic factor (C3NeF): stabilization of fluid phase and cell-bound alternative pathway convertase", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 116, no. 1, pp. 1-7.
- Davis, A.E., 3rd, Lu, F. & Mejia, P. 2010, "C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor", *Thrombosis and haemostasis*, vol. 104, no. 5, pp. 886-893.
- Degn, S.E., Hansen, A.G., Steffensen, R., Jacobsen, C., Jensenius, J.C. & Thiel, S. 2009, "MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement

system and regulating the lectin pathway of complement activation", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 183, no. 11, pp. 7371-7378.

Degn, S.E., Jensen, L., Olszowski, T., Jensenius, J.C. & Thiel, S. 2013, "Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable by MAp44", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 191, no. 3, pp. 1334-1345.

Degn, S.E. & Thiel, S. 2013, "Humoral pattern recognition and the complement system", *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 78, no. 2, pp. 181-193.

Dragon-Durey, M.A., Blanc, C., Garnier, A., Hofer, J., Sethi, S.K. & Zimmerhackl, L.B. 2010, "Anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome: review of literature of the autoimmune form of HUS", *Seminars in thrombosis and hemostasis*, vol. 36, no. 6, pp. 633-640.

Dragon-Durey, M.A., Blanc, C., Marinozzi, M.C., van Schaarenburg, R.A. & Trouw, L.A. 2013, "Autoantibodies against complement components and functional consequences", *Molecular immunology*, vol. 56, no. 3, pp. 213-221.

Dragon-Durey, M.A., Blanc, C., Marliot, F., Loirat, C., Blouin, J., Sautes-Fridman, C., Fridman, W.H. & Fremeaux-Bacchi, V. 2009, "The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome", *Journal of medical genetics*, vol. 46, no. 7, pp. 447-450.

Dragon-Durey, M.A., Loirat, C., Cloarec, S., Macher, M.A., Blouin, J., Nivet, H., Weiss, L., Fridman, W.H. & Fremeaux-Bacchi, V. 2005, "Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 16, no. 2, pp. 555-563.

Elliott, M.K., Jarmi, T., Ruiz, P., Xu, Y., Holers, V.M. & Gilkeson, G.S. 2004, "Effects of complement factor D deficiency on the renal disease of MRL/lpr mice", *Kidney international*, vol. 65, no. 1, pp. 129-138.

Ermert, D. & Blom, A.M. 2016, "C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend", *Immunology letters*, vol. 169, pp. 82-92.

- Fakhouri, F., Fremeaux-Bacchi, V., Noel, L.H., Cook, H.T. & Pickering, M.C. 2010, "C3 glomerulopathy: a new classification", *Nature reviews.Nephrology*, vol. 6, no. 8, pp. 494-499.
- Fearon, D.T. & Austen, K.F. 1975, "Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase", *The Journal of experimental medicine*, vol. 142, no. 4, pp. 856-863.
- Ferreira, V.P., Pangburn, M.K. & Cortes, C. 2010, "Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate", *Molecular immunology*, vol. 47, no. 13, pp. 2187-2197.
- Foltyn Zadura, A., Zipfel, P.F., Bokarewa, M.I., Sturfelt, G., Jonsen, A., Nilsson, S.C., Hillarp, A., Saxne, T., Trouw, L.A. & Blom, A.M. 2012, "Factor H autoantibodies and deletion of Complement Factor H-Related protein-1 in rheumatic diseases in comparison to atypical hemolytic uremic syndrome", *Arthritis research & therapy*, vol. 14, no. 4, pp. R185.
- Forneris, F., Ricklin, D., Wu, J., Tzekou, A., Wallace, R.S., Lambris, J.D. & Gros, P. 2010, "Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 330, no. 6012, pp. 1816-1820.
- Gaboriaud, C., Frachet, P., Thielens, N.M. & Arlaud, G.J. 2012, "The human c1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands", *Frontiers in immunology*, vol. 2, pp. 92.
- Gaboriaud, C., Ling, W.L., Thielens, N.M., Bally, I. & Rossi, V. 2014, "Deciphering the fine details of c1 assembly and activation mechanisms: "mission impossible"?", *Frontiers in immunology*, vol. 5, pp. 565.
- Gale, D.P., de Jorge, E.G., Cook, H.T., Martinez-Barricarte, R., Hadjisavvas, A., McLean, A.G., Pusey, C.D., Pierides, A., Kyriacou, K., Athanasiou, Y., Voskarides, K., Deltas, C., Palmer, A., Fremeaux-Bacchi, V., de Cordoba, S.R., Maxwell, P.H. & Pickering, M.C. 2010, "Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis", *Lancet (London, England)*, vol. 376, no. 9743, pp. 794-801.

- Goicoechea de Jorge, E., Caesar, J.J., Malik, T.H., Patel, M., Colledge, M., Johnson, S., Hakobyan, S., Morgan, B.P., Harris, C.L., Pickering, M.C. & Lea, S.M. 2013, "Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 12, pp. 4685-4690.
- Goodship, T.H., Pappworth, I.Y., Toth, T., Denton, M., Houlberg, K., McCormick, F., Warland, D., Moore, I., Hunze, E.M., Staniforth, S.J., Hayes, C., Cavalcante, D.P., Kavanagh, D., Strain, L., Herbert, A.P., Schmidt, C.Q., Barlow, P.N., Harris, C.L. & Marchbank, K.J. 2012, "Factor H autoantibodies in membranoproliferative glomerulonephritis", *Molecular immunology*, vol. 52, no. 3-4, pp. 200-206.
- Hadders, M.A., Bubeck, D., Roversi, P., Hakobyan, S., Forneris, F., Morgan, B.P., Pangburn, M.K., Llorca, O., Lea, S.M. & Gros, P. 2012, "Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9", *Cell reports*, vol. 1, no. 3, pp. 200-207.
- Heja, D., Kocsis, A., Dobo, J., Szilagy, K., Szasz, R., Zavodszky, P., Pal, G. & Gal, P. 2012, "Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 26, pp. 10498-10503.
- Hofer, J., Giner, T. & Jozsi, M. 2014, "Complement factor H-antibody-associated hemolytic uremic syndrome: pathogenesis, clinical presentation, and treatment", *Seminars in thrombosis and hemostasis*, vol. 40, no. 4, pp. 431-443.
- Hofer, J., Janecke, A.R., Zimmerhackl, L.B., Riedl, M., Rosales, A., Giner, T., Cortina, G., Haindl, C.J., Petzelberger, B., Pawlik, M., Jeller, V., Vester, U., Gadner, B., van Husen, M., Moritz, M.L., Wurzner, R., Jungraithmayr, T. & German-Austrian HUS Study Group 2013, "Complement factor H-related protein 1 deficiency and factor H antibodies in pediatric patients with atypical hemolytic uremic syndrome", *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 8, no. 3, pp. 407-415.
- Hourcade, D.E., Mitchell, L., Kuttner-Kondo, L.A., Atkinson, J.P. & Medof, M.E. 2002, "Decay-accelerating factor (DAF), complement receptor 1 (CR1), and factor H dissociate the complement AP C3 convertase (C3bBb) via sites on the type A domain of Bb", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 2, pp. 1107-1112.

- Java, A., Liszewski, M.K., Hourcade, D.E., Zhang, F. & Atkinson, J.P. 2015, "Role of complement receptor 1 (CR1; CD35) on epithelial cells: A model for understanding complement-mediated damage in the kidney", *Molecular immunology*, vol. 67, no. 2 Pt B, pp. 584-595.
- Jokiranta, T.S., Hellwege, J., Koistinen, V., Zipfel, P.F. & Meri, S. 2000, "Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 36, pp. 27657-27662.
- Jokiranta, T.S., Solomon, A., Pangburn, M.K., Zipfel, P.F. & Meri, S. 1999, "Nephritogenic lambda light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 163, no. 8, pp. 4590-4596.
- Jozsi, M. & Meri, S. 2014, "Factor H-related proteins", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1100, pp. 225-236.
- Jozsi, M., Reuter, S., Nozal, P., Lopez-Trascasa, M., Sanchez-Corral, P., Prohaszka, Z. & Uzonyi, B. 2014, "Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome", *Immunology letters*, vol. 160, no. 2, pp. 163-171.
- Jozsi, M., Strobel, S., Dahse, H.M., Liu, W.S., Hoyer, P.F., Oppermann, M., Skerka, C. & Zipfel, P.F. 2007, "Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome", *Blood*, vol. 110, no. 5, pp. 1516-1518.
- Jozsi, M., Tortajada, A., Uzonyi, B., Goicoechea de Jorge, E. & Rodriguez de Cordoba, S. 2015, "Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces", *Trends in immunology*, .
- Kavanagh, D., Pappworth, I.Y., Anderson, H., Hayes, C.M., Moore, I., Hunze, E.M., Bennaceur, K., Roversi, P., Lea, S., Strain, L., Ward, R., Plant, N., Nailescu, C., Goodship, T.H. & Marchbank, K.J. 2012, "Factor I autoantibodies in patients with atypical hemolytic uremic syndrome: disease-associated or an epiphenomenon?", *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 7, no. 3, pp. 417-426.
- Kemper, C., Atkinson, J.P. & Hourcade, D.E. 2010, "Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule", *Annual Review of Immunology*, vol. 28, pp. 131-155.

- Kemper, C., Pangburn, M.K. & Fishelson, Z. 2014, "Complement nomenclature 2014", *Molecular immunology*, vol. 61, no. 2, pp. 56-58.
- Kim, D.D. & Song, W.C. 2006, "Membrane complement regulatory proteins", *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, vol. 118, no. 2-3, pp. 127-136.
- Kishore, U., Ghai, R., Greenhough, T.J., Shrive, A.K., Bonifati, D.M., Gadjeva, M.G., Waters, P., Kojouharova, M.S., Chakraborty, T. & Agrawal, A. 2004, "Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q", *Immunology letters*, vol. 95, no. 2, pp. 113-128.
- Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.O., Ager, R.R., Reis, E.S. & Kohl, J. 2009, "The role of the anaphylatoxins in health and disease", *Molecular immunology*, vol. 46, no. 14, pp. 2753-2766.
- Koski, C.L., Ramm, L.E., Hammer, C.H., Mayer, M.M. & Shin, M.L. 1983, "Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, no. 12, pp. 3816-3820.
- Kouser, L., Abdul-Aziz, M., Nayak, A., Stover, C.M., Sim, R.B. & Kishore, U. 2013, "Properdin and factor h: opposing players on the alternative complement pathway "see-saw"", *Frontiers in immunology*, vol. 4, pp. 93.
- Kuhn, S. & Zipfel, P.F. 1996, "Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H", *European journal of immunology*, vol. 26, no. 10, pp. 2383-2387.
- Lachmann, P.J. 2009, "The amplification loop of the complement pathways", *Advances in Immunology*, vol. 104, pp. 115-149.
- Leffler, J., Bengtsson, A.A. & Blom, A.M. 2014, "The complement system in systemic lupus erythematosus: an update", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 73, no. 9, pp. 1601-1606.
- Liszewski, M.K. & Atkinson, J.P. 2015, "Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations", *Human genomics*, vol. 9, pp. 7-015-0029-z.

- Liszewski, M.K., Kolev, M., Le Friec, G., Leung, M., Bertram, P.G., Fara, A.F., Subias, M., Pickering, M.C., Drouet, C., Meri, S., Arstila, T.P., Pekkarinen, P.T., Ma, M., Cope, A., Reinheckel, T., Rodriguez de Cordoba, S., Afzali, B., Atkinson, J.P. & Kemper, C. 2013, "Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation", *Immunity*, vol. 39, no. 6, pp. 1143-1157.
- Loirat, C. & Fremeaux-Bacchi, V. 2011, "Atypical hemolytic uremic syndrome", *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 6, pp. 60-1172-6-60.
- Lorcy, N., Rioux-Leclercq, N., Lombard, M.L., Le Pogamp, P. & Vigneau, C. 2011, "Three kidneys, two diseases, one antibody?", *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 26, no. 11, pp. 3811-3813.
- Martin, M., Leffler, J. & Blom, A.M. 2012, "Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 40, pp. 33733-33744.
- McDonald, J.F. & Nelsestuen, G.L. 1997, "Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: characterization of its impact on C9 polymerization", *Biochemistry*, vol. 36, no. 24, pp. 7464-7473.
- Mele, C., Remuzzi, G. & Noris, M. 2014, "Hemolytic uremic syndrome", *Seminars in immunopathology*, vol. 36, no. 4, pp. 399-420.
- Meri, S., Koistinen, V., Miettinen, A., Tornroth, T. & Seppala, I.J. 1992, "Activation of the alternative pathway of complement by monoclonal lambda light chains in membranoproliferative glomerulonephritis", *The Journal of experimental medicine*, vol. 175, no. 4, pp. 939-950.
- Merle, N.S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L.T. 2015, "Complement System Part II: Role in Immunity", *Frontiers in immunology*, vol. 6, pp. 257.
- Moller-Kristensen, M., Thiel, S., Sjolholm, A., Matsushita, M. & Jensenius, J.C. 2007, "Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway", *International immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 141-149.

- Moore, I., Strain, L., Pappworth, I., Kavanagh, D., Barlow, P.N., Herbert, A.P., Schmidt, C.Q., Staniforth, S.J., Holmes, L.V., Ward, R., Morgan, L., Goodship, T.H. & Marchbank, K.J. 2010, "Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome", *Blood*, vol. 115, no. 2, pp. 379-387.
- Moskovich, O. & Fishelson, Z. 2007, "Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 41, pp. 29977-29986.
- Nester, C.M., Barbour, T., de Cordoba, S.R., Dragon-Durey, M.A., Fremeaux-Bacchi, V., Goodship, T.H., Kavanagh, D., Noris, M., Pickering, M., Sanchez-Corral, P., Skerka, C., Zipfel, P. & Smith, R.J. 2015, "Atypical aHUS: State of the art", *Molecular immunology*, vol. 67, no. 1, pp. 31-42.
- Nester, C.M. & Thomas, C.P. 2012, "Atypical hemolytic uremic syndrome: what is it, how is it diagnosed, and how is it treated?", *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, vol. 2012, pp. 617-625.
- Nilsson, S.C., Sim, R.B., Lea, S.M., Fremeaux-Bacchi, V. & Blom, A.M. 2011, "Complement factor I in health and disease", *Molecular immunology*, vol. 48, no. 14, pp. 1611-1620.
- Noris, M. & Remuzzi, G. 2015, "Glomerular Diseases Dependent on Complement Activation, Including Atypical Hemolytic Uremic Syndrome, Membranoproliferative Glomerulonephritis, and C3 Glomerulopathy: Core Curriculum 2015", *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, vol. 66, no. 2, pp. 359-375.
- Noris, M. & Remuzzi, G. 2013, "Overview of complement activation and regulation", *Seminars in nephrology*, vol. 33, no. 6, pp. 479-492.
- Nozal, P., Strobel, S., Ibernón, M., López, D., Sánchez-Corral, P., Rodríguez de Córdoba, S., Józsi, M. & López-Trascasa, M. 2012, "Anti-factor H antibody affecting factor H cofactor activity in a patient with dense deposit disease", *Clinical Kidney Journal*, vol. 5, no. 2, pp. 133.

- Nozal, P., Bernabeu-Herrero, M.E., Uzonyi, B., Szilagyi, A., Hyvarinen, S., Prohaszka, Z., Jokiranta, T.S., Sanchez-Corral, P., Lopez-Trascasa, M. & Jozsi, M. 2016, "Heterogeneity but individual constancy of epitopes, isotypes and avidity of factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome", *Molecular immunology*, vol. 70, pp. 47-55.
- Nozal, P., Garrido, S., Alba-Dominguez, M., Espinosa, L., Pena, A., Cordoba, S.R., Sanchez-Corral, P. & Lopez-Trascasa, M. 2014, "An ELISA assay with two monoclonal antibodies allows the estimation of free factor H and identifies patients with acquired deficiency of this complement regulator", *Molecular immunology*, vol. 58, no. 2, pp. 194-200.
- Nozal, P., Garrido, S., Martinez-Ara, J., Picazo, M.L., Yebenes, L., Alvarez-Doforno, R., Pinto, S., de Cordoba, S.R. & Lopez-Trascasa, M. 2015, "Case report: lupus nephritis with autoantibodies to complement alternative pathway proteins and C3 gene mutation", *BMC nephrology*, vol. 16, no. 1, pp. 40-015-0032-6.
- Paidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J. & Frchet, P. 2008, "C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 180, no. 4, pp. 2329-2338.
- Pangburn, M.K. 2000, "Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement", *Immunopharmacology*, vol. 49, no. 1-2, pp. 149-157.
- Pangburn, M.K. & Rawal, N. 2002, "Structure and function of complement C5 convertase enzymes", *Biochemical Society transactions*, vol. 30, no. Pt 6, pp. 1006-1010.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D. & Muller-Eberhard, H.J. 1981, "Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3", *The Journal of experimental medicine*, vol. 154, no. 3, pp. 856-867.
- Perez-Caballero, D., Gonzalez-Rubio, C., Gallardo, M.E., Vera, M., Lopez-Trascasa, M., Rodriguez de Cordoba, S. & Sanchez-Corral, P. 2001, "Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome", *American Journal of Human Genetics*, vol. 68, no. 2, pp. 478-484.

Pickering, M.C., D'Agati, V.D., Nester, C.M., Smith, R.J., Haas, M., Appel, G.B., Alpers, C.E., Bajema, I.M., Bedrosian, C., Braun, M., Doyle, M., Fakhouri, F., Fervenza, F.C., Fogo, A.B., Fremeaux-Bacchi, V., Gale, D.P., Goicoechea de Jorge, E., Griffin, G., Harris, C.L., Holers, V.M., Johnson, S., Lavin, P.J., Medjeral-Thomas, N., Paul Morgan, B., Nast, C.C., Noel, L.H., Peters, D.K., Rodriguez de Cordoba, S., Servais, A., Sethi, S., Song, W.C., Tamburini, P., Thurman, J.M., Zavros, M. & Cook, H.T. 2013, "C3 glomerulopathy: consensus report", *Kidney international*, vol. 84, no. 6, pp. 1079-1089.

Pickering, M.C., de Jorge, E.G., Martinez-Barricarte, R., Recalde, S., Garcia-Layana, A., Rose, K.L., Moss, J., Walport, M.J., Cook, H.T., de Cordoba, S.R. & Botto, M. 2007, "Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains", *The Journal of experimental medicine*, vol. 204, no. 6, pp. 1249-1256.

Podack, E.R., Kolb, W.P. & Muller-Eberhard, H.J. 1977, "The SC5b-7 complex: formation, isolation, properties, and subunit composition", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 119, no. 6, pp. 2024-2029.

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J.D. 2010, "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis", *Nature immunology*, vol. 11, no. 9, pp. 785-797.

Ricklin, D. & Lambris, J.D. 2013, "Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 190, no. 8, pp. 3831-3838.

Rodriguez de Cordoba, S., Esparza-Gordillo, J., Goicoechea de Jorge, E., Lopez-Trascasa, M. & Sanchez-Corral, P. 2004, "The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations", *Molecular immunology*, vol. 41, no. 4, pp. 355-367.

Rodriguez de Cordoba, S., Hidalgo, M.S., Pinto, S. & Tortajada, A. 2014, "Genetics of atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS)", *Seminars in thrombosis and hemostasis*, vol. 40, no. 4, pp. 422-430.

Rother, U. 1982, "A new screening test for C3 nephritis factor based on a stable cell bound convertase on sheep erythrocytes", *Journal of immunological methods*, vol. 51, no. 1, pp. 101-107.

- Roumenina, L., Bureeva, S., Kantardjiev, A., Karlinsky, D., Andia-Pravdivy, J.E., Sim, R., Kaplun, A., Popov, M., Kishore, U. & Atanasov, B. 2007, "Complement C1q-target proteins recognition is inhibited by electric moment effectors", *Journal of Molecular Recognition : JMR*, vol. 20, no. 5, pp. 405-415.
- Roumenina, L.T., Kantardjiev, A.A., Atanasov, B.P., Waters, P., Gadjeva, M., Reid, K.B., Mantovani, A., Kishore, U. & Kojouharova, M.S. 2005, "Role of Ca²⁺ in the electrostatic stability and the functional activity of the globular domain of human C1q", *Biochemistry*, vol. 44, no. 43, pp. 14097-14109.
- Roumenina, L.T., Popov, K.T., Bureeva, S.V., Kojouharova, M., Gadjeva, M., Rabheru, S., Thakrar, R., Kaplun, A. & Kishore, U. 2008, "Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1784, no. 9, pp. 1271-1276.
- Roumenina, L.T., Radanova, M., Atanasov, B.P., Popov, K.T., Kaveri, S.V., Lacroix-Desmazes, S., Fremeaux-Bacchi, V. & Dimitrov, J.D. 2011, "Heme interacts with c1q and inhibits the classical complement pathway", *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 18, pp. 16459-16469.
- Roumenina, L.T., Ruseva, M.M., Zlatarova, A., Ghai, R., Kolev, M., Olova, N., Gadjeva, M., Agrawal, A., Bottazzi, B., Mantovani, A., Reid, K.B., Kishore, U. & Kojouharova, M.S. 2006, "Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains", *Biochemistry*, vol. 45, no. 13, pp. 4093-4104.
- Roversi, P., Johnson, S., Caesar, J.J., McLean, F., Leath, K.J., Tsiftoglou, S.A., Morgan, B.P., Harris, C.L., Sim, R.B. & Lea, S.M. 2011, "Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 31, pp. 12839-12844.
- Sanchez-Corral, P., Gonzalez-Rubio, C., Rodriguez de Cordoba, S. & Lopez-Trascasa, M. 2004, "Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H", *Molecular immunology*, vol. 41, no. 1, pp. 81-84.

- Sato, N., Ohsawa, I., Nagamachi, S., Ishii, M., Kusaba, G., Inoshita, H., Toki, A., Horikoshi, S., Ohi, H., Matsushita, M. & Tomino, Y. 2011, "Significance of glomerular activation of the alternative pathway and lectin pathway in lupus nephritis", *Lupus*, vol. 20, no. 13, pp. 1378-1386.
- Servais, A., Noel, L.H., Fremeaux-Bacchi, V. & Lesavre, P. 2013, "C3 glomerulopathy", *Contributions to nephrology*, vol. 181, pp. 185-193.
- Servais, A., Noel, L.H., Roumenina, L.T., Le Quintrec, M., Ngo, S., Dragon-Durey, M.A., Macher, M.A., Zuber, J., Karras, A., Provot, F., Moulin, B., Grunfeld, J.P., Niaudet, P., Lesavre, P. & Fremeaux-Bacchi, V. 2012, "Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies", *Kidney international*, vol. 82, no. 4, pp. 454-464.
- Sethi, S. & Fervenza, F.C. 2014, "Pathology of renal diseases associated with dysfunction of the alternative pathway of complement: C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS)", *Seminars in thrombosis and hemostasis*, vol. 40, no. 4, pp. 416-421.
- Sethi, S., Fervenza, F.C., Zhang, Y., Nasr, S.H., Leung, N., Vrana, J., Cramer, C., Nester, C.M. & Smith, R.J. 2011, "Proliferative glomerulonephritis secondary to dysfunction of the alternative pathway of complement", *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 6, no. 5, pp. 1009-1017.
- Sethi, S., Gamez, J.D., Vrana, J.A., Theis, J.D., Bergen, H.R., 3rd, Zipfel, P.F., Dogan, A. & Smith, R.J. 2009, "Glomeruli of Dense Deposit Disease contain components of the alternative and terminal complement pathway", *Kidney international*, vol. 75, no. 9, pp. 952-960.
- Sinha, A., Gulati, A., Saini, S., Blanc, C., Gupta, A., Gurjar, B.S., Saini, H., Kotresh, S.T., Ali, U., Bhatia, D., Ohri, A., Kumar, M., Agarwal, I., Gulati, S., Anand, K., Vijayakumar, M., Sinha, R., Sethi, S., Salmona, M., George, A., Bal, V., Singh, G., Dinda, A.K., Hari, P., Rath, S., Dragon-Durey, M.A., Bagga, A. & Indian HUS Registry 2014, "Prompt plasma exchanges and immunosuppressive treatment improves the outcomes of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome in children", *Kidney international*, vol. 85, no. 5, pp. 1151-1160.

- Skerka, C., Chen, Q., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L.T. 2013, "Complement factor H related proteins (CFHRs)", *Molecular immunology*, vol. 56, no. 3, pp. 170-180.
- Skerka, C., Licht, C., Mengel, M., Uzonyi, B., Strobel, S., Zipfel, P.F. & Jozsi, M. 2009, "Autoimmune forms of thrombotic microangiopathy and membranoproliferative glomerulonephritis: Indications for a disease spectrum and common pathogenic principles", *Molecular immunology*, vol. 46, no. 14, pp. 2801-2807.
- Spitzer, D., Mitchell, L.M., Atkinson, J.P. & Hourcade, D.E. 2007, "Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 179, no. 4, pp. 2600-2608.
- Strobel, S., Abarrategui-Garrido, C., Fariza-Requejo, E., Seeberger, H., Sanchez-Corral, P. & Jozsi, M. 2011, "Factor H-related protein 1 neutralizes anti-factor H autoantibodies in autoimmune hemolytic uremic syndrome", *Kidney international*, vol. 80, no. 4, pp. 397-404.
- Strobel, S., Hoyer, P.F., Mache, C.J., Sulyok, E., Liu, W.S., Richter, H., Oppermann, M., Zipfel, P.F. & Jozsi, M. 2010a, "Functional analyses indicate a pathogenic role of factor H autoantibodies in atypical haemolytic uraemic syndrome", *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 25, no. 1, pp. 136-144.
- Strobel, S., Zimmering, M., Papp, K., Prechl, J. & Jozsi, M. 2010b, "Anti-factor B autoantibody in dense deposit disease", *Molecular immunology*, vol. 47, no. 7-8, pp. 1476-1483.
- Tegla, C.A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe, R., 3rd, Rus, V., Niculescu, F. & Rus, H. 2011, "Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes", *Immunologic research*, vol. 51, no. 1, pp. 45-60.
- Truedsson, L., Bengtsson, A.A. & Sturfelt, G. 2007, "Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus", *Autoimmunity*, vol. 40, no. 8, pp. 560-566.

- Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S. & French, L.E. 1993, "Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 151, no. 4, pp. 2159-2165.
- Vasilev, V.V., Noe, R., Dragon-Durey, M.A., Chauvet, S., Lazarov, V.J., Deliyska, B.P., Fremeaux-Bacchi, V., Dimitrov, J.D. & Roumenina, L.T. 2015, "Functional Characterization of Autoantibodies against Complement Component C3 in Patients with Lupus Nephritis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 290, no. 42, pp. 25343-25355.
- Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaebler, W.J. & Keeble, A.H. 2010, "Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation", *Immunobiology*, vol. 215, no. 1, pp. 1-11.
- Walport, M.J. 2002, "Complement and systemic lupus erythematosus", *Arthritis research*, vol. 4 Suppl 3, pp. S279-93.
- Walport, M.J., Davies, K.A., Botto, M., Naughton, M.A., Isenberg, D.A., Biasi, D., Powell, R.J., Cheung, N.T. & Struthers, G.R. 1994, "C3 nephritic factor and SLE: report of four cases and review of the literature", *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, vol. 87, no. 10, pp. 609-615.
- Watanabe, H., Garnier, G., Circolo, A., Wetsel, R.A., Ruiz, P., Holers, V.M., Boackle, S.A., Colten, H.R. & Gilkeson, G.S. 2000, "Modulation of renal disease in MRL/lpr mice genetically deficient in the alternative complement pathway factor B", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 164, no. 2, pp. 786-794.
- Weiler, J.M., Daha, M.R., Austen, K.F. & Fearon, D.T. 1976, "Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 9, pp. 3268-3272.
- Yamashina, M., Ueda, E., Kinoshita, T., Takami, T., Ojima, A., Ono, H., Tanaka, H., Kondo, N., Orii, T. & Okada, N. 1990, "Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria", *The New England journal of medicine*, vol. 323, no. 17, pp. 1184-1189.

Yamauchi, Y., Stevens, J.W., Macon, K.J. & Volanakis, J.E. 1994, "Recombinant and native zymogen forms of human complement factor D", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 152, no. 7, pp. 3645-3653.

Zhang, Y., Meyer, N.C., Wang, K., Nishimura, C., Frees, K., Jones, M., Katz, L.M., Sethi, S. & Smith, R.J. 2012, "Causes of alternative pathway dysregulation in dense deposit disease", *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 7, no. 2, pp. 265-274.

Zlatarova, A.S., Rouseva, M., Roumenina, L.T., Gadjeva, M., Kolev, M., Dobrev, I., Olova, N., Ghai, R., Jensenius, J.C., Reid, K.B., Kishore, U. & Kojouharova, M.S. 2006, "Existence of different but overlapping IgG- and IgM-binding sites on the globular domain of human C1q", *Biochemistry*, vol. 45, no. 33, pp. 9979-9988.

ANEXO

PUBLICACIONES DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON LA TESIS:

Nozal, P.; Strobel, S.; Ibernón, M.; López, D.; Sánchez-Corral, P.; Rodríguez de Córdoba, S.; Józsi, M.; López-Trascasa, M. Anti-factor H antibody affecting factor H cofactor activity in a patient with dense deposit disease. *Clinical Kidney Journal*, 2012, 5, 2, 133.

Nozal P, Garrido S, Alba-Domínguez M, Espinosa L, Peña A, Córdoba SR, Sánchez-Corral P, López-Trascasa M. An ELISA assay with two monoclonal antibodies allows the estimation of free factor H and identifies patients with acquired deficiency of this complement regulator. *Mol Immunol*. 2014 Apr;58(2):194-200.

Józsi M, Reuter S, Nozal P, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, Uzonyi B. Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome. *Immunol Lett*. 2014 Aug;160(2):163-71.

Nozal P, Garrido S, Martínez-Ara J, Picazo ML, Yébenes L, Álvarez-Doforno R, Pinto S, de Córdoba SR, López-Trascasa M. Case report: lupus nephritis with autoantibodies to complement alternative pathway proteins and C3 gene mutation. *BMC Nephrol*. 2015 Mar 30;16:40.

Nozal P, Bernabéu-Herrero ME, Uzonyi B, Szilágyi Á, Hyvärinen S, Prohászka Z, Jokiranta TS, Sánchez-Corral P, López-Trascasa M, Józsi M. Heterogeneity but individual constancy of epitopes, isotypes and avidity of factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*. 2016 Feb;70:47-55.

Nozal P, López-Trascasa M. Autoanticuerpos frente a proteínas de la vía alternativa del complemento en enfermedad renal. *Nefrología*. 2016

OTROS ARTÍCULOS

Bravo García-Morato M, Padilla-Merlano B, Nozal P, Espiño M, Juárez C, Villar LM, López-Trascasa M; en nombre del grupo de Inmunoquímica de la Sociedad Española de Inmunología. Laboratory guidelines for the diagnosis and follow-up of patients with monoclonal gammopathies. *Rev Clin Esp.* 2016 Apr;216(3):128-134.

Corvillo F, Bravo García-Morato M, Nozal P, Garrido S, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M. Serum properdin consumption as a biomarker of C5 convertase dysregulation in C3 glomerulopathy. *Clin Exp Immunol.* 2016 Apr;184(1):118-25

Blom AM, Corvillo F, Magda M, Stasiłojć G, Nozal P, Pérez-Valdivia MÁ, Cabello-Chaves V, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M, Okrój M. Testing the Activity of Complement Convertases in Serum/Plasma for Diagnosis of C4NeF-Mediated C3 Glomerulonephritis. *J Clin Immunol.* 2016 May 5.