

TESIS DOCTORAL

Análisis del sistema del complemento en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico: asociación con su presentación clínica y comorbilidades

María García González

Servicio de Reumatología
Hospital Universitario de Canarias

Tesis doctoral presentada para optar al grado
de Doctor de la Universidad de La Laguna

Abril de 2024

Director/tutor: Iván Ferraz Amaro

Codirector: Federico Díaz González

Agradecimientos

A mis padres, los creadores de mi cascada. Gracias por una infancia feliz y por haberme inculcado valores que han sido indispensables para traerme hasta aquí. A mis hermanos, las otras dos vías de este particular tridente. A mi familia, mi vía terminal común, a la vez fin y principio de todo.

A la Universidad de La Laguna, sustrato fundamental para mi desarrollo académico y profesional, sin la que nada de lo siguiente habría resultado tal como ha sido.

A aquéllos que durante mi formación acrecentaron mi curiosidad por la ciencia, los iniciadores de mi vía. A Gundela Meyer, por todas aquellas tardes estudiando la expresión de p73 en el ratón, donde hice mis primeros pinitos con pipetas, buffers y reactivos. A Marian Gantes, por enseñarnos a usar la metodología adecuada para plantear y responder preguntas científicas.

A todos los que de una forma u otra me han puesto en el camino de la investigación, mis amplificadores. A Beatriz Rodríguez, por animarme a hacer el curso avanzado de metodología de la investigación durante la formación MIR. A Íñigo de la Rúa, por haber tendido los puentes que me permitieron rotar con Marta Mosca, una experiencia determinante para todo lo que ha pasado después. A Sagrario Bustabad, quien, sin pretenderlo, condujo mis pasos definitivamente hacia la Reumatología. Gracias por la confianza y las oportunidades, especialmente por la consulta de enfermedades autoinmunes sistémicas. Mucho más que una jefa para mí. Gracias por todo.

A mis amigas, que me acompañan desde hace años, en ocasiones como revulsivo y otras como contrapunto a tanta ciencia, mis reguladores, mis niñas. ¡Larga vida al cuarteto de la ULL, al trío Lalalá y al dúo interinsular de cotorras!

A todas las personas cuya participación ha sido indispensable para llevar a cabo este proyecto. A los pacientes con lupus, diana inequívoca de nuestros esfuerzos. A mi compañero Juan Carlos Quevedo, valioso proveedor de zimógenos. A Federico Díaz, por todas las facilidades. Gracias por el mecenazgo y el compromiso férreo con la investigación en Reumatología, ahora y siempre. A Iván Ferraz, elemento pleiotrópico donde los haya, a la vez opsonina, anafilotoxina y convertasa. Mucho más que mi director de tesis, mi mentor. Gracias por tu entusiasmo, tu paciencia impaciente y tu insaciable hambre de ciencia. Gracias por haber estado ahí para mis inquietudes investigadoras siempre, incluso mucho antes de que este proyecto conjunto empezara. Gracias por tanto.

A Eugenio, mi leal compañero. Mi amigo, mi amante, mi confidente. Mucho más que mi complemento. Mi otra mitad.

Abreviaturas

ACAT	acil-coenzima A acetiltransferasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AH50	test hemolítico tradicional de la vía alternativa sobre eritrocitos de conejo
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
BODIPY	difluoruro de boro dipirrometeno (borondipyrromethene)
BSA	albúmina de suero bovino
C1-inh	inhibidor de C1
CH50	test hemolítico tradicional de la vía clásica sobre eritrocitos de carnero
ELISA	ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (enzyme linked immunosorbent assay)
ENA	anticuerpos contra dianas nucleares específicas (extractable nuclear antigen)
FBS	suero bovino fetal (fetal bovine serum)
FD	factor D
FH	factor H
HDL	lipoproteína de alta densidad (high-density lipoprotein)
HOMA	modelo de evaluación de la homeostasis (homeostatic model assessment)
HOMA2-%B	índice de función de la célula beta pancreática del instrumento HOMA2
HOMA2-%S	índice de sensibilidad a la insulina del instrumento HOMA2
HOMA2-IR	índice de resistencia a la insulina del instrumento HOMA2
IFN	interferón
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
LDL	lipoproteína de baja densidad (low-density lipoprotein)
LES	lupus eritematoso sistémico
MASP	proteasas de serina asociadas a MBL (MBL associated serine proteases)
MBL	lectina unida a manosa (mannan binding lectin)
MEM-HEPES	Minimum Essential Medium Eagle
NCEP/ATP III	National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III
NET	trampas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps)
PCR	proteína C reactiva
RIC	rango intercuartil
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDI	SLICC/ACR Damage Index
SLEDAI-2K	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index -2000
TLR	receptores tipo Toll (Toll-like receptors)
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor)



Índice

Agradecimientos	i
Abreviaturas	iii
Índice	v
I. Introducción	1
a. Mecanismos de actividad y daño en el lupus eritematoso sistémico	2
b. Enfermedad cardiovascular y lupus eritematoso sistémico	3
c. Generalidades sobre el sistema del complemento	6
d. El complemento en el lupus eritematoso sistémico	9
II. Hipótesis	13
III. Objetivos	15
IV. Material y métodos	17
a. Sujetos	18
b. Adquisición de datos y variables	19
1. Lupus eritematoso sistémico	19
2. Sistema del complemento	20
3. Resistencia a la insulina	21
4. Perfil lipídico	22
c. Análisis estadístico	24
d. Aspectos éticos	25

V. Resultados	26
Análisis integral de las tres vías del complemento en pacientes con lupus eritematoso sistémico	27
a. Datos relativos al lupus eritematoso sistémico y al sistema del complemento	27
b. Relación del complemento con los índices de actividad, daño y gravedad del LES	31
c. Relación de los diferentes ítems del SLEDAI-2K y del SDI con el complemento	33
d. Relación del perfil de autoanticuerpos con el sistema del complemento	35
El sistema del complemento se relaciona con la resistencia a la insulina en el lupus eritematoso sistémico	38
a. Características clínicas y datos de laboratorio de la cohorte	38
b. Asociación del complemento con los índices de resistencia a la insulina	41
c. Diferencias en el complemento en pacientes con y sin síndrome metabólico	43
El complemento y la capacidad de transferencia de colesterol están relacionados en el lupus eritematoso sistémico	46
a. Características clínicas y datos de laboratorio de la cohorte	46
b. Asociación de la transferencia de colesterol con el LES y sus comorbilidades	48
c. Relación entre el sistema del complemento y el perfil lipídico	48
d. Asociación del complemento con la capacidad de transferencia de colesterol	49
VI. Discusión	51
Análisis integral de las tres vías del complemento en pacientes con lupus eritematoso sistémico	52
El sistema del complemento se relaciona con la resistencia a la insulina en el lupus eritematoso sistémico	58
El complemento y la capacidad de transferencia de colesterol están relacionados en el lupus eritematoso sistémico	64
VII. Conclusiones	69
VIII. Bibliografía	71

Full characterization of the three pathways of the complement system in patients with systemic lupus erythematosus.

Front Immunol (2023) 14:1167055

PMID: 37153614

doi: 10.3389/fimmu.2023.1167055

The complement system is linked to insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus.

Clin Exp Rheumatol (2024) 42(1):115-121

PMID: 37706313

doi:10.55563/clinexprheumatol/t2k0hn

HDL Cholesterol Efflux and the Complement System Are Linked in Systemic Lupus Erythematosus.

J Clin Med (2023) 20;12(16):5405

PMID: 37629447

doi: 10.3390/jcm12165405

I. Introducción

Introducción

a. Mecanismos de actividad y daño en el lupus eritematoso sistémico

El LES es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune muy heterogénea, con una alta variabilidad interindividual, tanto en su forma de presentación clínica como en su evolución y pronóstico. Se caracteriza fundamentalmente por la presencia de autoanticuerpos (anticuerpos dirigidos contra antígenos propios), la formación de inmunocomplejos, y su potencial para afectar prácticamente a cualquier órgano. Suele cursar con brotes de actividad seguidos de períodos de remisión y no es infrecuente el acúmulo de daño orgánico irreversible.

Su etiología aún se desconoce, pero se sabe que están implicados factores genéticos y ambientales que alteran tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, produciendo una pérdida de la tolerancia inmunológica. La disfunción en los elementos celulares y humorales del sistema inmunitario innato implica mecanismos deficitarios en la fagocitosis y la eliminación de los inmunocomplejos y una hiperproducción de IFN-I. En este contexto, en situaciones de muerte celular (apoptosis, NETosis, necrosis, etc.) se acumulan antígenos propios, generalmente de origen nuclear, que son presentados a los linfocitos T. Además, existe una regulación linfocitaria aberrante, con menor representación de las poblaciones T reguladoras y T supresoras, y con una diferenciación alterada de las células B. Todo ello conduce a la perpetuación de clonas productoras de autoanticuerpos, cuya presencia es clave en la fisiopatología del LES.¹

Estos autoanticuerpos median gran parte de las lesiones propias de la enfermedad, típicamente a través de la formación de inmunocomplejos que activan la cascada del complemento generando inflamación tisular. Las manifestaciones clínicas por lo general son múltiples y muy diversas, en función de los órganos afectados, si bien en un mismo individuo tiende a repetirse el patrón de afectación en cada brote de actividad. Cuando la actividad inflamatoria es intensa y/o prolongada en el tiempo, produce secuelas irreversibles que se traducen en daño orgánico. Además del daño derivado de la actividad, existe daño secundario a la toxicidad de los tratamientos y a otras comorbilidades. En este sentido, una de las comorbilidades más relevantes en el LES es la enfermedad cardiovascular, que es más frecuente y precoz que en la población general, y que, desde hace años, ha desplazado a las infecciones como una de las principales causas de muerte. Los mecanismos que conducen a la aterosclerosis en el LES trascienden los factores de riesgo cardiovascular clásicos, y no han sido del todo aclarados aún.²

El mejor conocimiento de los procesos fisiopatológicos que subyacen en las distintas formas de expresión de esta enfermedad autoinmune, tanto durante sus fases de actividad como de daño, permitiría identificar a aquellos pacientes en riesgo de desarrollar determinadas manifestaciones clínicas y/o comorbilidades y, con ello, prevenir sus desenlaces.

b. Enfermedad cardiovascular y lupus eritematoso sistémico

Desde hace décadas, la enfermedad cardiovascular se considera el resultado de una situación inflamatoria crónica que conduce a la iniciación, formación y eventual ruptura de placas de aterosclerosis. Esta enfermedad comparte con el LES circuitos de inflamación tisular

que implican al IFN-I, fenómenos de NETosis, regulación aberrante de células T, señalización a través de TLR y aparición de anticuerpos contra antígenos propios.³ Sin embargo, existen algunas diferencias notables entre la población general y los pacientes con LES que conviene destacar. Por un lado, el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, tanto clínica como subclínica, es considerablemente mayor en el LES, y esta mayor predisposición persiste incluso tras omitir la contribución de los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Además, esta forma de aterosclerosis se manifiesta desde etapas muy iniciales de la enfermedad autoinmune, que afecta predominantemente a mujeres jóvenes. Por último, la expresión de citocinas proinflamatorias en el LES no es tan marcada como en otras poblaciones con enfermedad cardiovascular precoz.¹

La disfunción endotelial es uno de los fenómenos iniciales en el desarrollo de la aterosclerosis y a ella contribuye la resistencia a la insulina. Esta resistencia podría definirse como la disminución de la capacidad de la insulina para estimular la captación de glucosa por parte del músculo estriado y los adipocitos, y de inhibir la expresión de enzimas gluconeogénicas en el hígado y la lipólisis en el tejido adiposo. Las causas que conducen a la aparición de la resistencia a la insulina son muy diversas, y se han agrupado en el llamado síndrome metabólico, que se ha asociado a su vez con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y de enfermedad cardiovascular, tanto en el LES como en población general, sobre todo en mujeres.⁴ Sin embargo, la contribución de la obesidad troncular a la aparición de la resistencia a la insulina en los pacientes con LES parece menos determinante que en la población general. Además, paradójicamente, la resistencia a la insulina en estos pacientes se acompaña de valores séricos altos del péptido C, un marcador de la función secretora de la célula beta pancreática. Estas evidencias apuntan a la existencia de mecanismos diferentes, aparte de la

inflamación crónica y el estrés oxidativo originados en el tejido adiposo, que explicarían la resistencia a la insulina en el LES.⁵

Por otra parte, en los pacientes con LES, las alteraciones del perfil lipídico resultan también intrigantes. Aunque en la mayoría de los casos existe un balance claramente proaterogénico (con niveles bajos de colesterol HDL y altos de LDL, triglicéridos y apolipoproteína B), incluso cuando este balance no está alterado, subyacen anomalías en el tamaño, carga y composición de las lipoproteínas que resultan deletéreas. Concretamente, las moléculas de HDL de estos pacientes tienen mermada su capacidad para captar el colesterol de los tejidos periféricos y redirigirlo al hígado para su eliminación vía biliar. Este fenómeno, conocido como flujo reverso de colesterol, es crucial en el metabolismo de los lípidos, y puede evaluarse *ex vivo* mediante una prueba funcional. Esta prueba, denominada capacidad de transferencia de colesterol, cuantifica la capacidad de las moléculas de HDL del plasma del individuo para captar el colesterol efluído desde una célula donante. Se ha demostrado, tanto en población general como en LES, que esta capacidad de transferencia de colesterol es un marcador subrogado de enfermedad cardiovascular, y que es independiente del balance sérico de lipoproteínas.³

En definitiva, se sospecha que en la enfermedad cardiovascular del LES están implicados factores de riesgo adicionales cuyos mecanismos etiopatogénicos son distintos de los infligidos por los factores de riesgo cardiovascular clásicos, y que justifican la particular forma de aterosclerosis precoz y acelerada que sufren estos pacientes. Las alteraciones metabólicas y la inflamación vascular inducidas por mecanismos autoinmunes se han postulado como algunos de estos posibles factores de riesgo cardiovascular adicionales.⁴ El sistema del complemento podría mediar en estas alteraciones autoinmunes vasculares y metabólicas. Aunque su papel en la enfermedad cardiovascular de los pacientes con LES no ha sido suficientemente

estudiado aún, el complemento se ha vinculado con la enfermedad cardiovascular en la población general, incluso en fases subclínicas de la misma. Además, últimamente se ha demostrado que también está implicado en el desarrollo de las dos formas de diabetes mellitus, y que se relaciona con el síndrome metabólico y con algunas de las comorbilidades que lo integran.^{6,7}

c. Generalidades sobre el sistema del complemento

El sistema del complemento es un sistema biológico ancestral muy complejo implicado en la defensa y homeostasis del organismo a través de mecanismos de opsonización, fagocitosis, lisis celular directa e inducción de respuestas inflamatorias mediante anafilotoxinas. Inicialmente se descubrió como una parte del sistema inmunitario innato encargada de “complementar” (de ahí su nombre) a la acción del sistema inmunitario adaptativo en las respuestas mediadas por anticuerpos. Sin embargo, actualmente se sabe que sus funciones son mucho más complejas y lo vinculan con otros procesos biológicos fundamentales como la coagulación, la señalización intracelular a través de TLR, la presentación celular de antígenos y la eliminación de componentes moleculares extraños y/o dañados.⁸

Está integrado por más de 50 proteínas en total, tanto plasmáticas como de membrana, que se organizan en tres vías diferentes en función de cuál sea el detonante de la activación de la cascada del complemento. Estas vías se conocen como vía clásica, vía de las lectinas y vía alternativa, y confluyen en una vía terminal común. La mayoría de sus moléculas séricas se producen en el hígado, con la salvedad de la proteína inactiva C1q y el factor D, cuyas fuentes mayoritarias son los monocitos y los adipocitos, respectivamente.⁸

La activación de la vía clásica se inicia habitualmente por anticuerpos, aunque también puede desencadenarse en presencia de PCR y de cuerpos apoptóticos. Al unirse C1q a cualquiera de estas dianas, el complejo inactivo C1 (formado por un hexámero de C1q y un tetrámero integrado por dos moléculas de C1r y dos de C1s) sufre un cambio conformacional que activa a las proteasas C1r y C1s, lo que conlleva la activación global del complejo proteico. La vía de las lectinas emula a la vía clásica mediante un complejo estructural y funcionalmente muy similar al de C1. En este caso, el detonante son residuos de hidratos de carbono exclusivos de patógenos, el equivalente a C1q son las proteínas ficolina o lectina unida a manosa (MBL), y los equivalentes al tetrámero conformado por C1r y C1s son proteasas de serina asociadas a MBL (MASP). Una vez activados, ambos complejos, C1 y MBL-MASP, escinden C4 y C2 en sus proteínas activas (C4a, C4b y C2a, C2b, respectivamente) formando la convertasa de C3 de la vía clásica y de las lectinas (C4b2b). En contraposición, la vía alternativa se encuentra activada de forma basal por un mecanismo de hidrólisis constitutiva del C3 plasmático denominado "tick over". Esta hidrólisis genera pequeñas cantidades de las proteínas activas C3a y C3_{H2O}. C3_{H2O} se une al factor B, que es activado por el factor D, escindiéndose en los fragmentos proteicos Ba y Bb. Este fragmento Bb tiene a su vez actividad proteolítica sobre C3, generando C3b, que junto con Bb forman la convertasa de la vía alternativa (C3bBb). Esta convertasa es poco eficiente en sustrato líquido, por lo que, en condiciones fisiológicas, todo este proceso es rápidamente neutralizado a través de los reguladores solubles. No obstante, en presencia de superficies celulares extrañas o dañadas, la convertasa se genera sobre estos sustratos sólidos, donde es estabilizada por la properdina, lo que aumenta considerablemente su rendimiento.⁸

Con independencia de cuál haya sido la vía inicialmente activada, el C3b generado en el medio ejerce una retroalimentación positiva sobre la vía alternativa (asa amplificadora) y conduce a la producción exponencial de más C3b. Cuando alcanza concentraciones suficientes, C3b acaba uniéndose a la convertasa de C3 para dar lugar a la convertasa de C5 (C4b2b3b en las vías clásica y de las lectinas, C3bBbC3b en la vía alternativa). A partir de ese momento se inicia la vía lítica terminal común. C5 es escindido en sus dos fracciones activas, la anafilotoxina C5a y la proteína C5b. C5b se une a C6 y después a C7, formando un trímero lipofílico capaz de insertarse en las membranas celulares. Sobre este trímero insertado en la bicapa lipídica se ensambla C8, que a su vez se une a múltiples moléculas de C9 formando el complejo de ataque a membrana (C5b-9). En última instancia, estos complejos actúan como poros transmembrana que conducen a la lisis osmótica de las células.⁸

Debido a su potencial devastador en caso de actividad descontrolada, el sistema del complemento se encuentra estrechamente regulado en los tres puntos críticos de la cascada: iniciación o activación, amplificación y formación de convertasas, y generación de complejos de ataque a membrana. Entre sus reguladores séricos destaca C1-inh, una proteasa de serina que evita la activación tanto de la vía clásica como de la vía de las lectinas. Este inhibidor interacciona con las moléculas C1r y C1s o MASP-1 y MASP-2, respectivamente, bloqueándolas de manera irreversible. Ejerce además funciones reguladoras sobre otros procesos muy ligados a la inflamación, como la cascada de la coagulación y la vía de las cininas. El factor H, por el contrario, es el principal regulador del proceso de amplificación y formación de convertasas en el suero. Por un lado, facilita la inactivación de C3b por el factor I, y por otro, acelera la desintegración de las convertasas de C3 a través de la eliminación de Bb.⁸

Del balance global entre reguladores y potenciadores del sistema del complemento dependerá su adecuado funcionamiento en la defensa y homeostasis del organismo. Situaciones funcionalmente deficitarias facilitan el desarrollo de infecciones y de enfermedades autoinmunes, mientras que situaciones de hiperactividad conllevan riesgo de otras enfermedades cuyo denominador común es la inflamación.

d. El complemento en el lupus eritematoso sistémico

El papel del sistema del complemento en el LES es dual y hasta cierto punto paradójico. Por un lado, se sabe que una pérdida de función en este sistema repercute en la capacidad para eliminar de forma eficiente los detritus celulares. Esta disfunción favorece la exposición de autoantígenos y la pérdida de tolerancia, ambos factores clave en la etiopatogenia de la enfermedad. Por otro lado, un aumento de función se traduce en una actividad desproporcionada del sistema del complemento, que es uno de los mecanismos principales de la inflamación y el daño tisular en el LES.⁹

Se ha descrito un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad asociado a mutaciones en los genes del complemento, especialmente en aquéllos relacionados con las moléculas de la vía clásica. Muchas de estas moléculas, entre las que destacan C1q y C4b, ejercen como opsoninas, facilitando el reconocimiento y la eliminación de células apoptóticas, NET e inmunocomplejos circulantes. Además, se ha demostrado que la presencia de C1q asociada a estas estructuras regula a la baja la expresión de IFN- α . Por otro lado, las proteínas de la vía clásica son fundamentales en el proceso de selección negativa de las células B, tanto en la fase de presentación y reconocimiento de antígenos como en la posterior inducción de anergia

sobre las clonas autorreactivas mediada por C4. Para el éxito de ambos procesos es necesaria además una adecuada expresión de CR2 (receptor 2 del complemento) en la célula B. En cuanto a la vía alternativa, las mutaciones del gen de C3 no se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, mientras que las que implican una pérdida de función del factor H parecen aumentar el riesgo de nefritis lúpica.¹⁰

Independientemente de los mecanismos etiopatogénicos que lo hayan puesto en marcha, una vez que el LES se ha establecido, la actividad desproporcionada de la cascada del complemento pasa a ser el elemento central en la fisiopatología de la enfermedad. Las anafilotoxinas C3a y C5a ejercen un papel crucial sobre la célula T, propiciando una señalización incontrolada a través de TLR que culmina en una producción desmedida de citocinas proinflamatorias. Además, los fragmentos activos del complemento interactúan con neutrófilos y plaquetas, induciendo más NETosis y mayor agregación y adhesión plaquetaria al endotelio, con la consiguiente retroalimentación positiva de todos los procesos inflamatorios.⁹ En algunos pacientes se generan autoanticuerpos que empeoran aún más la situación, perpetuando la activación de la cascada del complemento. En función de cuál sea la diana contra la que están dirigidos, estos anticuerpos pueden reducir la capacidad de eliminación de los detritus celulares (anti-C1q, anti-MBL), inhibir los mecanismos de regulación (anti-C1-inh, anti-FH, anti-C3b) o, más raramente, potenciar la actividad de las convertasas (anti-C3 y anti-C4, los llamados factores nefríticos).¹¹

La importancia del complemento en la fisiopatología del LES se hace patente en las biopsias de los tejidos afectados por la enfermedad, concretamente en la piel y en el riñón. Un hallazgo prácticamente patognomónico de esta entidad es el patrón “full house” en la inmunofluorescencia directa. Este patrón consiste en el depósito de inmunoglobulinas (G, A y

M) y diversas proteínas del complemento (C1q, C4, C3 y C5b-9) sobre sus dianas tisulares (la unión dermoepidérmica, y el mesangio y la membrana basal glomerular, respectivamente).¹¹ Por otra parte, la hipocomplementemia (valores bajos de los niveles séricos de C3, C4 o de CH50) se considera un hallazgo de laboratorio típico del LES que en la mayoría de los casos refleja activación por inmunocomplejos, ya sean circulantes (vía clásica) o generados in situ (vía alternativa). En este escenario, la activación masiva de la cascada del complemento conduce a un consumo acelerado de sus moléculas plasmáticas que excede la capacidad de síntesis de las mismas y deriva en la disminución de sus niveles en sangre. De esta forma, valores bajos de las proteínas séricas del complemento tienden a correlacionarse con variantes más graves de la enfermedad (concretamente de LES renal) y con la expresión de anticuerpos anti-ADN nativo, mientras que su regreso a valores normales se interpreta como un signo de buen pronóstico y de buena respuesta al tratamiento.¹²

No obstante, la evaluación habitual del sistema del complemento en el LES en la práctica clínica suele limitarse a la determinación de los precursores enzimáticos inactivos (zimógenos) C3 y C4, sin valorar la presencia simultánea de moléculas activas y reguladoras, ni el estado global de cada vía mediante pruebas funcionales. Dado que el consumo de las proteínas del complemento por activación plasmática de la cascada es solo uno de los factores que condiciona los niveles séricos de las mismas, el hallazgo aislado de niveles bajos de C3 y/o C4 no debería considerarse en sí mismo un marcador subrogado de actividad del LES. De hecho, no es infrecuente encontrar pacientes con hipocomplementemia persistente independientemente del estado de actividad de la enfermedad, o pacientes con valores normales de C3 y C4 pese a actividad renal evidente.^{12,13} Conviene recordar que la mayoría de las proteínas inactivas del complemento se comportan como reactantes de fase aguda, con lo

que sus valores séricos aumentan en situaciones de inflamación. Por otra parte, aunque la deficiencia completa del zimógeno C4 es muy rara, las variaciones en el número de copias de los genes que codifican esta proteína (C4A y C4B) son muy habituales, con oscilaciones de entre 1 a 4 copias de cada gen, lo que impacta en los niveles plasmáticos de la proteína y en el riesgo de desarrollar LES (mayor riesgo cuantas menos copias).⁹

La literatura médica disponible hasta la fecha no recoge estudios en los que se haya caracterizado de forma amplia el sistema del complemento en el LES, a través de la medición de sus moléculas inactivas, activadas y pruebas funcionales de manera simultánea. Además, la mayoría de los trabajos realizados se han centrado en el análisis del complemento como marcador diagnóstico y de vigilancia de la actividad de la enfermedad,¹⁴ mientras que su capacidad para diferenciar formas de expresión clínica y comorbilidades concretas, como la enfermedad cardiovascular, no ha sido tan explorada.

El mejor conocimiento de los patrones de déficit y actividad del complemento en los pacientes con LES podría permitir identificar subgrupos biológicos asociados a estas variantes clínicas y pronósticas, y la identificación precoz de estos subgrupos posibilitaría diseñar estrategias de seguimiento y tratamiento adaptadas a cada perfil de riesgo.

II. Hipótesis

Hipótesis

1. Las moléculas que integran el sistema del complemento se relacionan con la expresión clínica y serológica del lupus eritematoso sistémico, tanto con sus medidas de actividad y daño como con su perfil de autoanticuerpos. Esta relación depende del estado de actividad de las tres vías del complemento (clásica, de las lectinas y alternativa), y no solo de los valores séricos de sus zimógenos inactivos.
2. Las moléculas que integran el sistema del complemento se asocian con marcadores subrogados de enfermedad cardiovascular en el lupus eritematoso sistémico, como la resistencia a la insulina y las alteraciones del perfil lipídico y de la capacidad de transferencia de colesterol. Esta asociación entre las moléculas del complemento y estos marcadores subrogados de enfermedad cardiovascular es independiente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos.

III. Objetivos

Objetivos

1. Analizar el patrón de relación entre el sistema del complemento (evaluado a través de pruebas funcionales y niveles séricos de moléculas inactivas, activadas y reguladoras) y las distintas formas de presentación del lupus eritematoso sistémico (estimadas mediante índices de actividad y daño y perfil de autoanticuerpos).
2. Analizar si existe una asociación independiente entre el sistema del complemento sérico y la resistencia a la insulina (estimada a través del instrumento HOMA2 y la presencia de síndrome metabólico) en pacientes con lupus eritematoso sistémico.
3. Analizar si existe una asociación independiente entre el sistema del complemento sérico y el metabolismo de los lípidos (estimado a través del perfil lipídico y la capacidad de transferencia de colesterol) en pacientes con lupus eritematoso sistémico.

IV. Material y métodos

Material y métodos

a. Sujetos

En este estudio transversal se seleccionaron pacientes con LES que acudieron a revisión en consultas externas de Reumatología del Hospital Universitario de Canarias y del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín entre el año 2016 y 2021.

Los pacientes incluidos debían tener al menos 18 años, haber sido diagnosticados por un reumatólogo experimentado y cumplir los criterios de clasificación del American College of Rheumatology.¹⁵ Se excluyeron aquéllos con antecedentes de cáncer que hubieran recibido quimio y/o radioterapia y/o que llevaran menos de 5 años en remisión libre de enfermedad. También se excluyeron los casos de insuficiencia hepática y/o renal crónica avanzadas, infección activa, y/o cualquier otra enfermedad autoinmune sistémica distinta del síndrome antifosfolípido y/o el síndrome de Sjögren.

De los 284 pacientes incluidos, aquéllos con diagnóstico previo de diabetes mellitus, glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dl o tratamiento con fármacos hipoglucemiantes y/o insulina fueron excluidos del estudio sobre la resistencia a la insulina, por lo que no se les determinaron los índices relacionados con la misma. Por otra parte, aquéllos con enfermedades y/o fármacos distintos de las estatinas que pudieran influir en los niveles plasmáticos de los lípidos se excluyeron del estudio del perfil lipídico.

b. Adquisición de datos y variables

Las diferentes variables se recogieron a través de entrevista presencial y revisión de la historia clínica. En dicha entrevista se comprobaba la medicación vigente y se realizaban anamnesis y exploración física dirigidas a las variables de interés, así como extracción de sangre.

1. Lupus eritematoso sistémico

El estado de actividad y de daño de la enfermedad se evaluó mediante los instrumentos Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index -2000 (SLEDAI-2K)¹⁶ y Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI),¹⁷ respectivamente. De forma similar a lo aplicado por otros autores, para las puntuaciones del SLEDAI-2K se establecieron las siguientes categorías: inactividad (0 puntos), actividad leve (1-5 puntos), actividad moderada (6-10 puntos), actividad alta (11-19 puntos) y actividad muy alta (≥ 20 puntos).¹⁸ La gravedad de la enfermedad se valoró a través del índice Katz.¹⁹

El perfil de autoanticuerpos se determinó mediante la revisión de los datos del laboratorio de Inmunología, donde se habían empleado técnicas de inmunoensayo lineal multiparamétrico para la detección de los ENA y ELISA para los anticuerpos anti-ADN, anti-cardiolipina y anti-beta2glicoproteína. El test del anticoagulante lúpico se había realizado en el laboratorio de Hematología de acuerdo con procedimientos internacionales estandarizados en tres pasos consecutivos (cribado, mezcla y confirmación), con dos

activadores de la coagulación diferentes (Russell y Silica).²⁰ Para la definición de síndrome antifosfolípido se aplicaron los criterios de clasificación de Sydney de 2006.²¹

2. Sistema del complemento

Se obtuvieron muestras de suero en ayunas que fueron congeladas a -80°C. Los niveles plasmáticos de las proteínas inactivas C1q, C4, C2 y C3, así como del producto activado C3a se determinaron mediante turbidimetría (Roche), los de C1-inh mediante nefelometría (Siemens) y los de los factores D y H mediante ELISA (Duoset, R&D).

Se emplearon además pruebas funcionales de nueva generación de las tres vías (SVAR Wieslab®, Suecia). Esta técnica se basa en los principios de las pruebas funcionales hemolíticas clásicas, y consiste en determinar la cantidad de complejo de ataque de membrana (C5b-9) que resulta de la activación de una determinada vía del complemento ex vivo. Para ello, se cubren pocillos de microtitulación con los activadores específicos de la vía que se quiera analizar, se diluye el suero del paciente con un diluyente que contenga un bloqueante del resto de las vías, y se incuba en los pocillos. La activación resultante de la vía analizada conlleva la aparición en el medio de C5b-9. Posteriormente se lavan los pocillos, se añade un anticuerpo específico marcado con fosfatasa alcalina dirigido contra el neoantígeno de C5b-9, y se incuba de nuevo. Tras un lavado adicional, los inmunocomplejos neoantígeno-anticuerpo resultantes se detectan mediante turbidimetría, de manera que la cantidad de neoantígeno generado correlaciona con la intensidad del color, y se mide en términos de absorbancia (densidad óptica). El resultado se expresa semi-cuantitativamente mediante un cociente entre la muestra analizada y un control. Wieslab® ha validado estos ensayos funcionales y estudiado su correlación y

concordancia con los ensayos hemolíticos clásicos CH50 y AH50 (<https://www.svarlifescience.com/> último acceso el 22/04/2024). De la misma forma en que se interpretan los ensayos hemolíticos, el hallazgo de valores bajos en los ensayos SVAR denota activación del complemento in vivo.

Los coeficientes de variación intra e interensayo de todas las técnicas utilizadas para el estudio del complemento fueron inferiores al 10%.

3. Resistencia a la insulina

Se evaluó mediante la herramienta HOMA y la definición de síndrome metabólico.

El instrumento matemático HOMA permite estimar la sensibilidad a la insulina y la función de la célula beta pancreática a partir de muestras emparejadas de glucosa plasmática e insulina o péptido C. Se utilizó concretamente la versión informática actualizada HOMA2.²² Para estimar la sensibilidad a la insulina, el modelo se basa en el consumo de glucosa en respuesta a la concentración de la hormona, y arroja un valor expresado como HOMA2-S% donde 100% es el valor normal. La resistencia a la insulina se define como el recíproco de ese valor y se expresa como HOMA2-IR. Para la estimación de la función de la célula beta se basa en las concentraciones del péptido C, que es un marcador pancreático de secreción de insulina. Su resultado se expresa como HOMA2-B%-péptido C. Las concentraciones de insulina y péptido C se midieron con ensayos inmunométricos quimioluminiscentes (Architect Abbott 2000I e Immulite 2000 Siemens, respectivamente).

La presencia de síndrome metabólico se estableció en función de los criterios del National Cholesterol Education Program (NCEP/ATPIII).²³ Según esta definición, existe síndrome metabólico cuando se reúnen al menos tres de los siguientes cinco criterios: perímetro en cintura mayor de 102 cm en hombres u 88 cm en mujeres; presión arterial mayor de 130/85 mmHg; trigliceridemia en ayunas mayor de 150 mg/dl; niveles de colesterol HDL en ayunas menores de 40 mg/dl en hombres o 50 mg/dl en mujeres; glucemia en ayunas mayor de 100 mg/dl.

4. Perfil lipídico

Se obtuvieron muestras de suero en ayunas que fueron congeladas a -80°C. Los niveles de colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos se determinaron mediante ensayo enzimático colorimétrico (Roche), y las lipoproteínas y la lipoproteína A mediante ensayo inmunoturbidimétrico cuantitativo (Roche). Los niveles de colesterol total oscilaron entre 0,08 y 20,7 mmol/L (coeficiente de variación intraensayo 0,3%), los de triglicéridos entre 4 y 1.000 mg/dL (coeficiente de variación intraensayo 1,8%), y los de colesterol HDL entre 3 y 120 mg/dL (coeficiente de variación intraensayo 0,9%). El índice aterogénico se estimó con el índice de Castelli (colesterol total/colesterol HDL) y los niveles de colesterol LDL (low-density lipoprotein) con la fórmula de Friedewald (colesterol total - colesterol HDL + triglicéridos/5)).

La capacidad de transferencia de colesterol se evaluó utilizando un análogo de colesterol marcado con la sustancia fluorescente BODIPY, siguiendo un procedimiento previamente establecido.²⁴ En primer lugar, se siembran macrófagos de la línea celular J774 en placas de 96 pocillos, con densidad de 7×10^4 células por pocillo. Al día siguiente,

las células se exponen al análogo de colesterol marcado con BODIPY (25 μ M; Avanti Polar Lipids), BSA al 0,2% y 2 μ g/mL del inhibidor de ACAT (Sandoz 58-035, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) en un medio RPMI suplementado con FBS al 1% durante 1 hora. Posteriormente las células se lavan con MEM-HEPES y se incuban durante una noche en medio RPMI libre de suero, suplementado con 0,3 mM de AMPc, BSA al 0,2% y 2 μ g/mL del inhibidor de ACAT. Se vuelven a lavar las células con MEM-HEPES y se incuban durante 4 horas a 37°C en este medio con plasma de los pacientes al 2,8% desprovisto de apolipoproteína B tras precipitación con polietilenglicol, 0,15 mM de AMPc y 2 μ g/mL del inhibidor de ACAT. La cantidad de colesterol BODIPY efluído en el medio se mide directamente con un lector de placas de fluorescencia (Tecan, Trading AG, Männedorf, Suiza), con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 530 nm. La capacidad de transferencia de colesterol se calcula como el cociente entre el colesterol BODIPY efluído y el contenido inicial de colesterol BODIPY en los macrófagos J774.

Cada análisis se realizó por triplicado para cada paciente, y las muestras que excedían el umbral de variación del 7% se volvieron a analizar.

c. Análisis estadístico

Las características clínicas y demográficas se expresan como la media \pm la desviación estándar o como porcentajes en el caso de las variables categóricas. Para las variables continuas con distribución no normal se usan la mediana y el rango intercuartil. Las diferencias entre subgrupos se analizaron con el test de Chi-cuadrado, exacto de Fisher, t-student o U de

Mann-Whitney según se tratara de variables cualitativas o cuantitativas, y su distribución de normalidad.

La relación entre las características del LES y el sistema del complemento se evaluó mediante análisis de regresión lineal univariable. La asociación de la resistencia a la insulina y el perfil lipídico con el sistema del complemento se valoró a través de análisis de regresión multivariable. Para las variables dependientes continuas “índice de resistencia a la insulina” y las derivadas del perfil lipídico se utilizó un modelo de regresión lineal. Para la variable categórica dependiente “síndrome metabólico” se empleó un modelo de regresión logística.

Se consideraron como variables confusoras aquéllas que estaban asociadas significativamente ($p < 0,20$) tanto con las variables dependientes como con las independientes, siempre y cuando no existiera una relación de causalidad. Con el fin de evitar la colinealidad, en el modelo de regresión multivariable para el análisis del perfil lipídico se calculó el factor de inflación de la varianza (> 10 indicativo de colinealidad) y se excluyeron todas las variables derivadas de fórmulas (colesterol LDL, cociente LDL:HDL, colesterol no HDL, cociente apolipoproteína B:apolipoproteína A1, e índice aterogénico).

En todos los análisis se utilizó un nivel de significación del 5% bilateral y se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con software Stata, versión 17/SE (StataCorp, College Station, TX, EE. UU.).

d. Aspectos éticos

La investigación se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki de 2013. El protocolo del estudio fue aprobado por los Comités de Ética Institucional del Hospital Universitario de Canarias y del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, y todos los sujetos proporcionaron consentimiento informado por escrito (Número de Aprobación 2015_84).

V. Resultados



OPEN ACCESS

EDITED BY
Ester Lozano,
University of Barcelona, SpainREVIEWED BY
Takeshi Iwasaki,
Kyoto University, Japan
Giuseppina Arbore,
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy*CORRESPONDENCE
Iván Ferraz-Amaro
iferrazamaro@hotmail.com
Miguel Á. González-Gay
miguelagay@hotmail.com

†These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in ImmunologyRECEIVED 15 February 2023
ACCEPTED 29 March 2023
PUBLISHED 21 April 2023

Full characterization of the three pathways of the complement system in patients with systemic lupus erythematosus

María García-González¹, Fuensanta Gómez-Bernal²,
Juan C. Quevedo-Abeledo³, Yolanda Fernández-Cladera²,
Agustín F. González-Rivero², Antonia de Vera-González²,
Iñigo de la Rúa-Figueroa³, Raquel López-Mejías⁴,
Federico Díaz-González^{1,5}, Miguel Á. González-Gay^{6,7,8,†}
and Iván Ferraz-Amaro^{1,5,†}¹Division of Rheumatology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain, ²Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain, ³Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, ⁴Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación Sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ⁵Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), Tenerife, Spain, ⁶Division of Rheumatology, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IS-FJD), Madrid, Spain, ⁷University of Cantabria, Instituto de Investigación Sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ⁸Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

Análisis integral de las 3 vías del complemento en pacientes con lupus eritematoso sistémico

a. Datos relativos al lupus eritematoso sistémico y al sistema del complemento

En este estudio se incluyeron 284 pacientes con LES. La mayoría eran mujeres (92%) de 50 ± 12 años. La edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad era de 34 ± 13 años, y su duración de 16 ± 10 años. El 67% de los pacientes presentaban anticuerpos anti-ADN y el 69% ENA, de entre los que los anti-SSA eran los más frecuentes (35%). El 32% tenía al menos un anticuerpo antifosfolípido, y el 16% cumplía los criterios de clasificación del síndrome homónimo.

La mayoría de los pacientes se encontraban en las categorías “inactividad” (40%) o “actividad baja” (40%) del SLEDAI-2K, y el 68% tenía daño orgánico establecido según el SDI. En relación con los fármacos en el momento del estudio, el 50% tomaba glucocorticoides a una dosis diaria media equivalente a 5 mg de prednisona (RIC 5-7,5 mg), y el 69% recibía tratamiento con hidroxicloroquina. Otros fármacos menos usados fueron el metotrexato (11%) y la azatioprina (15%).

Las principales características de la cohorte, así como los valores de las pruebas funcionales de las tres vías del complemento (clásica, de las lectinas y alternativa) y la concentración plasmática de sus moléculas individuales (C1q, C2, C4, FD, C3, C3a, C1-inh y FH) se muestran en la **tabla 1.1** (table 1 en *Front Immunol 2023;14:1167055*).

En la **figura 1.1** (supplementary figure 1 en *Front Immunol 2023;14:1167055*) se representa la distribución de frecuencias de las pruebas funcionales para cada una de las vías, donde el eje de abscisas (X) corresponde con los valores de las pruebas, y el de ordenadas (Y) con la frecuencia de pacientes para cada determinado valor. Como puede observarse, el test funcional de la vía clásica sigue una distribución normal, mientras que el de la vía de las lectinas y el de la vía alternativa se encuentran desviados hacia la izquierda.

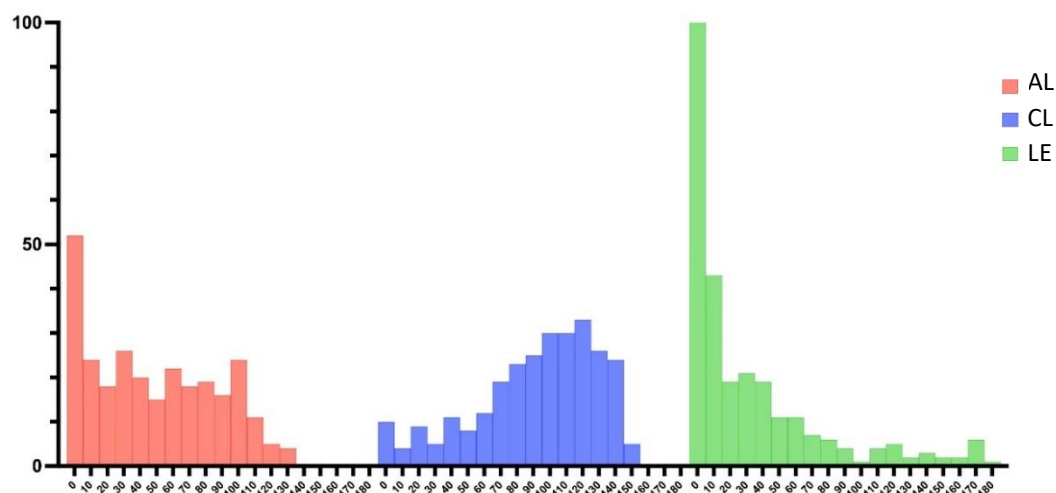


Figura 1.1. Distribución de frecuencias de las pruebas funcionales de nueva generación SVAR Wieslab® de las tres vías del complemento. AL: alternativa; CL: clásica; LE: de las lectinas.

Tabla 1.1. Características basales y del sistema del complemento

	LES (N=284)
Edad, años	50 ± 12
Mujer, n (%)	261 (92)
Fumador, n (%)	69 (24)
Diabetes, n (%)	16 (6)
Hipertensión arterial, n (%)	111 (39)
Obesidad, n (%)	85 (30)
Características del LES	
Edad en el diagnóstico, años	34 ± 13
Duración de la enfermedad, años	16 ± 10
Criterios de clasificación del LES*, n (%)	150 (88)
Síndrome antifosfolípido, n (%)	43 (16)
Perfil de autoanticuerpos	
Anti-ADN, n (%)	151 (67)
ENA, n (%)	164 (69)
Anti-Sm	24 (10)
Anti-ribosoma	13 (9)
Anti-nucleosoma	32 (22)
Anti-histona	22 (15)
Anti-RNP	64 (28)
Anti-SSA/Ro	55 (35)
Anti-SSB/La	36 (21)
Anticuerpos antifosfolípidos, n (%)	61 (32)
Anti-cardiolipina IgM	22 (11)
Anti-cardiolipina IgG	39 (20)
Anti-β2 glicoproteína IgM	19 (10)
Anti-β2 glicoproteína IgG	28 (15)
Índices del LES	
Mediana del SLEDAI-2K	2 (0-4)
Categorías del SLEDAI-2K	
Inactividad, n (%)	109 (40)
Actividad baja, n (%)	107 (40)
Actividad moderada, n (%)	41 (15)
Actividad alta a muy alta, n (%)	14 (5)
Mediana del SDI	1 (0-2)
SDI ≥ 1, n (%)	191 (68)
Mediana del Katz	2 (1-4)
Katz ≥ 3, n (%)	126 (44)
Tratamiento en el momento de la visita	
Glucocorticoides, n (%)	140 (50)
Dosis diaria equivalente de prednisona, mg	5 (5-7,5)
Hidroxicloroquina, n (%)	194 (69)
Metotrexato, n (%)	31 (11)
Azatioprina, n (%)	43 (15)
Micofenolato de mofetil, n (%)	31 (11)
Belimumab, n (%)	8 (3)
Rituximab, n (%)	8 (3)
Características del complemento	
Pruebas funcionales, %	
Vía clásica	91 ± 38
Vía alternativa	41 (12-79)
Vía de las lectinas	10 (1-41)
Moléculas séricas	
C1q, mg/dl	34 ± 11
C2, mg/dl	2,5 ± 1,2
C4, mg/dl	21 ± 12
Factor D, ng/ml	2.593 ± 1.835
C3, mg/dl	130 ± 40
C3a, mg/dl	39 ± 10
C1-inh, mg/dl	32 ± 9
Factor H, ng/ml x10 ⁻³	388 (281 - 564)

Los datos se muestran como medias ± DE o medianas (RIC) cuando no siguen una distribución normal. Categorías del SLEDAI-2K: inactividad: 0 puntos; actividad baja: 1-5 puntos; actividad moderada: 6-10 puntos; actividad alta a muy alta: > 10 puntos.

*Cumplimiento de criterios SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) 2012 y/o EULAR/ACR (European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology) 2019.

C1-inh: inhibidor de C1; ENA: extractable nuclear antibodies; SDI: SLICC/ACR Damage Index; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K: SLE Disease Activity Index.

Las correlaciones entre los ensayos funcionales y las moléculas individuales del complemento se representan mediante diagramas de cuerdas en la **figura 1.2** (supplementary figure 3 en *Front Immunol 2023;14:1167055*). En general, las pruebas funcionales y las moléculas correlacionaban fuerte y positivamente entre sí, salvo los factores D y H, que no mostraron relaciones significativas. Como puede observarse, el mapa de relaciones entre los distintos parámetros del complemento no permite inferir un patrón específico de activación, sino que, en general, todas las moléculas se correlacionan entre sí.

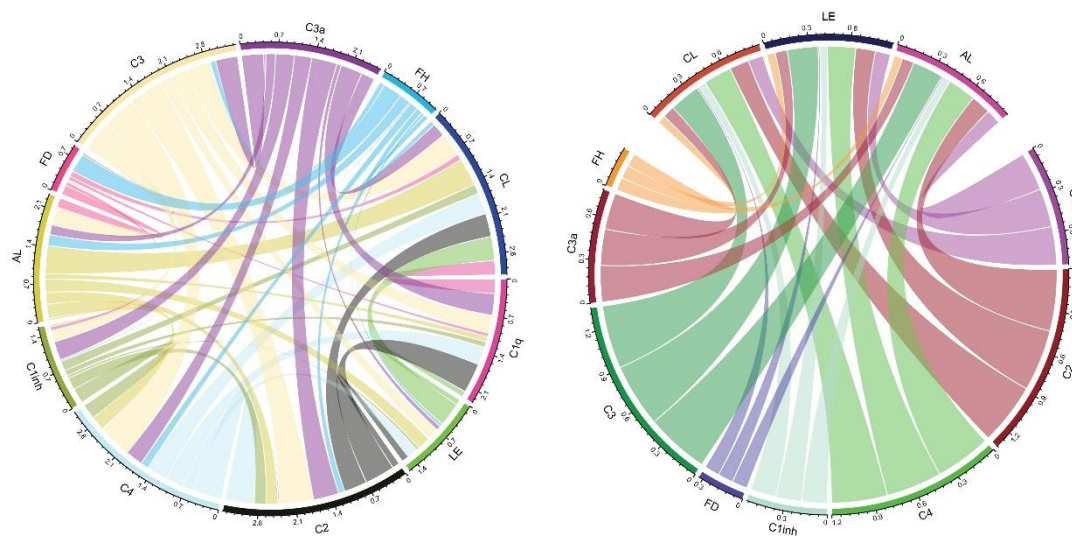


Figura 1.2. Relación de las pruebas funcionales y las moléculas séricas entre sí (izquierda) y de las pruebas funcionales con las moléculas séricas (derecha).

Las relaciones entre los diferentes parámetros se representan con arcos. El ancho de los arcos es proporcional al grado de significación encontrado en la correlación de Spearman (ρ).

AL: prueba funcional de la vía alternativa; CL: prueba funcional de la vía clásica; C1-inh: inhibidor de C1; FD: factor D; FH: factor H; LE: prueba funcional de la vía de las lectinas.

b. Relación del complemento con los índices de actividad, daño y gravedad del LES

La relación entre los ensayos funcionales y las moléculas del complemento con los índices del LES se muestran en la **tabla 1.2** (table 2 en *Front Immunol* 2023;14:1167055). Los índices de actividad, daño y gravedad son la variable independiente y se analizan tanto como variables continuas como categorizadas.

En general, el SLEDAI-2K se relacionó con valores bajos de las moléculas y de las pruebas funcionales del complemento. Concretamente, la relación más fuerte se observó con la proteína inactiva C1q, los zimógenos C2 y C3, y con el test funcional de la vía alternativa, tanto para el SLEDAI-2K continuo como categorizado. Además, usando la categoría “inactividad” como referencia, la categoría “actividad baja” se relacionó con valores más bajos de la proteína activa C3a, mientras que la relación no fue significativa para la categoría “actividad moderada a muy alta”. En contraposición, el FD y las proteínas reguladoras C1-inh y FH no se asociaron con el SLEDAI-2K. Dado que el SLEDAI-2K incluye en su cálculo al complemento, sumando 2 puntos cuando existen niveles bajos de CH50, C3 y/o C4 en plasma, analizamos además la relación del complemento con el SLEDAI-2K clínico, que no incluye parámetros de laboratorio. Cuando se usaba esta versión clínica del SLEDAI-2K la mayoría de las relaciones observadas entre el complemento y la actividad del LES desaparecían. Este índice sólo se relacionó con valores más altos de la proteína inactiva C1q (perteneciente a la vía clásica) y de la molécula activa C3a (común a la activación de las tres vías).

En cuanto al daño, el SDI se relacionó con valores más altos de las pruebas funcionales de las tres vías del complemento y mayores niveles plasmáticos de la proteína inactiva C1q, del zimógeno C2, de C1-inh y de la proteína activa C3a. No se encontró relación entre el daño y

Tabla 1.2. Relación del complemento con los índices de actividad, daño y gravedad del lupus eritematoso sistémico

n	Vía clásica		Vía de las lectinas	Moléculas comunes para las vías clásica y de las lectinas			Vía alternativa		Moléculas comunes para las tres vías			
	Test funcional %	C1q mg/dl	Test funcional %	C2 mg/dl	C4 mg/dl	C1-inh mg/dl	Test funcional %	Factor D ng/ml	C3 mg/dl	C3a mg/dl	Factor H ng/ml x10 ⁻³	
	coeficiente beta (IC 95%)											
SLEDAI-2K												
Inactividad	109	-0,6 (-2 - 0,5) ref.	-0,3 (-0,6 - -0,003) ref.	0,1 (-1 - 1) ref.	-0,05 (-0,08 - -0,02) ref.	-0,3 (-0,7 - 0,01) ref.	0,2 (-0,08 - 0,5) ref.	-2 (-3 - -0,6) ref.	-60 (-123 - 2) ref.	-2 (-3 - -0,5) ref.	0,04 (-0,3 - 0,3) ref.	-22 (-44 - 1) ref.
Actividad baja	107	-15 (-25 - -5)	-3 (-6 - -0,1)	-13 (-25 - -2)	-0,7 (-1,0 - -0,4)	-4 (-8 - -1)	-0,9 (-4 - 2)	-13 (-23 - -3)	-374 (-931 - 184)	-18 (-29 - -7)	-4 (-6 - -0,9)	-23 (-228 - 181)
Actividad moderada a muy alta	55	-13 (-26 - -0,6)	-3 (-7 - 0,2)	-0,8 (-15 - 13)	-0,7 (-1,1 - -0,4)	-7 (-11 - -3)	1 (-2 - 5)	-20 (-33 - -8)	-552 (-1260 - 156)	-27 (-40 - -14)	-1 (-4 - 2)	-236 (-496 - 23)
SLEDAI-2K clínico												
Inactividad	220	0,8 (-2 - 3) ref.	0,5 (-0,2 - 1) ref.	2 (-1 - 5) ref.	0,07 (-0,009 - 0,1) ref.	0,4 (-0,5 - 1) ref.	0,09 (-0,7 - 0,9) ref.	-0,6 (-3 - 2) ref.	-67 (-228 - 93) ref.	2 (-1 - 4) ref.	0,09 (0,2 - 2) ref.	-7 (-66 - 52) ref.
Actividad baja	40	-5 (-18 - 8)	1 (-2 - 5)	4 (-11 - 19)	0,3 (-0,1 - 0,7)	2 (-3 - 6)	1 (-2 - 5)	-10 (-23 - 3)	53 (-720 - 826)	8 (-5 - 22)	0,3 (-3 - 4)	237 (-457 - 519)
Actividad moderada a muy alta	11	10 (-14 - 35)	7 (0,7 - 13)	24 (-3 - 51)	0,5 (-0,3 - 1,2)	4 (-4 - 11)	1 (-6 - 8)	1 (-23 - 25)	-644 (-2063 - 776)	6 (-19 - 32)	11 (4 - 17)	-242 (-761 - 276)
SDI												
SDI ≥ 1 punto	187	5 (3 - 8) 12 (2 - 22)	0,88 (0,03 - 1) 3 (0,2 - 5)	5 (2 - 8) 6 (-5 - 17)	0,09 (0,02 - 0,2) 0,4 (0,1 - 0,7)	0,4 (-0,5 - 1) 2 (-1 - 5)	0,8 (0,1 - 1) 3 (0,7 - 5)	2 (-0,1 - 5) 11 (1 - 20)	108 (-27 - 242) 301 (-204 - 805)	1 (-2 - 4) 9 (-1 - 19)	1 (0,4 - 2) 4 (1 - 6)	5 (-59 - 72) -93 (-337 - 151)
Índice de Katz												
Katz ≥ 3 puntos	122	2 (-1 - 4) 4 (-5 - 13)	-0,2 (-0,8 - 0,4) -2 (-4 - 0,8)	2 (-0,5 - 5) 4 (-6 - 14)	0,0004 (-0,07 - 0,07) -0,1 (-0,4 - 0,1)	0,3 (-0,5 - 1) -1 (-4 - 2)	0,7 (0,1 - 1) 3 (0,6 - 5)	-0,5 (-2 - 2) -5 (-14 - 4)	65 (-56 - 186) 82 (-413 - 577)	-0,4 (-3 - 2) -4 (-14 - 6)	0,02 (-0,6 - 0,6) 1 (-1 - 4)	-16 (-75 - 43) -81 (-32 - 158)

Análisis de regresión lineal univariable. Los parámetros del sistema del complemento actúan como variables dependientes. Para las variables ordinales SLEDAI-2K y SLEDAI-2K clínico, la categoría "inactiva" se toma como nivel de referencia. Los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) se muestran en negrita. Las categorías del SLEDAI-2K se definen como: inactividad: 0 puntos (categoría de referencia); actividad baja: 1-5 puntos; actividad moderada a muy alta: ≥ 6 puntos.

C1-inh: inhibidor de C1; IC: intervalo de confianza; SDI: SLICC/ACR Damage Index; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K: SLE Disease Activity Index

los zimógenos C3 y C4 ni los factores D y H. En general, el índice de Katz no se relacionó con las pruebas funcionales ni las moléculas del complemento. Tan solo se encontró una relación positiva con C1-inh.

c. Relación de los diferentes ítems del SLEDAI-2K y del SDI con el complemento

En las **figuras 1.3 y 1.4** (**figures 1 and 2** en *Front Immunol 2023;14:1167055*) se representan mediante mapas de calor las relaciones entre los diferentes parámetros del SLEDAI-2K y del SDI con las distintas variables del complemento. Analizando estos mapas pueden inferirse algunos patrones de expresión del sistema del complemento en los pacientes con LES.

Respecto del SLEDAI-2K (**figura 1.3**), cabe destacar que el ítem “Anti-ADN nativo” se relacionó negativamente con todas las moléculas y pruebas funcionales del complemento, salvo con la proteína activa C3a y la molécula reguladora C1-inh, cuyas relaciones fueron positivas. Las relaciones negativas más fuertes entre el ítem “anti-ADN nativo” y el complemento se observaron con los parámetros de la vía clásica. El ítem “complemento bajo” (valores bajos de C3 y/o C4) se asoció con valores bajos tanto de las pruebas funcionales como de los zimógenos y de las proteínas reguladoras de las tres vías, pero también de molécula activa C3a. Las relaciones más fuertes se observaron de nuevo con los parámetros de la vía clásica. Los ítems relativos a los dominios cutáneo, articular y renal se asociaron en general con valores altos de la mayoría de las variables del complemento. La relación más fuerte se observó entre la proteína inactiva C1q y la presencia de artritis, mientras que el test funcional de la vía clásica fue el más relacionado con la mayoría de los

ítems del dominio renal. En contraposición, los ítems relativos al dominio hematológico se relacionaron, en general, con valores bajos de los parámetros del complemento. Destaca que el FH sólo se relacionó significativamente con el ítem trombopenia y de manera negativa. Es decir, la presencia de plaquetas bajas se relacionaba con valores también bajos de este regulador.

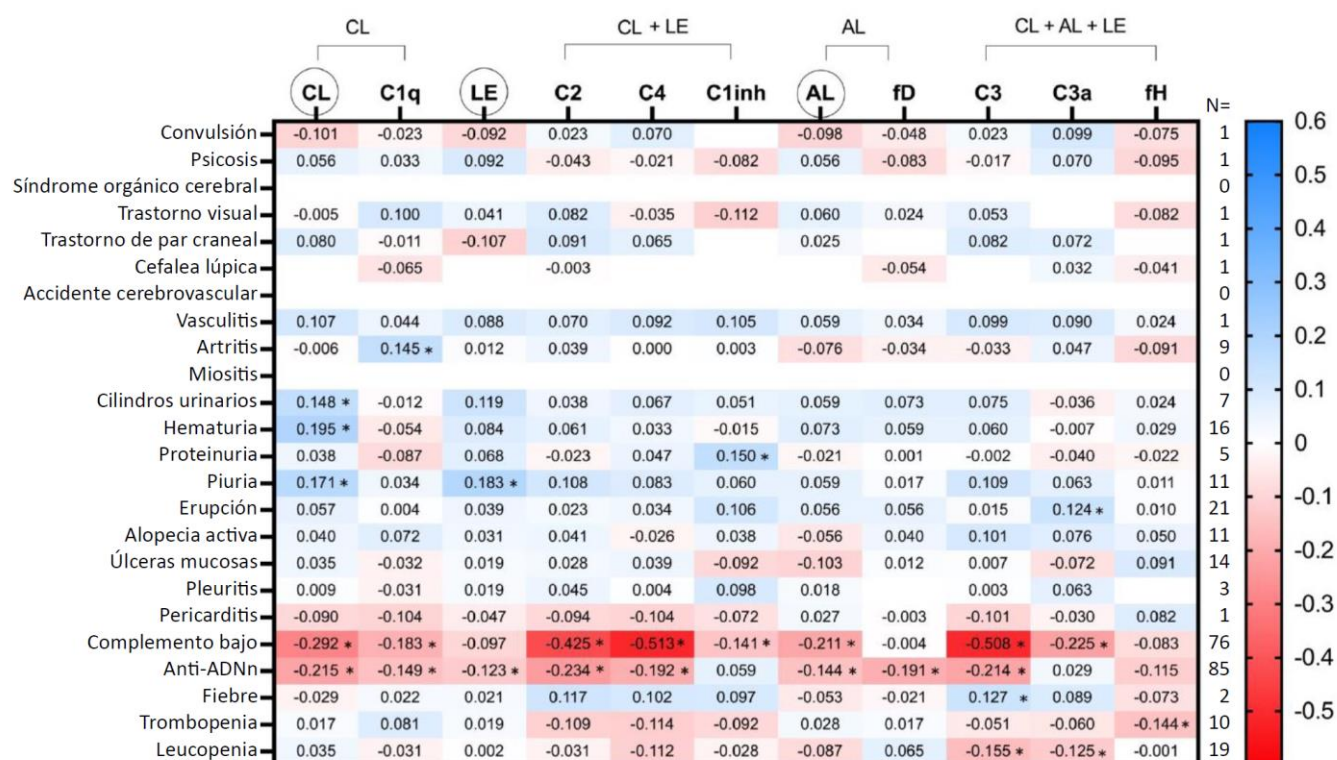


Figura 1.3. Mapa de calor de la relación entre los ítems del SLEDAI-2K y las moléculas séricas y pruebas funcionales del complemento.

Los valores de las celdas representan el coeficiente rho de Spearman (* denota $p < 0,05$). Se muestran las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. El número de pacientes en cada ítem aparece en el margen derecho.

Las pruebas funcionales de cada vía se representan con el nombre de la vía dentro de un círculo. ADNn: ADN nativo; AL: vía alternativa; CL: vía clásica; C1-inh: inhibidor de C1; FD: factor D, FH: factor H; LE: vía de las lectinas.

En la **figura 1.4** se muestra el mapa de calor correspondiente al SDI resumido, con sus diferentes ítems agrupados en 12 dominios. Un vistazo general al mapa revela un predominio de celdas azules, traduciendo por tanto relaciones predominantemente positivas entre los ítems del SDI y el complemento. El dominio que más se relacionó con los

parámetros de la vía clásica fue el neuropsiquiátrico, seguido del renal y del pulmonar, mientras que el más relacionado con la vía alternativa fue el gastrointestinal. Por otra parte, el parámetro del complemento que se relacionó de forma más potente con el dominio cardiovascular fue el FD, mientras que con la diabetes fueron el zimógeno C3 y C1-inh.

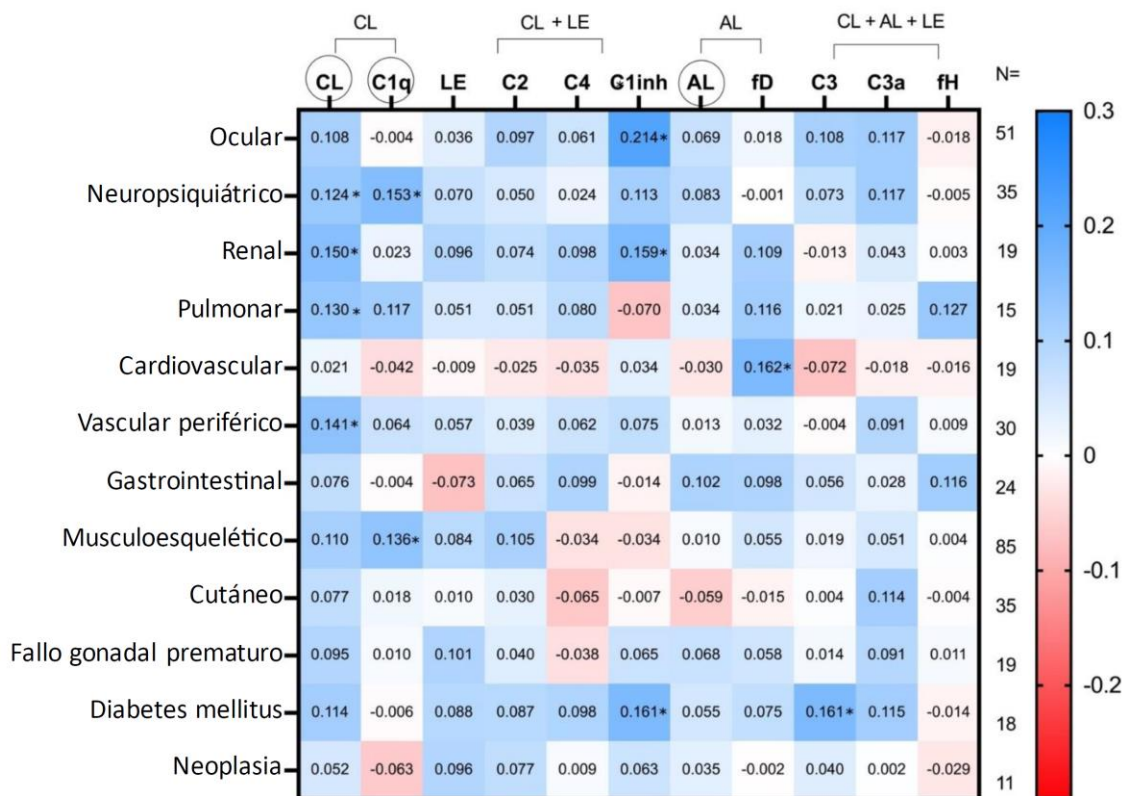


Figura 1.4. Mapa de calor de la relación entre los dominios del SDI y las moléculas séricas y pruebas funcionales del complemento.

Los valores de las celdas representan el coeficiente rho de Spearman (* denota $p < 0,05$). Se muestran las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. El número de pacientes en cada dominio aparece en el margen derecho. Las pruebas funcionales de cada vía se representan con el nombre de la vía dentro de un círculo. AL: vía alternativa; CL: vía clásica; C1-inh: inhibidor de C1; FD: factor D, FH: factor H; LE: vía de las lectinas.

d. Relación del perfil de autoanticuerpos con el sistema del complemento

En la **figura 1.5** (figure 3 en *Front Immunol 2023;14:1167055*) se representa la relación global del complemento con los distintos autoanticuerpos a través de la suma de los coeficientes de correlación de Spearman de cada una de las vías. Los anticuerpos anti-

ribosoma fueron los que mostraron una mayor relación con el sistema del complemento, seguidos de los anticuerpos anti-nucleosoma. La vía de las lectinas era la predominante en la correlación con los anticuerpos anti-ribosoma, y la clásica con los anti-nucleosoma. Los anticuerpos que menos se relacionaron con la vía alternativa fueron los anti-SSB/La, seguidos de los anti-ADN y anti-histonas. En cuanto a los anticuerpos antifosfolípidos, los que más se relacionaron con el sistema del complemento fueron los anti-β2glicoproteína de isotipo IgG, a expensas fundamentalmente de la vía alternativa. Por el contrario, los menos relacionados fueron los anti-cardiolipina de isotipo IgM.

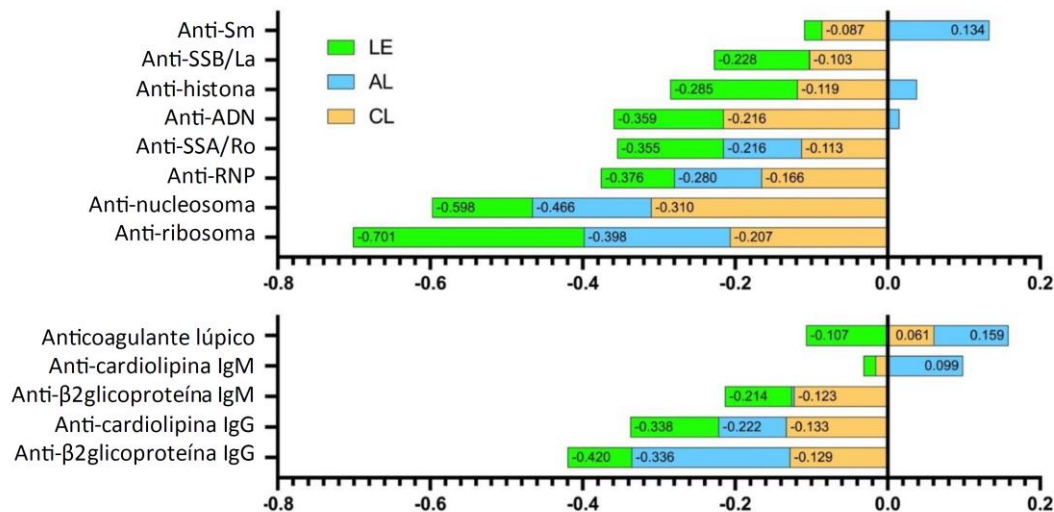


Figura 1.5. Relación global del sistema del complemento con los distintos autoanticuerpos.

Las barras de colores representan el coeficiente de correlación de Spearman entre cada anticuerpo y las pruebas funcionales de cada vía. El ancho de la barra corresponde con el valor de rho en el eje de abscisas (X). AL: vía alternativa (azul), CL: vía clásica (naranja), LE: vía de las lectinas (verde).

En la **figura 1.6** (supplementary figure 6 en *Front Immunol* 2023;14:1167055) se muestra un mapa de calor que ilustra las relaciones de cada autoanticuerpo con cada uno de los parámetros del complemento. En general, predominan las celdas rojas, es decir, las relaciones negativas.

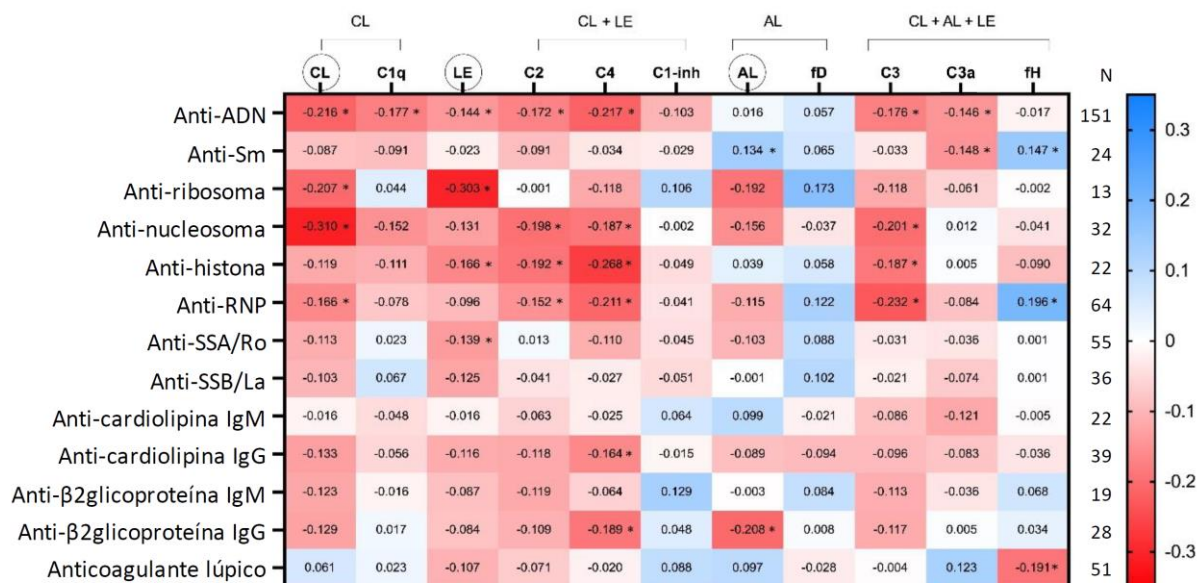


Figura 1.6. Mapa de calor de la relación entre los autoanticuerpos y las moléculas séricas y pruebas funcionales del complemento.

Los valores de las celdas representan el coeficiente rho de Spearman (* denota $p < 0,05$). Se muestran las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. El número de pacientes con cada anticuerpo aparece en el margen derecho. Las pruebas funcionales de cada vía se representan con el nombre de la vía dentro de un círculo.

AL: vía alternativa; CL: vía clásica; C1-inh: inhibidor de C1; FD: factor D, FH: factor H; LE: vía de las lectinas.

El sistema del complemento se relaciona con la resistencia a la insulina en el lupus eritematoso sistémico

The complement system is linked to insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus

M. García-González¹, F. Gómez-Bernal², J.C. Quevedo-Abeledo³, Y. Fernández-Cladera², A.F. González-Rivero², R. López-Mejías⁴, F. Díaz-González^{1,5}, M.Á. González-Gay^{6,7,8}, I. Ferraz-Amaro^{1,5}

¹Division of Rheumatology, ²Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ³Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ⁴Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain; ⁵Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), Tenerife, Spain; ⁶Division of Rheumatology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ⁷University of Cantabria, IDIVAL, Santander, Spain; ⁸Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa.

Clinical and Experimental Rheumatology 2024; 42: 115-121.

a. Características clínicas y datos de laboratorio de la cohorte

En este estudio se incluyeron 225 pacientes con LES, la mayoría mujeres (92%) de 49 ± 12 años. La edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad era de 34 ± 13 , y su duración de 15 ± 10 años. La mayor parte de ellos se encontraban en las categorías “inactividad” (39%) o “actividad baja” (39%) del SLEDAI-2K, y el 63% presentaba daño orgánico establecido según el SDI.

En cuanto a la comorbilidad, el 25% fumaba en el momento del estudio, el 75% tenía dislipemia, el 34% hipertensión arterial y el 28% obesidad. El 33% de los pacientes reunía criterios de síndrome metabólico. En relación con los fármacos, el 48% tomaba glucocorticoides (dosis diaria media equivalente a 5 mg de prednisona), el 70% hidroxiclороquina y el 21% estatinas.

El índice de resistencia a la insulina (HOMA2-IR) fue 0,88 (RIC 0,60-1,30) y el de función de la célula beta pancreática (HOMA2-%B-péptido C) 134% (RIC 99-180). Los valores de las pruebas funcionales del complemento fueron $80 \pm 40\%$ para la vía clásica, 9% (RIC 1-40) para la de las lectinas y 35% (RIC 7-71) para la alternativa.

El resto de las características clínicas y de laboratorio de la cohorte se detallan en la [tabla](#)

2.1 (table 1 en *Clin Exp Rheumatol 2024;42:115-21*).

Tabla 2.1. Características clínicas y de laboratorio

	LES (N=225)		LES (N=225)
Características del LES		Perfil de autoanticuerpos	
Edad, años	49 ± 12	Anti-ADN, n (%)	113 (66)
Mujer, n (%)	207 (92)	ENA, n (%)	133 (70)
Edad en el diagnóstico, años	34 ± 13	Anti-Sm	15 (8)
Duración de la enfermedad, años	15 ± 10	Anti-ribosoma	11 (8)
Síndrome antifosfolípido, n (%)	35 (16)	Anti-nucleosoma	27 (20)
Índices del LES		Anti-histona	18 (13)
Mediana del SLEDAI-2K	2 (0-4)	Anti-RNP	46 (25)
Categorías del SLEDAI-2K		Anti-SSA/Ro	50 (35)
Inactividad, n (%)	84 (39)	Anti-SSB/La	5 (4)
Actividad baja, n (%)	83 (39)	Antifosfolípidos, n (%)	39 (35)
Actividad moderada n (%)	36 (17)	Anti-cardiolipina IgM	16 (10)
Actividad alta a muy alta, n (%)	11 (5)	Anti-cardiolipina IgG	29 (19)
Mediana del SDI	1 (0-2)	Anti-β2 glicoproteína IgM	13 (9)
SDI ≥ 1, n (%)	141 (63)	Anti-β2 glicoproteína IgG	24 (16)
Mediana del Katz	2 (1-4)	Características del complemento	
Katz ≥ 3, n (%)	100 (44)	Pruebas funcionales, %	
Tratamiento en el momento de la visita		Vía clásica	80 ± 40
Estatinas, n (%)	48 (21)	Vía de las lectinas	9 (1-40)
Ácido acetil salicílico, n (%)	63 (29)	Vía alternativa	35 (7-71)
Glucocorticoides, n (%)	107 (48)	Moléculas plasmáticas	
Dosis equivalente de prednisona, mg/d	5 (4,25-7,5)	C1q, mg/dl	34 ± 11
Hidroxicloroquina, n (%)	155 (70)	C2, mg/dl	2,4 ± 1,2
Metotrexato, n (%)	24 (11)	C4, mg/dl	20 ± 12
Azatioprina, n (%)	35 (16)	Factor D, ng/ml	2.517 ± 1.808
Micofenolato de mofetil, n (%)	26 (12)	C3, mg/dl	128 ± 36
Belimumab, n (%)	7 (3)	C3a, mg/dl	38 ± 10
Rituximab, n (%)	6 (3)	C1-inh, mg/dl	32 ± 8
Comorbilidad		Factor H, ng/ml x10 ⁻³	587 (173-923)
Tabaquismo, n (%)	57 (25)	Homeostasis de la glucosa	
Hipertensión arterial, n (%)	76 (34)	Glucosa, mg/dl	91 ± 9
Dislipemia, n (%)	168 (75)	Insulina, μU/ml	6,8 (4,4-9,9)
Perímetro en cintura, cm	92 ± 14	Péptido C, ng/ml	2,2 (1,5-3,4)
Índice de masa corporal, kg/m ²	27 ± 6	HOMA2-S%	115 (78-171)
Obesidad, n (%)	63 (28)	HOMA2-IR	0,88 (0,60-1,30)
Síndrome metabólico, n (%)	75 (33)	HOMA2-B%-péptido C	134 (99-180)

Los datos se muestran como medias ± DE o medianas (RIC) cuando no siguen una distribución normal.

Categorías del SLEDAI-2K: inactividad: 0 puntos; actividad baja: 1-5 puntos; actividad moderada: 6-10 puntos; actividad alta a muy alta: > 10 puntos.

C1-inh: inhibidor de C1; ENA: extractable nuclear antibodies; HOMA2-IR: índice de resistencia a la insulina estimado a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa e insulina; HOMA2-S%: índice de sensibilidad a la insulina estimado a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa e insulina; HOMA2-B%-péptido C: función de la célula beta pancreática estimada a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa y péptido C; SDI: SLICC/ACR Damage Index; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K: SLE Disease Activity Index.

Tabla 2.2. Asociación de las características y comorbilidades del LES con la resistencia a la insulina

	HOMA2-IR		HOMA2-B%-péptido C	
	coeficiente beta (IC 95%), p			
Edad, años	0,007 (-0,005 – 0,02)	0,26	0,8 (-0,2 – 2)	0,11
Mujer, n (%)	-0,4 (-0,9 – 0,1)	0,13	-10 (-54 – 33)	0,63
Características del LES				
Edad en el diagnóstico, años	0,008 (-0,003 – 0,02)	0,15	0,05 (-0,9 – 1)	0,92
Duración de la enfermedad, años	-0,003 (-0,02 – 0,01)	0,67	1 (-0,1 – 2)	0,072
Síndrome antifosfolípido, n (%)	0,1 (-0,2 – 0,5)	0,48	-4 (-37 – 28)	0,81
Perfil de autoanticuerpos				
Anti-ADN, n (%)	0,03 (-0,3 – 0,4)	0,86	24 (-6 – 55)	0,12
ENA, n (%)	0,1 (-0,2 – 0,5)	0,42	30 (3 – 58)	0,030
Anti-Sm	-0,3 (-0,8 – 0,3)	0,32	-21 (-68 – 26)	0,38
Anti-ribosoma	0,2 (-0,5 – 0,8)	0,60	25 (-16 – 65)	0,23
Anti-nucleosoma	0,4 (-0,008 – 0,9)	0,054	16 (-11 – 44)	0,25
Anti-histona	-0,2 (-0,8 – 0,3)	0,44	-19 (-52 – 13)	0,24
Anti-RNP	0,01 (-0,3 – 0,4)	0,96	22 (-8 – 52)	0,15
Anti-SSA/Ro	0,04 (-0,3 – 0,4)	0,82	28 (-3 – 58)	0,077
Anti-SSB/La	-0,7 (-2 – 0,2)	0,15	117 (41 – 194)	0,003
Anticuerpos antifosfolípidos, n (%)	-0,2 (-0,6 – 0,2)	0,32	-20 (-46 – 7)	0,14
Anti-cardiolipina IgM	-0,001 (-0,5 – 0,5)	0,99	12 (-38 – 61)	0,65
Anti-cardiolipina IgG	-0,3 (-0,7 – 0,07)	0,11	28 (-11 – 66)	0,16
Anti-β2 glicoproteína IgM	0,08 (-0,5 – 0,6)	0,77	58 (4 – 112)	0,034
Anti-β2 glicoproteína IgG	-0,03 (-0,5 – 0,4)	0,89	-12 (-54 – 30)	0,59
Índices del LES				
Mediana del SLEDAI-2K	0,01 (-0,02 – 0,05)	0,51	0,5 (-2 – 4)	0,72
Categorías del SLEDA-2K				
Inactividad, n (%)	ref.		ref.	
Actividad baja, n (%)	0,05 (-0,3 – 0,4)	0,78	0,6 (-27 – 28)	0,97
Actividad moderada a muy alta, n (%)	0,03 (-0,4 – 0,4)	0,89	-0,2 (-33 – 32)	0,99
Mediana del SDI	0,07 (-0,01 – 0,1)	0,098	12 (5 – 18)	0,001
SDI ≥ 1, n (%)	0,06 (-0,2 – 0,3)	0,67	31 (7 – 55)	0,011
Mediana del Katz	0,06 (-0,01 – 0,1)	0,12	9 (3 – 15)	0,004
Katz ≥ 3, n (%)	0,2 (-0,03 – 0,5)	0,083	26 (3 – 50)	0,027
Comorbilidad				
Tabaquismo, n (%)	-0,02 (-0,3 – 0,3)	0,90	-18 (-45 – 8)	0,18
Hipertensión arterial, n (%)	0,3 (0,003 – 0,6)	0,048	48 (24 – 72)	<0,001
Dislipemia, n (%)	0,4 (0,05 – 0,7)	0,023	31 (4 – 57)	0,025
Perímetro en cintura, cm	0,03 (0,02 – 0,04)	<0,001	3 (2 – 4)	<0,001
Índice de masa corporal, kg/m ²	0,06 (0,04 – 0,09)	<0,001	7 (4 – 8)	<0,001
Obesidad, n (%)	0,6 (0,3 – 0,9)	<0,001	52 (27 – 78)	<0,001
Tratamiento en el momento de la visita				
Estatinas, n (%)	0,4 (0,1 – 0,8)	0,011	13 (-16 – 41)	0,38
Ácido acetil salicílico, n (%)	0,09 (-0,2 – 0,4)	0,56	14 (-14 – 39)	0,35
Glucocorticoides, n (%)	0,2 (-0,04 – 0,5)	0,088	22 (-2 – 45)	0,067
Dosis diaria equivalente de prednisona, mg/d	0,01 (-0,04 – 0,07)	0,62	1 (-4 – 7)	0,63
Hidroxicloroquina, n (%)	-0,001 (-0,3 – 0,3)	0,99	-21 (-46 – 5)	0,11
Metotrexato, n (%)	-0,3 (-0,7 – 0,1)	0,19	-18 (-56 – 20)	0,35
Azatioprina, n (%)	-0,2 (-0,5 – 0,2)	0,38	-10 (-42 – 23)	0,55
Micofenolato de mofetil, n (%)	0,5 (0,03 – 0,9)	0,034	14 (-22 – 51)	0,46
Belimumab, n (%)	1 (0,2 – 2)	0,013	47 (-21 – 114)	0,17
Rituximab, n (%)	-0,003 (1 – -1)	0,99	-19 (-92 – 54)	0,61

Análisis de regresión lineal univariante. HOMA2-IR y HOMA2-B%-péptido C actúan como variables dependientes. Los resultados estadísticamente significativos se muestran en negrita.

Categorías del SLEDAI-2K: inactividad: 0 puntos (categoría de referencia); actividad baja: 1-5 puntos; actividad moderada a muy alta: ≥ 6 puntos. ENA: extractable nuclear antibodies; HOMA2-IR: índice de resistencia a la insulina estimado a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa e insulina; HOMA2-B%-péptido C: función de la célula beta pancreática estimada a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa y péptido C; IC: intervalo de confianza; SDI: SLICC/ACR Damage Index; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K: SLE Disease Activity Index.

En la **tabla 2.2** (**table S1** en *Clin Exp Rheumatol 2024;42:115-21*) se representan las asociaciones univariadas entre las características de los pacientes y los índices HOMA2-IR y HOMA2-B%. Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, como la hipertensión, la obesidad, la dislipemia, el índice de masa corporal y el perímetro en cintura se asociaron significativamente con mayores valores tanto de HOMA2-IR y HOMA2-B%. El uso de glucocorticoides mostró una tendencia a la asociación positiva con ambos índices. En cuanto a las características del LES, los índices de daño (SDI) y gravedad (Katz) se asociaron con valores más altos de HOMA2-B%, mientras que no hubo asociación con la actividad (SLEDAI-2K). Los ENA, y más concretamente los anticuerpos anti-SSB/La, así como los anti- β 2glicoproteína de isotipo IgM, también se asociaron con mayores valores de HOMA2-B%. La duración de la enfermedad y los anticuerpos anti-SSA/Ro mostraron una tendencia a la asociación positiva, sin alcanzar la significación estadística.

b. Asociación del complemento con los índices de resistencia a la insulina

Los parámetros del complemento se asociaron significativamente con los índices del instrumento HOMA2 (**tabla 2.3**) (**table 2** en *Clin Exp Rheumatol 2024;42:115-21*). Tras el análisis ajustado por las covariables “edad”, “hipertensión”, “dislipemia”, “índice de masa corporal”, “estatinas” y “glucocorticoides”, la proteína activa C3a y el regulador FH mantuvieron su asociación con mayores niveles de resistencia a la insulina (HOMA2-IR), mientras que la prueba funcional de la vía alternativa, solo una tendencia. En cuanto al índice de función de la célula beta pancreática (HOMA2-B%), tras ajustar por estas covariables, no se encontró asociación estadísticamente significativa con los parámetros del complemento, si bien se observó una tendencia a la asociación positiva con C1q y C3a.

Tabla 2.3. Asociación del complemento con los índices de resistencia a la insulina y función de la célula beta pancreática

	HOMA2-IR x 100				HOMA2-B%-péptido C			
	<i>coeficiente beta (IC 95%), p</i>							
	Univariable		Multivariable		Univariable		Multivariable	
Vía clásica								
Test funcional, %	0,3 (-0,05 – 0,6)	0,094	0,1 (-0,2 – 0,5)	0,36	0,08 (-0,2 – 0,4)	0,61	-0,03 (-0,3 – 0,3)	0,83
C1q, mg/dl	0,05 (-0,8 – 2)	0,45	0,03 (-1 – 1)	0,96	1 (0,2 – 2)	0,023	0,9 (-0,2 – 2)	0,099
Vía de las lectinas								
Test funcional, %	0,1 (-0,2 – 0,4)	0,46	0,07 (-0,2 – 0,4)	0,66	-0,09 (-0,4 – 0,2)	0,53	-0,1 (-0,4 – 0,1)	0,35
Moléculas comunes para las vías clásica y de las lectinas								
C2, mg/dl	-4 (-15 – 8)	0,52	-8 (-20 – 3)	0,13	8 (-2 – 18)	0,13	5 (-5 – 15)	0,31
C4, mg/dl	0,6 (-0,6 – 2)	0,34	0,4 (-0,9 – 2)	0,56	0,5 (-0,5 – 2)	0,33	0,4 (-0,6 – 1)	0,99
C1-inh, mg/dl	2 (0,06 – 4)	0,043	0,8 (-1 – 3)	0,44	2 (0,03 – 3)	0,018	1 (-0,6 – 3)	0,22
Vía alternativa								
Test funcional, %	0,4 (0,03 – 0,8)	0,032	0,3 (-0,04 – 0,7)	0,082	-0,07 (-0,4 – 0,3)	0,68	-0,1 (-0,5 – 0,2)	0,37
FD, ng/ml	0,003 (-0,006 – 0,01)	0,57	-0,0003 (-0,009 – 0,009)	0,94	-0,0005 (-0,008 – 0,007)	0,90	-0,0005 (-0,008 – 0,007)	0,90
Moléculas comunes para las tres vías								
C3, mg/dl	0,4 (-0,05 – 0,7)	0,083	0,2 (-0,3 – 0,6)	0,48	0,1 (-0,2 – 0,5)	0,41	0,06 (-0,3 – 0,4)	0,73
C3a, mg/dl	3 (1 – 4)	<0,001	2 (0,2 – 3)	0,030	2 (0,7 – 3)	0,003	1 (-0,1 – 2)	0,081
FH, ng/ml x10 ⁻³	0,02 (0,002 – 0,04)	0,033	0,02 (0,003 – 0,04)	0,019	0,005 (-0,01 – 0,02)	0,51	0,006 (-0,008 – 0,02)	0,39

Análisis de regresión lineal univariable y ajustado por covariables (edad, hipertensión arterial, dislipemia, índice de masa corporal, uso de estatinas y glucocorticoides). HOMA2-IR y HOMA2-B%-péptido C actúan como variables dependientes. Los resultados estadísticamente significativos aparecen en negrita.

C1-inh: inhibidor de C1; FD: factor D; FH: factor H; HOMA2-IR: índice de resistencia a la insulina estimado a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa e insulina; HOMA2-B%-péptido C: función de la célula beta pancreática estimada a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa y péptido C; IC: intervalo de confianza.

c. Diferencias en el complemento en pacientes con y sin síndrome metabólico

Las diferencias entre los pacientes con y sin síndrome metabólico se muestran en la **tabla 2.4** (**supplementary table S2** en *Clin Exp Rheumatol* 2024;42:115-21). Como era esperable, los pacientes con LES que reunían los criterios NCEP/ATPIII de síndrome metabólico eran más añosos, usaban estatinas y antihipertensivos con más frecuencia, tenían más obesidad y dislipemia, y mayores valores del índice de masa corporal y del perímetro en cintura. En cuanto a los datos relativos al LES, los pacientes con síndrome metabólico mostraban mayor daño acumulado según el SDI y recibían hidroxicloroquina con menor frecuencia.

Al analizar la relación entre el sistema del complemento y el síndrome metabólico, se observó que los pacientes con LES que cumplían los criterios del NCEP/ATP III presentaban valores más altos de las pruebas funcionales y moléculas plasmáticas del complemento (**tabla 2.5**, **table 3** en *Clin Exp Rheumatol* 2024;42:115-21). En el análisis univariable se demostraron niveles significativamente mayores de C1q, FD, C3, C3a y C1-inh en los pacientes con este síndrome. En el análisis multivariable, tras ajustar por covariables, la proteína inactiva C1q y el zimógeno C3 mantuvieron sus asociaciones positivas significativas, esto es, odds ratios de mayor riesgo de síndrome metabólico, mientras que el FD mostró únicamente una tendencia.

Tabla 2.4. Diferencias entre los pacientes con y sin síndrome metabólico en cuanto a las características del lupus eritematoso sistémico y sus comorbilidades

	Síndrome metabólico*		p
	No (n=148)	Sí (n=75)	
Edad, años	46 ± 10	54 ± 12	<0,001
Mujer, n (%)	137 (93)	68 (91)	0,62
Características del LES			
Edad en el diagnóstico, años	32 ± 11	38 ± 13	<0,001
Duración de la enfermedad, años	15 ± 9	17 ± 10	0,18
Síndrome antifosfolípido, n (%)	27 (19)	7 (10)	0,076
Perfil de autoanticuerpos			
Anti-ADN, n (%)	75 (65)	38 (68)	0,73
ENA, n (%)	84 (68)	48 (75)	0,30
Anti-Sm	8 (6)	7 (11)	0,27
Anti-ribosoma	9 (10)	2 (5)	0,30
Anti-nucleosoma	18 (20)	9 (21)	0,90
Anti-histona	11 (12)	7 (16)	0,52
Anti-RNP	26 (22)	20 (32)	0,14
Anti-SSA/Ro	31 (34)	18 (37)	0,72
Anti-SSB/La	3 (3)	2 (4)	0,78
Anticuerpos antifosfolípidos, n (%)	28 (38)	11 (31)	0,45
Anti-cardiolipina IgM	12 (13)	4 (7)	0,30
Anti-cardiolipina IgG	19 (20)	10 (18)	0,77
Anti-β2 glicoproteína IgM	6 (6)	7 (13)	0,17
Anti-β2 glicoproteína IgG	15 (16)	9 (17)	0,93
Índices del LES			
Mediana del SLEDAI-2K	2 (0-5)	1 (0-4)	0,19
Categorías del SLEDAI-2K			
Inactividad, n (%)	54 (38)	30 (42)	
Actividad baja, n (%)	51 (36)	32 (45)	0,090
Actividad moderada-muy alta, n (%)	36 (26)	9 (13)	
Mediana del SDI	1 (0-1)	2 (0-3)	<0,001
SDI ≥ 1, n (%)	86 (58)	54 (72)	0,043
Mediana del Katz	2 (1-3)	2 (1-4)	0,21
Katz ≥ 3, n (%)	64 (43)	34 (45)	0,77
Comorbilidad			
Tabaquismo, n (%)	40 (27)	16 (21)	0,35
Hipertensión arterial, n (%)	25 (17)	49 (65)	<0,001
Dislipemia, n (%)	92 (62)	74 (99)	<0,001
Perímetro en cintura, cm	87 ± 12	100 ± 12	<0,001
Índice de masa corporal, kg/m ²	26 ± 5	30 ± 5	<0,001
Obesidad, n (%)	25 (17)	37 (49)	<0,001
Tratamiento en el momento de la visita			
Estatinas, n (%)	9 (6)	38 (51)	<0,001
Ácido acetil salicílico, n (%)	37 (26)	25 (34)	0,21
Glucocorticoides, n (%)	64 (44)	41 (55)	0,13
Dosis equivalente de prednisona, mg/d	5 (5-7,5)	5 (2,5-7,5)	0,36
Hidroxicloroquina, n (%)	108 (74)	45 (61)	0,045
Metotrexato, n (%)	14 (9)	10 (13)	0,38
Azatioprina, n (%)	24 (16)	10 (13)	0,57
Micofenolato de mofetil, n (%)	16 (11)	9 (12)	0,79
Belimumab, n (%)	3 (2)	3 (4)	0,41
Rituximab, n (%)	4 (3)	1 (1)	0,67
Homeostasis de la glucosa			
Glucosa, mg/dl	90 ± 9	93 ± 10	0,064
Insulina, μU/ml	6,1 (3,8 – 8,4)	8,7 (5,2 – 14,0)	<0,001
Péptido C, ng/ml	1,9 (1,3 – 2,9)	3,2 (2,0 – 5,3)	<0,001
HOMA2-S%	125 (90 – 205)	86 (58 – 147)	0,002
HOMA2-IR	0,8 (0,5 – 1,1)	1,2 (0,7 – 1,7)	<0,001
HOMA2-B%-péptido C	121 (93 – 165)	159 (119 – 246)	<0,001

*En 2 de los 225 pacientes no pudieron aplicarse los criterios NCEP/ATP III.

Los datos se muestran como medias ± DE o medianas (RIC) para las variables cuantitativas, y como frecuencias para las cualitativas. Las diferencias se analizaron con test de Chi-cuadrado, exacto de Fisher, t-student o U de Mann-Whitney según se tratara de variables cualitativas o cuantitativas y según distribución de normalidad. Las diferencias estadísticamente significativas aparecen en negrita.

Categorías del SLEDAI-2K: inactividad: 0 puntos; actividad baja: 1-5 puntos; actividad moderada a muy alta: ≥ 6 puntos.

ENA: extractable nuclear antibodies; HOMA2-IR: índice de resistencia a la insulina estimado a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa e insulina; HOMA2-S%: índice de sensibilidad a la insulina estimado a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa e insulina; HOMA2-B%-péptido C: función de la célula beta pancreática estimada a través del instrumento HOMA con los valores séricos de glucosa y péptido C; SDI: SLICC/ACR Damage Index; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K: SLE Disease Activity Index.

Tabla 2.5. Diferencias entre los pacientes con y sin síndrome metabólico en cuanto al estado de actividad del sistema del complemento sérico

	Síndrome metabólico*		p	odds ratio (IC 95%), p			
	No (n=148)	Sí (n=75)		Univariable	Multivariable		
Vía clásica							
Test funcional, %	85 ± 41	98 ± 36	0,036	1,01 (1,00-1,02)	0,038	1,00 (0,99-1,01)	0,26
C1q, mg/dl	32 ± 9	37 ± 13	0,004	1,04 (1,01-1,07)	0,005	1,04 (1,01-1,07)	0,011
Vía de las lectinas							
Test funcional, %	8 (1-41)	9 (1-39)	0,76	1,00 (0,99-1,01)	0,76	–	
Moléculas comunes para las vías clásica y de las lectinas							
C2, mg/dl	2,3 ± 1,1	2,6 ± 1,3	0,060	1,26 (0,99-1,60)	0,062	1,28 (0,98-1,66)	0,070
C4, mg/dl	20 ± 11	22 ± 13	0,14	1,02 (0,99-1,04)	0,15	1,01 (0,99-1,04)	0,36
C1 inhibidor, mg/dl	31 ± 9	34 ± 7	0,047	1,04 (1,00-1,08)	0,050	1,02 (0,98-1,07)	0,31
Vía alternativa							
Test funcional, %	35 (6-67)	42 (10-80)	0,13	1,01 (1,00-1,01)	0,13	1,01 (0,99-1,02)	0,19
Factor D, ng/ml	2.238 ± 1.617	3.055 ± 2.041	0,004	1,00 (1,00-1,00)	0,010	1,00 (0,99-1,00)	0,064
Moléculas comunes para las tres vías							
C3, mg/dl	122 ± 30	141 ± 42	<0,001	1,02 (1,01-1,03)	0,000	1,02 (1,01-1,03)	0,001
C3a, mg/dl	37 ± 8	40 ± 12	0,033	1,03 (1,00-1,06)	0,036	1,03 (0,99-1,06)	0,12
Factor H, ng/ml x10 ⁻³	385 (284-550)	389 (291-614)	0,51	1 (0,99-1)	0,52	–	

*En 2 de los 225 pacientes no pudieron aplicarse los criterios NCEP/ATP III.

Análisis de regresión logística univariable y ajustado por covariables (edad y tratamiento con glucocorticoides e hidroxicloroquina). “Síndrome metabólico” actúa como variable dependiente. Los resultados estadísticamente significativos aparecen en negrita. IC: intervalo de confianza.

Article

HDL Cholesterol Efflux and the Complement System Are Linked in Systemic Lupus Erythematosus

María García-González ¹, Fuensanta Gómez-Bernal ², Juan C. Quevedo-Abeledo ³, Yolanda Fernández-Cladera ², Agustín E. González-Rivero ², Raquel López-Mejías ⁴, Federico Díaz-González ^{1,5}, Miguel A. González-Gay ^{6,7,*} and Iván Ferraz-Amaro ^{1,5,*}

¹ Division of Rheumatology, Hospital Universitario de Canarias, 38320 Tenerife, Spain; margagon23@hotmail.com (M.G.-G.); federico.diaz.gonzalez@gmail.com (F.D.-G.)

² Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, 38320 Tenerife, Spain; fuensanta95@gmail.com (F.G.-B.); yolanda.fernandezcladera@gmail.com (Y.F.-C.); afgonrv@gmail.com (A.F.G.-R.)

³ Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrin, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; quevedojcarlos@yahoo.es

⁴ Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Instituto de Investigación sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, Spain; rlopezmejias78@gmail.com

⁵ Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), 38200 Tenerife, Spain

⁶ Division of Rheumatology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain

⁷ Department of Medicine and Psychiatry, University of Cantabria, 39005 Santander, Spain

* Correspondence: miguelaggay@hotmail.com (M.A.G.-G.); iferrazamaro@hotmail.com (I.F.-A.)

El complemento y la capacidad de transferencia de colesterol están relacionados en el lupus eritematoso sistémico

a. Características clínicas y datos de laboratorio de la cohorte

En este estudio se incluyeron 207 pacientes con LES. La mayoría eran mujeres (94%) de 50 ± 11 años. La edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad era de 35 ± 13, y su duración de 15 ± 10 años. La mayor parte de los pacientes se encontraban en las categorías “inactividad” (43%) o “baja actividad” (40%) del SLEDAI-2K, y el 65% presentaba daño orgánico establecido según el SDI.

En cuanto a la comorbilidad, el 23% fumaba en el momento del estudio, el 41% tenía antecedentes de hipertensión arterial, el 28% de obesidad y el 5% de diabetes mellitus. En relación con los fármacos, el 50% tomaba glucocorticoides (dosis diaria media equivalente a 5 mg de prednisona), el 69% hidroxiclороquina y el 26% estatinas.

El índice aterogénico fue 3,43 ± 1,10 y la capacidad de transferencia de colesterol 8,1 ± 4,2%. Los valores de las pruebas funcionales del complemento fueron 92 ± 40% para la vía clásica, 12% (RIC 1-42) para la de las lectinas y 60% (RIC 22-88) para la alternativa. El resto de las características clínicas y de laboratorio de la cohorte se detallan en la **tabla 3.1** (table 1 en *J Clin Med* 2023;12:5405).

Tabla 3.1. Características clínicas y de laboratorio y su relación con la capacidad de transferencia de colesterol

	LES (N=207)		
		CEC%	
		coeficiente beta (IC 95%), p	
Edad, años	50 ± 11	-0,04 (-0,09 – 0,02)	0,19
Mujer, n (%)	195 (94)	-0,2 (-3 – 3)	0,91
Características del LES			
Edad en el diagnóstico, años	35 ± 13	-0,01 (-0,06 – 0,03)	0,57
Duración de la enfermedad, años	15 ± 10	-0,02 (-0,09 – 0,04)	0,46
Síndrome antifosfolípido, n (%)	24 (12)	0,02 (-2 – 2)	0,87
Perfil de autoanticuerpos			
Anti-ADN, n (%)	110 (72)	-0,8 (-2 – 0,7)	0,29
ENA, n (%)	123 (66)	0,2 (-1 – 2)	0,77
Anti-Sm	22 (12)	-1 (-3 – 0,8)	0,24
Anti-ribosoma	10 (10)	1 (-2 – 5)	0,44
Anti-nucleosoma	15 (15)	1 (-2 – 4)	0,42
Anti-histona	9 (9)	1 (-2 – 5)	0,41
Anti-RNP	51 (29)	-0,6 (2 – 0,9)	0,44
Anti-SSA	40 (38)	0,3 (-2 – 3)	0,77
Anti-SSB	4 (4)	0,7 (-10 – 11)	0,90
Anticuerpos antifosfolípidos, n (%)	31 (35)	0,02 (-2 – 2)	0,87
Índices del LES			
Mediana del SLEDAI-2K	0 (0-2)	-0,02 (-0,2 – 0,2)	0,84
Categorías del SLEDAI-2K			
Inactividad, n (%)	85 (43)	ref.	
Actividad baja, n (%)	78 (40)	-1 (-2 – 0,4)	0,17
Actividad moderada a muy alta, n (%)	35 (17)	-0,5 (-2 – 1)	0,62
Mediana del SDI	1 (0-2)	0,03 (-0,3 – 0,4)	0,85
SDI ≥ 1, n (%)	156 (75)	0,3 (-1 – 2)	0,70
Mediana del Katz	2 (1-4)	0,2 (-0,1 – 0,5)	0,28
Katz ≥ 3, n (%)	86 (42)	1 (-0,3 – 2)	0,12
Comorbilidad			
Tabaquismo	48 (23)	-0,05 (-1 – 1)	0,94
Diabetes mellitus	11 (5)	-0,4 (-3 – 2)	0,76
Hipertensión arterial	85 (41)	-0,9 (-2 – 0,4)	0,17
Perímetro en cintura, cm	93 ± 14	0,02 (-0,02 – 0,07)	0,33
Índice de masa corporal, kg/m ²	27 ± 6	0,04 (-0,07 – 0,2)	0,45
Obesidad	58 (28)	-0,4 (-2 – 1)	0,60
Tratamiento en el momento de la visita			
Estatinas, n (%)	54 (26)	-0,2 (-2 – 1)	0,79
Ácido acetil salicílico, n (%)	55 (27)	-0,2 (-2 – 1)	0,82
Hipotensores	78 (38)	-0,5 (-2 – 0,7)	0,41
Glucocorticoides, n (%)	102 (50)	0,7 (-0,5 – 2)	0,25
Dosis diaria equivalente de prednisona, mg	5 (5-7,5)	-0,09 (-0,4 – 0,2)	0,52
Hidroxicloroquina, n (%)	141 (69)	0,1 (-1 – 1)	0,83
Metotrexato, n (%)	24 (12)	3 (0,8 – 4)	0,005
Azatioprina, n (%)	27 (13)	1 (-0,6 – 3)	0,19
Micofenolato de mofetil, n (%)	17 (8)	0,2 (-2 – 2)	0,86
Belimumab, n (%)	3 (1)	0,4 (-4 – 5)	0,86
Rituximab, n (%)	6 (3)	-1 (-5 – 2)	0,55
Características del complemento			
Pruebas funcionales, %			
Vía clásica	92 ± 40	-0,007 (-0,02 – 0,009)	0,39
Vía de las lectinas	12 (1-42)	-0,008 (-0,02 – 0,007)	0,28
Vía alternativa	60 (22-88)	-0,03 (-0,04 – -0,01)	0,001
Moléculas plasmáticas			
C1q, mg/dl	35 ± 11	0,004 (-0,02 – 0,08)	0,26
C2, mg/dl	2,6 ± 1,3	0,5 (0,02 – 1)	0,043
C4, mg/dl	21 ± 12	0,04 (-0,01 – 0,09)	0,15
Factor D, ng/ml	2.749 ± 1.700	-0,0001 (-0,0006 – 0,0003)	0,55
C3, mg/dl	134 ± 42	0,01 (-0,0009 – 0,03)	0,065
C3a, mg/dl	38 ± 11	0,03 (-0,03 – 0,09)	0,28
C1-inh, mg/dl	31 ± 10	-0,02 (-0,08 – 0,05)	0,59
Factor H, ng/ml x10 ⁻³	448 (302-745)	-0,0002 (-0,0009 – 0,0004)	0,45

Los datos se muestran como medias ± DE o medianas (RIC) para las variables cuantitativas, y como frecuencias para las cualitativas.

Análisis de regresión lineal univariable. CEC% actúa como variable dependiente. En la variable ordinal "categorías del SLEDAI-2K", la categoría "inactividad" se toma como nivel de referencia. Los resultados estadísticamente significativos aparecen en negrita.

Categorías del SLEDAI-2K: inactividad: 0 puntos; actividad baja: 1-5 puntos; actividad moderada a muy alta: ≥ 6 puntos.

CEC: colesterol efflux capacity (capacidad de transferencia de colesterol); C1-inh: inhibidor de C1; ENA: extractable nuclear antibodies; IC: intervalo de confianza; SDI: SLICC/ACR Damage Index; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K: SLE Disease Activity Index.

b. Asociación de la transferencia de colesterol con el LES y sus comorbilidades

En general, no se encontró asociación entre las características de la enfermedad o sus comorbilidades y la capacidad de transferencia de colesterol (**tabla 3.1**, **table 1** en *J Clin Med 2023;12:5405*). Solo el uso de metotrexato se asoció de manera significativa (coeficiente beta 3 [0,8-4], p 0,005). El uso de azatioprina mostró una tendencia a la asociación con mayores valores de la capacidad de transferencia de colesterol, mientras que la edad y la hipertensión mostraron una tendencia a la asociación negativa. En ninguno de estos casos se alcanzó la significación estadística.

c. Relación entre el sistema del complemento y el perfil lipídico

En la **figura 3.1** (**figure 1** y **table supplementary 1** en *J Clin Med 2023;12:5405*) se muestra en un mapa de calor la relación univariable entre los parámetros del sistema del complemento y el perfil lipídico mediante coeficientes de correlación de Spearman (ρ).

La mayoría de las relaciones fueron positivas (color azul). No se encontró ningún vínculo significativo con la prueba funcional de la vía de las lectinas y el zimógeno C3, mientras que las moléculas de la vía clásica y el test funcional de la vía alternativa fueron los parámetros que más ampliamente se relacionaron con el perfil lipídico. Las moléculas reguladoras, C1-inh y FH, solo se relacionaron con las lipoproteínas (a) y las apolipoproteínas B, respectivamente. Las relaciones más fuertes se observaron entre el colesterol no HDL y niveles más altos de C1q y C2, y entre las apolipoproteínas B y mayores valores de FH y del test funcional de la vía alternativa. El HDL se correlacionó con niveles más bajos de la proteína

activa C3a. De hecho, el índice aterogénico (colesterol total/HDL) se relacionó con valores más altos de C1q, C2, C1-inh y C3a. Por otra parte, la capacidad de transferencia de colesterol se correlacionó con mayores niveles de C4 y valores más bajos en el test funcional de la vía alternativa.

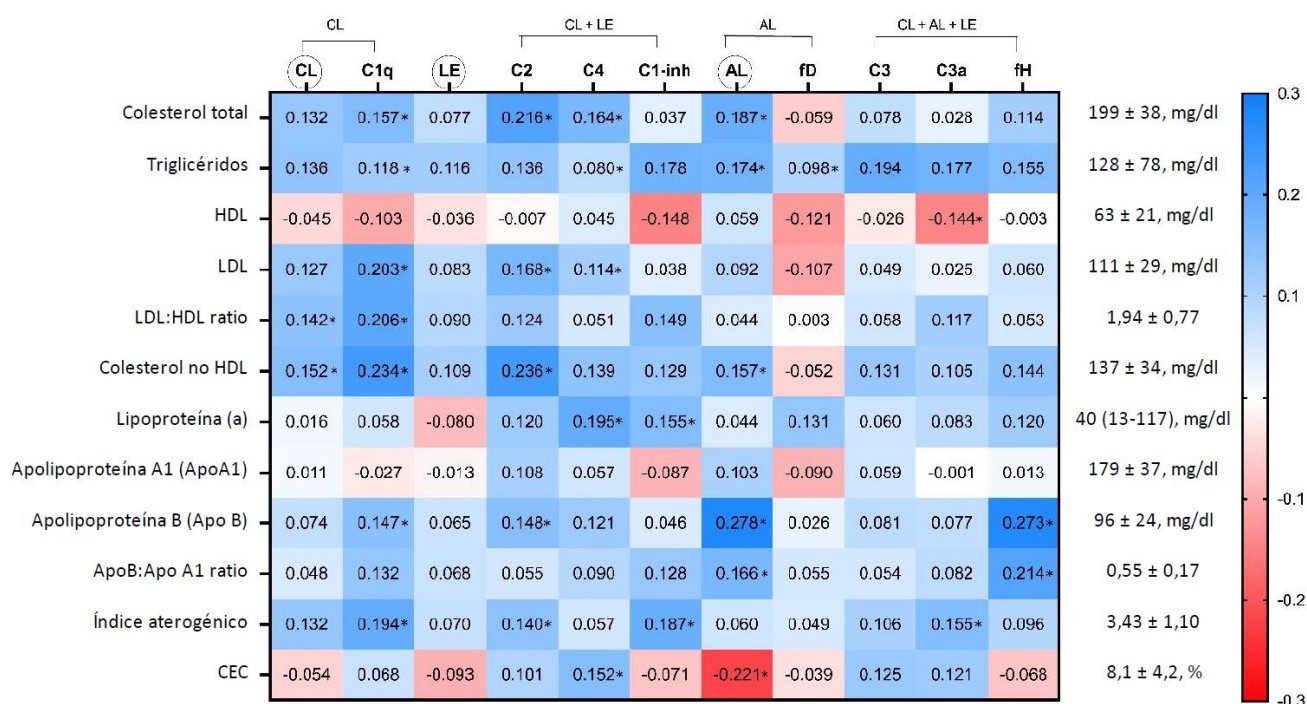


Figura 3.1. Mapa de calor de la relación entre el perfil lipídico y el sistema del complemento sérico.

Los valores de las celdas representan el coeficiente rho de Spearman (* denota $p < 0,05$). Se muestran las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. En el margen derecho se detallan las medias \pm DE o las medianas (RIC) de los parámetros del perfil lipídico. Las pruebas funcionales de cada vía del complemento se representan con el nombre de la vía dentro de un círculo.

AL: vía alternativa; CEC: cholesterol efflux capacity (capacidad de transferencia de colesterol); CL: vía clásica; C1-inh: inhibidor de C1; FD: factor D; FH: factor H; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; LE: vía de las lectinas.

d. Asociación del complemento con la capacidad de transferencia de colesterol

En las **tablas 3.1** y **3.2** se muestra la asociación de la capacidad de transferencia de colesterol con las pruebas funcionales y las moléculas individuales del complemento.

El análisis multivariable (**tabla 3.2**, **table 2** en *J Clin Med 2023;12:5405*) se ajustó por la variable “estatinas”, por aquéllas con valor $p < 0,20$ en su relación con la capacidad de transferencia de colesterol (“índice de Katz”, “metotrexato” y “azatioprina”) y por las variables del perfil lipídico que no derivaban de fórmulas (colesterol total, HDL, lipoproteína (a), triglicéridos, apolipoproteína A1 y apolipoproteína B).

Tras ajustar por estas covariables, se observó que la capacidad de transferencia de colesterol se asociaba de manera negativa con la prueba funcional de la vía alternativa, y de manera positiva con los zimógenos C2 (común para las vías clásica y de las lectinas) y C3 (común para las tres vías).

Tabla 3.2. Asociación del sistema del complemento con la capacidad de transferencia de colesterol

	CEC, %			
	coeficiente beta (IC 95%), p			
	Univariable	Multivariable		
Vía clásica				
Test funcional, %	-0,007 (-0,02 – 0,009)	0,39	-	
C1q, mg/dl	0,004 (-0,02 – 0,08)	0,26	-	
Vía de las lectinas				
Test funcional, %	-0,008 (-0,02 – 0,007)	0,28	-	
Moléculas comunes para las vías clásica y de las lectinas				
C2, mg/dl	0,5 (0,02 – 1)	0,043	0,5 (0,005 – 1)	0,048
C4, mg/dl	0,04 (-0,01 – 0,09)	0,15	0,05 (-0,01 – 0,1)	0,11
C1 inhibidor, mg/dl	-0,02 (-0,08 – 0,05)	0,59	-	
Vía alternativa				
Test funcional, %	-0,03 (-0,04 – -0,01)	0,001	-0,02 (-0,04 – -0,002)	0,030
Factor D, ng/ml	-0,0001 (-0,0006 – 0,0003)	0,55	-	
Moléculas comunes a las tres vías				
C3, mg/dl	0,01 (-0,0009 – 0,03)	0,065	0,02 (0,005 – 0,04)	0,009
C3a, mg/dl	0,03 (-0,03 – 0,09)	0,28	-	
Factor H, ng/ml x10 ⁻³	-0,0002 (-0,0009 – 0,0004)	0,45	-	

Análisis de regresión lineal univariable y ajustado por covariables (hipertensión arterial, índice Katz ≥ 3 , metotrexato, azatioprina, uso de estatinas, colesterol total, HDL, lipoproteína (a), triglicéridos y apolipoproteínas A1 y B). CEC% actúa como variable dependiente. Los resultados estadísticamente significativos aparecen en negrita.

CEC: colesterol efflux capacity (capacidad de transferencia de colesterol); IC: intervalo de confianza.

VI. Discusión



OPEN ACCESS

EDITED BY
Ester Lozano,
University of Barcelona, SpainREVIEWED BY
Takeshi Iwasaki,
Kyoto University, Japan
Giuseppina Ardore,
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy*CORRESPONDENCE
Iván Ferraz-Amaro
✉ iferrazamaro@hotmail.com
Miguel A. González-Gay
✉ miguelgay@hotmail.com

†These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology
RECEIVED 15 February 2023
ACCEPTED 29 March 2023
PUBLISHED 21 April 2023

Full characterization of the three pathways of the complement system in patients with systemic lupus erythematosus

María García-González¹, Fuensanta Gómez-Bernal²,
Juan C. Quevedo-Abeledo³, Yolanda Fernández-Cladera²,
Agustín F. González-Rivero², Antonia de Vera-González²,
Iñigo de la Rúa-Figueroa⁴, Raquel López-Mejías⁴,
Federico Díaz-González^{1,5}, Miguel A. González-Gay^{6,7,8†}
and Iván Ferraz-Amaro^{1,5*†}¹Division of Rheumatology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain, ²Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain, ³Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, ⁴Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ⁵Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), Tenerife, Spain, ⁶Division of Rheumatology, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IS-FJD), Madrid, Spain, ⁷University of Cantabria, Instituto de Investigación sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ⁸Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

Análisis integral de las 3 vías del complemento en pacientes con lupus eritematoso sistémico

Este trabajo es el primero en la literatura en el que se analiza el sistema del complemento sérico de manera integral en una extensa cohorte de LES con manifestaciones orgánicas diversas. Nuestros datos corroboran la complejidad de este sistema biológico en estos pacientes y su relación con determinadas formas de presentación de la enfermedad. Concretamente, la actividad del LES se relaciona con la activación del complemento mientras que el daño acumulado lo hace con niveles elevados tanto de las moléculas plasmáticas como de las pruebas funcionales. Por otra parte, los anticuerpos anti-ADN, anti-ribosoma y anti-nucleosoma se relacionan predominantemente con la actividad de la vía clásica y de las lectinas, y los anti- β 2glicoproteína con la actividad de la vía alternativa. De acuerdo con nuestros hallazgos, la identificación de ciertas alteraciones en el sistema del complemento podría servir como guía en la orientación pronóstica y terapéutica de los pacientes con LES.

En nuestro estudio, la distribución de frecuencias en las pruebas funcionales del complemento revela una mayor prevalencia de valores bajos en la vía alternativa y de las lectinas. Este hallazgo podría traducir tanto un mayor déficit como una mayor activación sérica de esas vías respecto de la vía clásica en los pacientes con LES. En cuanto a la vía de las lectinas, la observación de valores bajos en la prueba funcional es consistente con la evidencia que existe

hasta la fecha, ya que se han identificado con frecuencia déficits de las moléculas que integran esta vía, tanto en la población general como en el LES.²⁵ Por contra, los valores de la prueba funcional de la vía alternativa que se han descrito en población sana siguen una distribución normal.²⁶ Se sabe que la vía alternativa se ve influenciada en gran medida por la activación del complemento en las otras vías, y que cuando esto sucede la convertasa de C3 ejerce una retroalimentación positiva sobre todo el sistema que redundante a su vez en una mayor activación de la vía alternativa (asa amplificadora). Por otra parte, los pacientes con LES presentan con mayor frecuencia que la población general mutaciones y autoanticuerpos que afectan a las moléculas del complemento y sus reguladores, y que pueden motivar tanto pérdida como ganancia de función.²⁷ La suma de estos factores podría explicar los valores bajos en la prueba funcional de la vía alternativa en el LES, tanto por mecanismos de activación como de déficit.

En cuanto a las interrelaciones de los parámetros del complemento, observamos correlaciones positivas de las moléculas séricas entre sí y con las pruebas funcionales, y viceversa. Estas relaciones también fueron positivas con la proteína activa C3a. A diferencia de los zimógenos, la molécula C3a se genera como consecuencia de la proteólisis de C3 durante la activación del complemento, por lo que a priori se esperaría una correlación negativa con el resto de los parámetros. Sin embargo, algunos mecanismos conocidos en la biología del complemento, como la hiperproducción hepática de zimógenos en situaciones inflamatorias (reactantes de fase aguda), la producción espontánea de C3a debida a la hidrólisis basal del zimógeno C3 (tick over constitutivo de la vía alternativa), y la secreción de C3 al medio extracelular por parte de las células T y los monocitos bajo determinados estímulos (complosoma),²⁸ podrían explicar nuestros hallazgos. Por otra parte, las únicas moléculas que no mostraron relaciones significativas con el resto de los parámetros del complemento fueron

los factores D y H. Se conoce que los niveles plasmáticos del factor D no se ven afectados por la activación sérica del complemento, debido a su rápido metabolismo en el riñón.²⁹ Respecto al factor H, se han descrito mutaciones y autoanticuerpos que conllevan una pérdida de su función en otras enfermedades inmunomediadas que comparten manifestaciones con el LES, como las microangiopatías trombóticas y algunas glomerulopatías.^{30,31} Creemos que estos factores podrían explicar al menos en parte nuestros resultados. En cualquier caso, nuestros hallazgos sobre la interrelación de las diferentes moléculas y pruebas funcionales del complemento ponen de manifiesto la gran complejidad y redundancia de este sistema biológico en el LES, sin que sea posible inferir un patrón de relación concreto que represente a la totalidad de estos pacientes.

En nuestro estudio encontramos asociación del SLEDAI-2K clínico con niveles más altos de la proteína activa circulante C3a, lo que denota mayor activación sérica del complemento en pacientes con mayor actividad clínica. Sin embargo, el SLEDAI-2K completo, que incluye parámetros de laboratorio entre los que se encuentran la prueba funcional hemolítica de la vía clásica (CH50) y los zimógenos inactivos C3 y C4, no se asoció con C3a. Cabe recordar que se ha cuestionado la capacidad de la herramienta SLEDAI-2K para reflejar con precisión el estado de actividad del LES debido a la exclusión de determinadas manifestaciones graves, a la ponderación un tanto arbitraria de los distintos ítems y a la imposibilidad de graduar la gravedad de cada uno de ellos.³² Por otra parte, valores bajos de los zimógenos y de la prueba funcional de la vía clásica no necesariamente implican activación del complemento, sino que en un porcentaje no desdeñable de pacientes son secundarios a déficits genéticos.³³ En este sentido, y de acuerdo con nuestros resultados, la herramienta SLEDAI-2K no sería un instrumento ideal para detectar manifestaciones derivadas del estado de activación del complemento en el LES.

En nuestro trabajo se analiza por primera vez la relación entre el sistema del complemento y el daño acumulado en esta enfermedad. Encontramos asociaciones positivas del SDI con las pruebas funcionales y moléculas plasmáticas de las tres vías, incluida la anafilotoxina C3a. Se sabe que la unión de las anafilotoxinas a sus receptores celulares inicia cascadas de inflamación y vasodilatación que conducen a la activación de diferentes tipos celulares, incluidos monocitos y macrófagos.³⁴ Por otra parte, la activación del complemento puede ocurrir de manera intracelular, con la consiguiente producción y liberación autocrina de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y VEGF soluble.^{35,36} Además, el complemento está implicado en procesos de angiogénesis, movilización de progenitores hematopoyéticos y reparación tisular.^{36,37} La participación del sistema del complemento en estos procesos biológicos relacionados con la inflamación explicaría nuestros resultados sobre su asociación con el daño acumulado en el LES.

En cuanto a los autoanticuerpos, los estudios realizados hasta ahora no han analizado su relación con las pruebas funcionales de las tres vías del complemento sino más bien con algunas de sus moléculas plasmáticas. Se ha descrito asociación entre los anti-Sm, anti-ADN, anti-SSA y anti- β 2 glicoproteína con las moléculas C3, C4 y C3a,^{30,38-40} mientras que otros autores no han encontrado relación entre los anti-RNP y C3 y C4.⁴¹ En nuestro trabajo, analizamos el vínculo entre los autoanticuerpos y el sistema del complemento de manera global, incluyendo no solo las moléculas plasmáticas, sino también pruebas funcionales de nueva generación, que permiten inferir la situación de cada vía. En este sentido, encontramos que los autoanticuerpos relacionados de forma más potente con el sistema del complemento son los anti-ribosoma y los anti-nucleosoma, con predominio de la vía de las lectinas y de la vía clásica respectivamente. También demostramos relación con los anticuerpos antifosfolípidos. Se sabe que las cascadas de la coagulación y del complemento están interconectadas, de manera que la activación de un

sistema puede motivar la activación del otro y viceversa.⁴² De hecho, en pacientes con síndrome antifosfolípido se han descrito niveles más altos del complejo de ataque a membrana (C5b-9, molécula final común a las tres vías) y niveles bajos de zimógenos y/o elevados de los productos activos C3a y Bb,⁴³⁻⁴⁵ todo lo cual denota activación del complemento. Concretamente, el anticuerpo antifosfolípido relacionado de manera más potente con el sistema del complemento en nuestro estudio fue el anti-β2glicoproteína de isotipo IgG, a expensas de la vía alternativa. Este hallazgo es muy consistente con el conocimiento actual sobre el síndrome antifosfolípido, cuya fisiopatología se vincula al sistema del complemento y en cuya etiopatogenia se consideran un elemento clave los anticuerpos anti-β2glicoproteína.⁴⁶

Actualmente se sabe que el complemento juega un papel determinante en la fisiopatología de muchas enfermedades, no solo autoinmunes e infecciosas, sino también neurodegenerativas. Cada vez son más las compañías farmacéuticas que se centran en el desarrollo de fármacos capaces de modular las cascadas del complemento a diferentes niveles, y cada año se expande el campo de investigación en áreas de la Medicina donde la participación de este sistema biológico se considera clave. En este sentido, creemos que un mejor conocimiento del papel del complemento en el LES, como se refleja en nuestro estudio, puede allanar el camino hacia el desarrollo de fármacos dirigidos contra esta diana terapéutica en estos pacientes.

Cabe reseñar que nuestro trabajo es fundamentalmente exploratorio, es decir, las relaciones entre las características de la enfermedad y los parámetros del complemento se muestran de manera descriptiva. El hecho de que algunas de las correlaciones observadas no alcanzaran la significación estadística no debe interpretarse como una limitación en sí misma, ya que diversas manifestaciones eran muy infrecuentes. Además, la representación de estas relaciones a través

de mapas de calor permite identificar patrones de actividad del complemento para determinadas formas de expresión de la enfermedad. No obstante, su diseño transversal imposibilita establecer relaciones de causalidad. En este sentido, la implicación de las alteraciones del complemento en la expresión del LES deberá confirmarse en estudios prospectivos. Por otra parte, nos centramos en el análisis de pacientes y no incluimos controles sanos. Además, no realizamos estudio genético ni detección de autoanticuerpos dirigidos contra moléculas del complemento, factores que se han asociado con el riesgo de desarrollar LES y con algunas de sus manifestaciones.

Destacamos como una de las fortalezas de nuestro trabajo el empleo de pruebas funcionales de última generación basadas en ELISA (y no en los métodos hemolíticos tradicionales) para analizar el estado de actividad de cada vía del complemento. Estas pruebas han sido validadas y han demostrado correlacionarse adecuadamente con las hemolíticas clásicas, y se consideran superiores a éstas en cuanto a su mayor facilidad de uso, mayor estabilidad y calidad de sus reactivos, y mayor objetividad a la hora de interpretar sus resultados.⁴⁷ De hecho, es cada vez más frecuente encontrar en la literatura trabajos que emplean esta tecnología para analizar la situación del complemento en diversas enfermedades, como por ejemplo vasculitis, enfermedades hematológicas, retinopatías, COVID-19, etc.⁴⁸⁻⁵²

El sistema del complemento se relaciona con la resistencia a la insulina en el lupus eritematoso sistémico

The complement system is linked to insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus

M. García-González¹, F. Gómez-Bernal², J.C. Quevedo-Abeledo³, Y. Fernández-Cladera², A.F. González-Rivero², R. López-Mejías⁴, F. Díaz-González^{1,5}, M.Á. González-Gay^{6,7,8}, I. Ferraz-Amaro^{1,5}

¹Division of Rheumatology, ²Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ³Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ⁴Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain; ⁵Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), Tenerife, Spain; ⁶Division of Rheumatology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ⁷University of Cantabria, IDIVAL, Santander, Spain; ⁸Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa.

Clinical and Experimental Rheumatology 2024; 42: 115-121.

Este estudio es el primero en la literatura que ha analizado el vínculo entre la resistencia a la insulina y el sistema del complemento sérico en el LES, evaluando dicho sistema biológico de manera integral a través de la medición no solo de sus zimógenos, sino también de proteínas activas, reguladores y pruebas funcionales de las tres vías. De acuerdo con nuestros hallazgos, la resistencia a la insulina y el complemento se asocian de manera independiente en pacientes con LES. Concretamente, nuestros resultados reflejan un papel predominante de los elementos de la vía alternativa.

En trabajos previos se han descrito mayores niveles de resistencia a la insulina y de péptido C en pacientes con LES que en controles.^{53,54} En nuestra serie, los valores del índice HOMA2-IR estaban en torno a la unidad, es decir, no eran elevados. Creemos que las características basales de nuestra cohorte explican estas diferencias, ya que en estudios anteriores no se excluía específicamente a los pacientes con diabetes mellitus y se incluían con mayor frecuencia sujetos

en tratamiento con glucocorticoides y con índices de masa corporal superiores a los de nuestra muestra.⁵⁵⁻⁵⁷ Sin embargo, los valores del índice HOMA2-B%-péptido C en nuestra serie sí eran elevados. Se sabe que en procesos inflamatorios crónicos, como la artritis reumatoide y el LES, los niveles de péptido C se elevan con independencia de otros factores de riesgo de resistencia a la insulina. Dicha elevación sucede en un contexto de disfunción de la célula beta pancreática, probablemente precipitado por citocinas inflamatorias y mecanismos autoinmunes.^{54,58} La demostración en nuestros pacientes de niveles normales de HOMA2-IR con niveles elevados de HOMA2-B%-péptido C podría corresponder por tanto con un estadio previo al desarrollo de resistencia a la insulina. En este escenario de disfunción basal de la célula beta se ponen en marcha mecanismos celulares de compensación que inicialmente consiguen mantener la glucemia en niveles normales. A medida que avanza el daño sobre la célula, y sobre todo cuando se añaden factores periféricos como la obesidad o fármacos como los corticoides, los mecanismos compensadores son insuficientes, y aparece la hiperglucemia.⁵⁹ De hecho, en nuestra serie, tanto el índice de daño (SDI) como el de gravedad de Katz se asociaron con el índice HOMA2-B%-péptido C y no con el HOMA2-IR. Este hallazgo refuerza la noción de que los mecanismos fisiopatológicos del LES impactan sobre la célula beta independientemente de la situación periférica de resistencia a la insulina, y son consistentes con los observados en modelos murinos de LES.⁶⁰

Además, encontramos asociación entre el índice HOMA2-B%-péptido C y los anticuerpos anti-SSB/La. Aunque la función de las proteínas de los antígenos SSB/La y SSA/Ro aún no se conoce con precisión, se las relaciona con mecanismos de adaptación celular al estrés y de autofagia. Se cree que desempeñan funciones de chaperona y ubiquitina, estabilizando el ARN mensajero y otras formas de ARN no codificantes, y eliminando moléculas mal plegadas.⁶¹⁻⁶³

Curiosamente, se ha descrito que la célula beta pancreática es muy sensible al estrés celular derivado del retículo endoplasmático, uno de cuyos principales desencadenantes es el acúmulo intracelular de proteínas.⁵⁹ Quizás, la presencia de anticuerpos anti-SSB/La podría empeorar la disfunción de la célula beta y explicar la relación entre el índice HOMA2-B%-péptido C y estos autoanticuerpos. En cuanto al índice HOMA2-IR, aparte de la asociación con los factores clínicos que integran la definición de síndrome metabólico, encontramos mayores niveles de resistencia a la insulina entre los pacientes que recibían micofenolato de mofetilo. Un estudio previo sobre el riesgo de desarrollar diabetes inducida por corticoides en el LES demostró una relación independiente con este fármaco, pero los mecanismos por los que esto sucede se desconocen.⁶⁴

El 33% de los pacientes de nuestra serie cumplía con la definición del NCEP/ATPIII de síndrome metabólico. Esta frecuencia es similar a la descrita en otros trabajos, que oscila entre el 18% y el 30% dependiendo de la definición empleada, el tamaño muestral, la edad de los pacientes, su distribución por sexo, etc.⁵ Nuestros pacientes con síndrome metabólico exhibían mayor daño acumulado y recibían hidroxiclороquina con menor frecuencia. Hallazgos similares a éstos han sido observados en otra serie de LES.⁶⁵ Además, en estudios previos se ha sugerido un efecto protector de los antimaláricos sobre el síndrome metabólico y sus complicaciones en esta enfermedad autoinmune, si bien la evidencia es pobre.^{66,67} Su potencial efecto beneficioso podría explicarse por diversos mecanismos como la reducción del estrés oxidativo, la mejora de la función endotelial, la activación de la vía de señalización de la insulina y la inhibición de la lipogénesis.⁶⁸

En nuestro trabajo, el índice HOMA2-IR se asocia de manera significativa e independiente con niveles más altos de la proteína activa C3a y el regulador FH, elementos comunes a las tres vías. Además, muestra una tendencia a la asociación con niveles más altos en la prueba

funcional de la vía alternativa. Por otra parte, la presencia de síndrome metabólico se asocia con niveles más altos de las proteínas inactivas C1q y C3 tras ajustar por posibles confusores, mientras que solo mantiene una tendencia a la asociación con el factor D. Aunque la activación de la vía clásica por inmunocomplejos es uno de los mecanismos fisiopatológicos del LES, este patrón de asociación positiva entre los parámetros del complemento y la resistencia a la insulina no parece corresponder con dicha situación. En un escenario de activación sérica del complemento, independientemente de cuál haya sido su origen, la proteína activa C3a aumenta, pero C3, FH y la prueba funcional de la vía alternativa deberían disminuir. Se sabe que muchas de las proteínas del complemento aumentan en situaciones inflamatorias y que la activación de este sistema biológico puede suceder de forma intracelular, a través de la interacción de sus proteínas con las células del sistema inmunitario y otros tejidos (activación no canónica).²⁸ Así, en situaciones inflamatorias, estas células, entre las que destacan los monocitos y los linfocitos T, liberan al medio C1q y C3, y estas proteínas interactúan con las células musculares y los adipocitos, desencadenando vías de señalización intracelular relacionadas o no con el sistema del complemento. De hecho, valores altos de C3, C3a y FH se han asociado con la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2,⁷ y valores altos de C1q con la muerte de los adipocitos y el envejecimiento muscular.⁶⁹

No hemos encontrado en la literatura estudios que hayan analizado la asociación entre el sistema del complemento evaluado de forma integral, incluyendo pruebas funcionales, zimógenos, proteínas activas y reguladores de sus tres vías, con la resistencia a la insulina en el LES. Otros autores también han descrito asociaciones positivas entre el síndrome metabólico y el zimógeno C3. Concretamente, en un trabajo previo que incluía 50 mujeres con LES, las pacientes con síndrome metabólico presentaban mayores concentraciones séricas de C3 y C4.⁷⁰

De forma similar, en otra serie con 114 pacientes con LES, de los que el 16% cumplía criterios de síndrome metabólico, se encontró relación entre dicho síndrome y niveles más altos de C3, pero no de C4.⁷¹ Por el contrario, en un estudio de 200 mujeres con LES, entre las 10 pacientes que presentaban C3 bajo (medido como variable binaria, no continua), se observó un mayor odds ratio de síndrome metabólico.⁷² Comparado con la evidencia previa, en nuestro trabajo incluimos un mayor número de pacientes, realizamos una caracterización del sistema del complemento sérico mucho más exhaustiva, estimamos la resistencia a la insulina mediante la definición de síndrome metabólico, pero también mediante el instrumento HOMA2, y llevamos a cabo un análisis multivariable. Por todo ello, creemos que nuestros resultados ilustran mejor la relación entre el complemento y la resistencia a la insulina en pacientes con LES.

Sin embargo, nuestro estudio presenta algunas limitaciones. Al tratarse de un diseño transversal, no podemos inferir causalidad, ya que se desconoce el orden en que aparecen los eventos. Además, no incluimos controles sanos. Por último, para evaluar la existencia de resistencia a la insulina utilizamos la herramienta HOMA2 y no la prueba del clamp hiperinsulinémico-euglucémico, considerada como patrón oro. Sin embargo, esta técnica es muy compleja y difícil de aplicar en grandes series de pacientes (como la reclutada en nuestro trabajo) y el método HOMA ha demostrado correlacionarse de forma adecuada con ella.²²

Serán necesarios futuros estudios basados en transcriptómica, proteómica y metabolómica, que puedan analizar de forma integral los cambios inducidos por la activación del complemento sobre la homeostasis de la glucosa, y explorar el potencial de las terapias dirigidas contra este sistema biológico para mejorar la sensibilidad a la insulina y el control glucémico en los pacientes con LES. Asimismo, serían interesantes estudios longitudinales que permitan

establecer asociaciones causales entre el estado de actividad del complemento sérico y los trastornos metabólicos relacionados con la glucosa y la insulina.

Article

HDL Cholesterol Efflux and the Complement System Are Linked in Systemic Lupus Erythematosus

María García-González ¹, Fuensanta Gómez-Bernal ², Juan C. Quevedo-Abeledo ³, Yolanda Fernández-Cladera ², Agustín F. González-Rivero ², Raquel López-Mejías ⁴, Federico Díaz-González ^{1,5}, Miguel Á. González-Gay ^{6,7,*} and Iván Ferraz-Amaro ^{1,5,*}

¹ Division of Rheumatology, Hospital Universitario de Canarias, 38320 Tenerife, Spain; maraggon23@hotmail.com (M.G.-G.); federico.diaz.gonzalez@gmail.com (F.D.-G.)

² Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, 38320 Tenerife, Spain; fuensanta95@gmail.com (F.G.-B.); yolanda.fernandezcladera@gmail.com (Y.F.-C.); afgonri@gmail.com (A.F.G.-R.)

³ Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; quevedojcarlos@yahoo.es

⁴ Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Instituto de Investigación sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, Spain; rlopezmejias78@gmail.com

⁵ Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), 38200 Tenerife, Spain

⁶ Division of Rheumatology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain

⁷ Department of Medicine and Psychiatry, University of Cantabria, 39005 Santander, Spain

* Correspondence: miguelaggay@hotmail.com (M.Á.G.-G.); iferrazamaro@hotmail.com (I.F.-A.)

El complemento y la capacidad de transferencia de colesterol están relacionados en el lupus eritematoso sistémico

Este trabajo es una extensión de un estudio previo de nuestro grupo en el que se analizó la capacidad de transferencia de colesterol en el LES. En dicho estudio, encontramos que los pacientes exhibían (en comparación con controles emparejados) una menor capacidad de transferencia y que esa situación se asociaba de manera independiente con la presencia de placa carotídea.⁷³ En el trabajo actual, por primera vez en la literatura, analizamos la relación entre el flujo reverso de colesterol y el sistema del complemento en el LES. A la luz de nuestros resultados, la disfunción del complemento sérico que aparece en estos pacientes podría estar relacionada con los mecanismos que conducen a la reducción de la capacidad de transferencia de colesterol observada en esta enfermedad autoinmune.

Dependiendo del estado de equilibrio entre sus activadores y reguladores, el sistema del complemento puede mitigar o promover la aparición de daño tisular y enfermedad. En este sentido, cada vez es mayor la evidencia sobre el papel que juega la expresión del complemento sérico en el desarrollo de la aterosclerosis.⁷⁴ Se ha descrito que los niveles circulantes del zimógeno C5, perteneciente a la vía terminal común, están significativamente elevados en pacientes con aterosclerosis subclínica, y que estos niveles se correlacionan con el volumen de las placas de ateroma y la calcificación en las arterias coronarias.⁷⁵ Además, en pacientes con

enfermedad arterial periférica sintomática, niveles séricos elevados de la proteína activa C5a son predictores de futuros eventos cardiovasculares independientemente de los valores de los reactantes de fase aguda.⁷⁶ De forma similar, se ha encontrado asociación entre los niveles séricos del complejo de ataque a membrana (C5b-9) y la inestabilidad de las placas de ateroma en las carótidas y el riesgo de ictus.⁷⁷

Por otro lado, los niveles séricos de colesterol HDL se relacionan de manera inversa con los eventos cardiovasculares. Su efecto beneficioso deriva no solo de su concentración plasmática, sino de sus propiedades funcionales, concretamente de su capacidad de transporte reverso de colesterol. De hecho, se ha demostrado una relación inversa entre el flujo reverso de colesterol y el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y/o de sufrir eventos cardiovasculares.⁷⁸⁻⁸⁰ Parece que este fenómeno ocurre no solo en población general, sino también en enfermedades inflamatorias inmunomediadas,⁸¹⁻⁸³ si bien los mecanismos íntimos que vinculan la inflamación con la capacidad de transferencia de colesterol no se han establecido, y pueden no ser comunes en todas ellas. En este sentido, en un estudio previo de nuestro grupo en el que se compararon pacientes con artritis reumatoide y pacientes con LES, estos últimos presentaban una menor capacidad de transferencia de colesterol incluso en presencia de mayores niveles de HDL, con independencia del estado de actividad de la enfermedad, el uso de estatinas, y la presencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos.⁸⁴

En el trabajo que presentamos ahora, encontramos una relación negativa entre los valores séricos de la proteína activa C3a y los niveles de HDL, lo que traduce un perfil lipídico de riesgo de aterosclerosis en situaciones de activación del complemento sérico. Además, observamos valores más altos de parámetros de la vía clásica (C1q, C2, C4, C1-inh) y de la vía alternativa (test funcional, FD y FH) en relación con moléculas proaterogénicas como los triglicéridos, el

colesterol no HDL, las apolipoproteínas B, y las lipoproteínas (a). Este patrón de elevación tanto de las pruebas funcionales como de los zimógenos y reguladores del complemento suele corresponder con un aumento inespecífico en la producción hepática de estas proteínas en respuesta a una situación de inflamación. En este sentido, cabe recordar que la aterosclerosis se considera una enfermedad fundamentalmente inflamatoria.⁶

No hemos encontrado en la literatura estudios en pacientes con LES en los que se haya analizado de manera exhaustiva la relación entre el perfil lipídico y el sistema del complemento sérico. Los trabajos de otros autores sobre este tema se han centrado solo en el análisis de los parámetros de la vía alternativa, y lo han hecho en población general. Sus resultados sugieren una relación entre los elementos de esta vía y el metabolismo y la función de las lipoproteínas circulantes. Por ejemplo, se ha descrito asociación entre el FD y los niveles de triglicéridos,⁸⁵ entre C3 y el colesterol total, los triglicéridos y apolipoproteínas A1 deletéreas,⁸⁶ y entre C3 y los factores D y H y lipoproteínas aterogénicas.⁸⁷

En relación con el flujo reverso de colesterol, en nuestro trabajo, tras un análisis multivariable, demostramos que la capacidad de transferencia se asocia con los zimógenos C2 y C3 de manera positiva y con la prueba funcional de la vía alternativa de manera negativa. Esto significa que el flujo reverso de colesterol es peor en situaciones en las que los niveles de C2 y C3 son bajos pero los del test funcional de la vía alternativa son altos. Es difícil inferir un determinado patrón de expresión del complemento en su relación con la capacidad de transferencia de colesterol que aúne estos hallazgos. Por un lado, en un escenario inflamatorio, esperaríamos encontrar un aumento de estos tres parámetros, mientras que, en una situación de activación sérica del complemento, los tres deberían estar disminuidos.

Cabe reseñar que las mutaciones en el gen de C2, zimógeno común a la vía clásica y de las lectinas, conllevan menores niveles séricos de esta proteína, y que estas mutaciones se asocian con una prevalencia de LES del 10%.⁸⁸ Además, recientemente se ha descrito una interacción entre la vía clásica y la alternativa, que garantiza que la activación de la vía clásica se transmita a lo largo de toda la cascada del complemento incluso en ausencia de C2 sérico, gracias a la interacción del factor B con C4 y la formación de una convertasa híbrida C4bBb. Esta convertasa resulta mucho menos eficiente que la convertasa C4b2b en su generación de C3b a partir de C3, pero posibilita la generación del mínimo necesario para poner en marcha el asa amplificadora de la vía alternativa.⁸⁹

En cuanto a C3, se ha constatado que niveles bajos de este zimógeno se relacionan con un perfil lipídico proaterogénico y con mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis, tanto en modelos murinos como en estudios in vitro.⁹⁰⁻⁹³ Además, se sabe que los pacientes con LES pueden desarrollar anticuerpos dirigidos contra las proteínas y reguladores del complemento, que pueden derivar en una regulación tanto al alza como a la baja de las distintas cascadas, ya sea en el suero o en los tejidos.²⁷

Por último, cada vez es mayor la evidencia sobre las funciones no canónicas del complemento, que muchas veces dependen del complosoma (complemento intracelular), y que no precisan de una situación previa de activación sérica.²⁸ Por ejemplo, se ha descrito que C1q unido a inmunocomplejos es capaz de inhibir la colesterol-27-hidroxilasa que se expresa en el endotelio y en líneas celulares de monocitos/macrófagos, disminuyendo el flujo reverso de colesterol y facilitando el desarrollo de aterosclerosis.⁹⁴ Creemos que la combinación de estas evidencias podría explicar nuestros resultados sobre la capacidad de transferencia de colesterol y el sistema del complemento sérico en el LES.

El diseño transversal de nuestro estudio impide conocer el orden de los eventos observados y por tanto no permite establecer relaciones causales. Además, nos centramos en pacientes con LES y no incluimos controles. No obstante, analizamos una serie muy amplia y evaluamos el perfil lipídico y el sistema del complemento de manera exhaustiva a través de sus componentes séricos y de sus pruebas funcionales, lo que supone una ventaja respecto de estudios previos. Aunque la mayoría de los pacientes mostraban niveles bajos de actividad del LES, no creemos que el estado de actividad de la enfermedad haya condicionado los resultados en cuanto a la asociación del flujo reverso de colesterol y el complemento, ya que los parámetros derivados de ella no se relacionaron con la capacidad de transferencia de colesterol.

VII. Conclusiones

Conclusiones

- Existe una elevada complejidad en la interpretación del estado de actividad del sistema del complemento sérico en el lupus eritematoso sistémico. Las tres vías, no solo la vía clásica, parecen estar afectadas en estos pacientes.
- Las alteraciones en las diferentes cascadas del complemento se relacionan con la expresión de la enfermedad en cuanto a sus manifestaciones clínicas, serológicas, actividad y daño.
- Los anticuerpos anti-ADN, anti-ribosoma y anti-nucleosoma se relacionan predominantemente con la actividad de la vía clásica y de las lectinas, y los anti- β 2glicoproteína con la actividad de la vía alternativa.
- La activación del sistema del complemento sérico se relaciona con la actividad de la enfermedad, mientras que valores elevados de las moléculas plasmáticas y de las pruebas funcionales, fundamentalmente de la vía clásica, se relacionan con el daño acumulado.
- La resistencia a la insulina en los pacientes con lupus eritematoso sistémico se asocia predominantemente con niveles altos de moléculas activas y reguladores de la vía alternativa.
- El flujo reverso de colesterol se asocia tanto con zimógenos comunes a la vía clásica y de las lectinas, como con elementos de la vía alternativa. Los mecanismos que conducen a esta asociación no parecen depender de la activación sérica del complemento.

VIII. Bibliografía

Bibliografía

1. Wigren M, Nilsson J, Kaplan MJ. Pathogenic immunity in systemic lupus erythematosus and atherosclerosis: common mechanisms and possible targets for intervention. *J Intern Med.* 2015;278(5):494-506.
2. Schoenfeld SR, Kasturi S, Costenbader KH. The epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease among patients with SLE: A systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43(1):77-95.
3. Liu Y, Yu X, Zhang W, Zhang X, Wang M, Ji F. Mechanistic insight into premature atherosclerosis and cardiovascular complications in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2022;132:102863.
4. Bruce IN. «Not only...but also»: factors that contribute to accelerated atherosclerosis and premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl.* 2005;44(12):1492-502.
5. Mok CC. Metabolic syndrome and systemic lupus erythematosus: the connection. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15(7):765-75.
6. Speidl WS, Kastl SP, Huber K, Wojta J. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *J Thromb Haemost.* 2011;9(3):428-40.
7. Ajjan RA, Schroeder V. Role of complement in diabetes. *Mol Immunol.* 2019;114:270-7.
8. Holers VM. Complement and Its Receptors: New Insights into Human Disease. *Annu Rev Immunol.* 2014;32(1):433-59.
9. Sharma M, Vignesh P, Tiewsoh K, Rawat A. Revisiting the complement system in systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020;16(4):397-408.
10. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1601-6.

11. Galindo-Izquierdo M, Pablos Alvarez JL. Complement as a Therapeutic Target in Systemic Autoimmune Diseases. *Cells*. 2021;10(1):148.
12. González LA, Ugarte-Gil MF, Alarcón GS. Systemic lupus erythematosus: The search for the ideal biomarker. *Lupus*. 2021;30(2):181-203.
13. Weinstein A, Alexander RV, Zack DJ. A Review of Complement Activation in SLE. *Curr Rheumatol Rep*. 2021;23(3):16.
14. Lambers WM, Westra J, Bootsma H, De Leeuw K. From incomplete to complete systemic lupus erythematosus; A review of the predictive serological immune markers. *Semin Arthritis Rheum*. 2021;51(1):43-8.
15. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1725-1725.
16. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002;29(2):288-91.
17. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Sanchez-Guerrero J, et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics/American college of rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1996;39(3):363-9.
18. Mosca M, Bombardieri S. Assessing remission in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2006;24(6 Suppl 43):S-99-104.
19. Katz JD, Senegal JL, Rivest C, Goulet JR, Rothfield N. A Simple Severity of Disease Index for Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus*. 1993;2(2):119-23.
20. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1737-40.

21. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295-306.
22. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1487-95.
23. Expert Panel On Detection, Evaluation, And Treatment Of High Blood Cholesterol In Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.
24. de la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, Cuchel M, Rader DJ, Rothblat GH. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):796-801.
25. Troldborg A, Thiel S, Trendelenburg M, Friebus-Kardash J, Nehring J, Steffensen R, et al. The Lectin Pathway of Complement Activation in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol.* 2018;45(8):1136-44.
26. Palarasah Y, Nielsen C, Sprogøe U, Christensen ML, Lillevang S, Madsen HO, et al. Novel assays to assess the functional capacity of the classical, the alternative and the lectin pathways of the complement system. *Clin Exp Immunol.* 2011;164(3):388-95.
27. Hristova MH, Stoyanova VS. Autoantibodies against complement components in systemic lupus erythematosus – role in the pathogenesis and clinical manifestations. *Lupus.* 2017;26(14):1550-5.
28. Singh P, Kemper C. Complement, complosome, and complotype: A perspective. *Eur J Immunol.* 2023;53(12):2250042.

29. Sekine H, Machida T, Fujita T, Factor D. *Immunol Rev.* 2023;313(1):15-24.
30. Liszewski MK, Atkinson JP. Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *J Intern Med.* 2015;277(3):294-305.
31. Vaught AJ, Braunstein EM, Jasem J, Yuan X, Makhlin I, Eloundou S, et al. Germline mutations in the alternative pathway of complement predispose to HELLP syndrome. *JCI Insight.* 2018;3(6):e99128.
32. Ohmura K. Which is the best SLE activity index for clinical trials? *Mod Rheumatol.* 2021;31(1):20-8.
33. Schröder-Braunstein J, Kirschfink M. Complement deficiencies and dysregulation: Pathophysiological consequences, modern analysis, and clinical management. *Mol Immunol.* 2019;114:299-311.
34. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;2:262.
35. Arbore G, Kemper C, Kolev M. Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Mol Immunol* 2017;89:2-9.
36. Markiewski MM, Daugherty E, Reese B, Karbowiczek M. The Role of Complement in Angiogenesis. *Antibodies* 2020;9(4):67.
37. Mastellos DC, DeAngelis RA, Lambris JD. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Semin Immunol* 2013;25(1):29-38.
38. Cai YH, Deng J, Chen ZL, Mei H, Tang L, Luo SS, et al. Brief report on the relation between complement C3a and anti dsDNA antibody in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* 2022;12(1):7098.
39. Iwasaki T, Doi H, Tsuji H, Tabuchi Y, Hashimoto M, Kitagori K, et al. Phenotypic landscape of systemic lupus erythematosus: An analysis of the Kyoto Lupus Cohort. *Mod Rheumatol* 2022;32(3):571-6.
40. Naranjo L, Stojanovich L, Djokovic A, Andreoli L, Tincani A, Maślińska M, et al. Circulating immune-complexes of IgG/IgM bound to B2-glycoprotein-I associated with complement consumption and thrombocytopenia in antiphospholipid syndrome. *Front Immunol* 2022;13:957201.

41. Hubbard EL, Pisetsky DS, Lipsky PE. Anti-RNP antibodies are associated with the interferon gene signature but not decreased complement levels in SLE. *Ann Rheum Dis* 2022;81(5):632-43.
42. Foley JH, Conway EM. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ Res* 2016;118(9):1392-408.
43. Breen KA, Seed P, Parmar K, Moore GW, Stuart-Smith SE, Hunt BJ. Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2012;107(03):423-9.
44. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009;68(6):1030-5.
45. Yelnik CM, Lambert M, Drumez E, Martin C, Grolaux G, Launay D, et al. Relevance of inflammatory and complement activation biomarkers profiling in antiphospholipid syndrome patients outside acute thrombosis. *Clin Exp Rheumatol* 2023;41(9):1875-81.
46. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. Longo DL, editor. *N Engl J Med* 2018;378(21):2010-21.
47. Brandwijk RJMGE, Michels MAHM, Van Rossum M, De Nooijer AH, Nilsson PH, De Bruin WCC, et al. Pitfalls in complement analysis: A systematic literature review of assessing complement activation. *Front Immunol* 2022;13:1007102.
48. Kojima T, Inoue D, Wajima T, Uchida T, Yamada M, Ohsawa I, et al. Circulating immune-complexes and complement activation through the classical pathway in myeloperoxidase-ANCA-associated glomerulonephritis. *Ren Fail* 2022;44(1):714-23.
49. Selvaskandan H, Kay Cheung C, Dormer J, Wimbury D, Martinez M, Xu G, et al. Inhibition of the Lectin Pathway of the Complement System as a Novel Approach in the Management of IgA Vasculitis-Associated Nephritis. *Nephron* 2020;144(9):453-8.

50. Khan AH, Pierce CO, De Salvo G, Griffiths H, Nelson M, Cree AJ, et al. The effect of systemic levels of TNF-alpha and complement pathway activity on outcomes of VEGF inhibition in neovascular AMD. *Eye* 2022;36(11):2192-9.
51. Holter JC, Pischke SE, De Boer E, Lind A, Jenum S, Holten AR, et al. Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients. *Proc Natl Acad Sci* 2020;117(40):25018-25.
52. Diatlov D, Bohorquez A, Jackson M, Cheong M, Kahr WHA, Kuo KHM, et al. Pediatric Sickle Cell Disease: A Potential Role for the Complement System. *Blood* 2022;140(Supplement 1):2517-8.
53. García-Carrasco M, Mendoza-Pinto C, Munguía-Realpozo P, Etchegaray-Morales I, Vélez-Pelcastre SK, Méndez-Martínez S, et al. Insulin Resistance and Diabetes Mellitus in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Endocr Metab Immune Disord - Drug Targets* 2023;23(4):503-14.
54. García-Dorta A, Quevedo-Abeledo JC, Rua-Figueroa Í, De Vera-González AM, González-Delgado A, Medina-Vega L, et al. Beta-cell function is disrupted in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2021;60(8):3826-33.
55. Sada KE, Yamasaki Y, Maruyama M, Sugiyama H, Yamamura M, Maeshima Y, et al. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006;33(8):1545-52.
56. Chung C, Long A, Solus J, Rho Y, Oeser A, Raggi P, et al. Adipocytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to inflammation, insulin resistance and coronary atherosclerosis. *Lupus* 2009;18(9):799-806.
57. Sabio JM, Vargas-Hitos J, Zamora-Pasadas M, Mediavilla JD, Navarrete N, Ramirez Á, et al. Metabolic Syndrome Is Associated with Increased Arterial Stiffness and Biomarkers of Subclinical Atherosclerosis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2009;36(10):2204-11.

58. Ferraz-Amaro I, García-Dopico JA, Medina-Vega L, González-Gay MA, Díaz-González F. Impaired beta cell function is present in nondiabetic rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2013;15(1):R17.
59. Cerf ME. Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;27(4):37.
60. Gabriel CL, Smith PB, Mendez-Fernandez YV, Wilhelm AJ, Ye AM, Major AS. Autoimmune-mediated glucose intolerance in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303(11):E1313-24.
61. Sommer G, Heise T. Role of the RNA-binding protein La in cancer pathobiology. *RNA Biol* 2021;18(2):218-36.
62. Boccitto M, Wolin SL. Ro60 and Y RNAs: structure, functions, and roles in autoimmunity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2019;54(2):133-52.
63. Kimura T, Jain A, Choi SW, Mandell MA, Johansen T, Deretic V. TRIM-directed selective autophagy regulates immune activation. *Autophagy* 2017;13(5):989-90.
64. Ha Y, Lee KH, Jung S, Lee SW, Lee SK, Park YB. Glucocorticoid-induced diabetes mellitus in patients with systemic lupus erythematosus treated with high-dose glucocorticoid therapy. *Lupus* 2011;20(10):1027-34.
65. Mok CC, Tse SM, Chan KL, Ho LY. Effect of the metabolic syndrome on organ damage and mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2018;36(3):389-95.
66. Muniz LF, Pereira RMR, Silva TF, Bonfá E, Borba EF. Impact of Therapy on Metabolic Syndrome in Young Adult Premenopausal Female Lupus Patients: Beneficial Effect of Antimalarials. *Arthritis Care Res* 2015;67(9):1255-62.
67. Munguía-Realpozo P, Mendoza-Pinto C, García-Carrasco M, Berra-Romani R, Sierra-Benito C, Méndez-Martínez S, et al. The impact of antimalarial agents on traditional and non-traditional subclinical

- atherosclerosis biomarkers in systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2021;20(9):102887.
68. Wong SK. Repurposing New Use for Old Drug Chloroquine against Metabolic Syndrome: A Review on Animal and Human Evidence. *Int J Med Sci* 2021;18(12):2673-88.
69. Shim K, Begum R, Yang C, Wang H. Complement activation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2020;11(1):1-12.
70. Castejon R, Jimenez-Ortiz C, Rosado S, Tutor-Ureta P, Mellor-Pita S, Yebra-Bango M. Metabolic syndrome is associated with decreased circulating endothelial progenitor cells and increased arterial stiffness in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2016;25(2):129-36.
71. Bultink IEM, Turkstra F, Diamant M, Dijkmans B a. C, Voskuyl AE. Prevalence of and risk factors for the metabolic syndrome in women with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26(1):32-8.
72. Parker B, Ahmad Y, Shelmerdine J, Edlin H, Yates A, Teh LS, et al. An analysis of the metabolic syndrome phenotype in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011;20(14):1459-65.
73. Sánchez-Pérez H, Quevedo-Abeledo JC, De Armas-Rillo L, Rúa-Figueroa Í, Tejera-Segura B, Armas-González E, et al. Impaired HDL cholesterol efflux capacity in systemic lupus erythematosus patients is related to subclinical carotid atherosclerosis. *Rheumatology* 2020;59(10):2847-56.
74. Kiss MG, Binder CJ. The multifaceted impact of complement on atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2022;351:29-40.
75. Martínez-López D, Roldan-Montero R, García-Marqués F, Nuñez E, Jorge I, Camafeita E, et al. Complement C5 Protein as a Marker of Subclinical Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2020;75(16):1926-41.

76. Speidl WS, Exner M, Amighi J, Kastl SP, Zorn G, Maurer G, et al. Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *Eur Heart J* 2005;26(21):2294-9.
77. Si W, He P, Wang Y, Fu Y, Li X, Lin X, et al. Complement Complex C5b-9 Levels Are Associated with the Clinical Outcomes of Acute Ischemic Stroke and Carotid Plaque Stability. *Transl Stroke Res* 2019;10(3):279-86.
78. Lee JJ, Chi G, Fitzgerald C, Kazmi SHA, Kalayci A, Korjian S, et al. Cholesterol Efflux Capacity and Its Association With Adverse Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:774418.
79. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, et al. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Incident Cardiovascular Events. *N Engl J Med* 2014;371(25):2383-93.
80. Mody P, Joshi PH, Khera A, Ayers CR, Rohatgi A. Beyond Coronary Calcification, Family History, and C-Reactive Protein: Cholesterol Efflux Capacity and Cardiovascular Risk Prediction. *J Am Coll Cardiol* 2016;67(21):2480-7.
81. Ferraz-Amaro I, Hernández-Hernández MV, Armas-González E, Sánchez-Pérez H, Machado JD, Díaz-González F. HDL cholesterol efflux capacity is related to disease activity in psoriatic arthritis patients. *Clin Rheumatol* 2020;39(6):1871-80.
82. Ferraz-Amaro I, Delgado-Frías E, Hernández-Hernández V, Sánchez-Pérez H, De Armas-Rillo L, Armas-González E, et al. HDL cholesterol efflux capacity and lipid profile in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2021;23(1):62.
83. Tejera-Segura B, Macía-Díaz M, Machado JD, De Vera-González A, García-Dopico JA, Olmos JM, et al. HDL cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis patients: contributing factors and relationship with subclinical atherosclerosis. *Arthritis Res Ther* 2017;19(1):113.

84. Quevedo-Abeledo JC, Sánchez-Pérez H, Tejera-Segura B, De Armas-Rillo L, Armas-González E, Machado JD, et al. Differences in Capacity of High-Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Between Patients With Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res* 2021;73(11):1590-6.
85. Jin S, Eussen SJPM, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, Van Greevenbroek MMJ. Plasma factor D is cross-sectionally associated with low-grade inflammation, endothelial dysfunction and cardiovascular disease: The Maastricht study. *Atherosclerosis* 2023;377:60-7.
86. Onat A, Can G, Rezvani R, Cianflone K. Complement C3 and cleavage products in cardiometabolic risk. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2011;412(13-14):1171-9.
87. Xin Y, Hertle E, Van Der Kallen CJH, Vogelzangs N, Arts ICW, Schalkwijk CG, et al. C3 and alternative pathway components are associated with an adverse lipoprotein subclass profile: The CODAM study. *J Clin Lipidol* 2021;15(2):311-9.
88. Bryan AR, Wu EY. Complement Deficiencies in Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14(7):448.
89. Laich A, Patel H, Zarantonello A, Sim RB, Inal JM. C2 by-pass: Cross-talk between the complement classical and alternative pathways. *Immunobiology* 2022;227(3):152225.
90. Buono C, Come CE, Witztum JL, Maguire GF, Connelly PW, Carroll M, et al. Influence of C3 Deficiency on Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(25):3025-31.
91. Persson L, Borén J, Robertson AKL, Wallenius V, Hansson GK, Pekna M. Lack of Complement Factor C3, but Not Factor B, Increases Hyperlipidemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E^{-/-} Low-Density Lipoprotein Receptor^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(6):1062-7.
92. Paglialunga S, Fiset A, Yan Y, Deshaies Y, Brouillette JF, Pekna M, et al. Acylation-stimulating protein deficiency and altered adipose tissue in alternative complement pathway knockout mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 2008;294(3):E521-9.

93. Kiss MG, Papac-Miličević N, Porsch F, Tsiantoulas D, Hendrikx T, Takaoka M, et al. Cell-autonomous regulation of complement C3 by factor H limits macrophage efferocytosis and exacerbates atherosclerosis. *Immunity* 2023;56(8):1809-24.e10.
94. Reiss AB, Awadallah NW, Malhotra S, Montesinos MC, Chan ES, Javitt NB, et al. Immune complexes and IFN-gamma decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J Lipid Res* 2001;42(11):1913-22.

IX. Anexos



OPEN ACCESS

EDITED BY

Ester Lozano,
University of Barcelona, Spain

REVIEWED BY

Takeshi Iwasaki,
Kyoto University, Japan
Giuseppina Arbore,
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy

*CORRESPONDENCE

Iván Ferraz-Amaro
✉ iferrazamaro@hotmail.com
Miguel Á. González-Gay
✉ miguelaggay@hotmail.com

†These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 15 February 2023

ACCEPTED 29 March 2023

PUBLISHED 21 April 2023

CITATION

García-González M, Gómez-Bernal F,
Quevedo-Abeledo JC,
Fernández-Cladera Y, González-Rivero AF,
de Vera-González A, de la Rúa-Figueroa I,
López-Mejías R, Díaz-González F,
González-Gay MÁ and Ferraz-Amaro I
(2023) Full characterization of the
three pathways of the complement
system in patients with systemic
lupus erythematosus.
Front. Immunol. 14:1167055.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1167055

COPYRIGHT

© 2023 García-González, Gómez-Bernal,
Quevedo-Abeledo, Fernández-Cladera,
González-Rivero, de Vera-González,
de la Rúa-Figueroa, López-Mejías,
Díaz-González, González-Gay and
Ferraz-Amaro. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Full characterization of the three pathways of the complement system in patients with systemic lupus erythematosus

María García-González¹, Fuensanta Gómez-Bernal²,
Juan C. Quevedo-Abeledo³, Yolanda Fernández-Cladera²,
Agustín F. González-Rivero², Antonia de Vera-González²,
Iñigo de la Rúa-Figueroa³, Raquel López-Mejías⁴,
Federico Díaz-González^{1,5}, Miguel Á. González-Gay^{6,7,8*†}
and Iván Ferraz-Amaro^{1,5*†}

¹Division of Rheumatology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain, ²Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain, ³Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, ⁴Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ⁵Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), Tenerife, Spain, ⁶Division of Rheumatology, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain, ⁷University of Cantabria, Instituto de Investigación sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, ⁸Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

Background: To date a complete characterization of the components of the complement (C) pathways (CLassical, LEctin and ALternative) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) has not been performed. We aimed to assess the function of these three C cascades through functional assays and the measurement of individual C proteins. We then studied how they relate to clinical characteristics.

Methods: New generation functional assays of the three pathways of the C system were assessed in 284 patients with SLE. Linear regression analysis was performed to study the relationship between the activity, severity, and damage of the disease and C system.

Results: Lower values of the functional tests AL and LE were more frequent than those of the CL pathway. Clinical activity was not related to inferior values of C routes functional assays. The presence of increased DNA binding was negatively linked to all three C pathways and products, except for C1-inh and C3a which were positively related. Disease damage revealed a consistent positive, rather than a negative, relationship with pathways and C elements. Anti-ribosomes and anti-nucleosomes were the autoantibodies that showed a greater relationship with C activation, mainly due to the LE and CL pathways. Regarding antiphospholipid antibodies, the most related with C activation were IgG anti- β 2GP, predominantly involving the AL pathway.

Conclusion: Not only the CL route, but also the AL and LE are related to SLE features. C expression patterns are linked to disease profiles. While accrual damage was associated with higher functional tests of C pathways, anti-DNA, anti-ribosomes and anti-nucleosomes antibodies, were the ones that showed a higher relationship with C activation, mainly due to the LE and CL pathways.

KEYWORDS

systemic lupus erythematosus, complement system, complement pathways, disease activity, disease damage, disease profiles

Introduction

The complement (C) system is a key component of innate immunity and a “complement” (hence its name) for antibody-triggered responses. It consists of almost 60 plasma and membrane proteins that form three distinct but overlapping pathways of activation, as well as a common terminal lytic cascade and a network of regulators and receptors (1). There are three major pathways of complement activation: the classical (CL), the alternative (AL) and the lectin (LE), pathways. The CL pathway is initiated by antibody-dependent as well as antibody-independent mechanisms leading to the formation of C1 proteolytic complex; the AL pathway is characterized by plasma tonic low-level C3 activation by hydrolysis in a process termed “tick-over”; and the LE pathway is initiated by target recognition through mannose-binding lectin and ficolins that are proteins components involved in host responses against foreign organisms such as bacteria and viruses. The main functions of C include, among others, recognition and clearance of foreign pathogens and antigens, phagocytosis of opsonized targets, and promotion and modulation of humoral immune responses (1).

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, occasionally life-threatening, multisystem immune-mediated disorder. Patients can present with a wide range of symptoms, signs, and laboratory findings and have a variable prognosis depending on the severity of the disease and the type of organ affected. Hypocomplementemia is a typical laboratory finding in patients with SLE, reflecting in most cases activation of the C system by immune complexes. Accelerated consumption exceeds synthesis, being the main cause of the hypocomplementemia (2). In this setting, low C values tend to correlate with more severe SLE, especially renal disease, and with antibodies to double-stranded DNA, while return to normal levels with treatment is a good prognostic sign (3). However, routine C assessment in the clinical setting is generally restricted to the measurement of inactive C3 and C4 zymogens, without considering activated or regulatory molecules. Since many other factors besides consumption can affect the serum levels of C proteins, the only evaluation of the C3 and C4 values cannot be considered a surrogate marker of C activity in SLE (4).

Although it is becoming more commercially available, neither functional C assays nor individual plasma C components other than C3 and C4 are routinely used by most experienced lupus clinicians.

In this regard, the medical literature lacks studies in which a complete characterization of the C system in patients with SLE has been performed. In the present work, we have evaluated the three C-system pathways through next-generation functional assays in a well-characterized series of SLE patients with a diverse set of organic manifestations. In addition, we have measured C components belonging to all three C pathways, including proteolytically derived fragments and serum regulators of the C system. Our aim was to identify how the functional levels of the three C pathways, and specific C elements of these pathways relate to damage, severity, and activity of the disease, as well as to individual characteristics of the disease.

Material and methods

Study participants

This was a cross-sectional study that included 284 patients with SLE. All patients with SLE were 18 years or older, had a clinical diagnosis of SLE, and met ≥ 4 American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE (5). Patients were recruited since 2016 to 2021. They had been diagnosed by rheumatologists and were regularly followed up in rheumatology outpatient clinics. Patients were excluded if they had a history of cancer, chronic liver and/or renal failure, evidence of acute and/or chronic active infection, and/or any other chronic autoimmune disease other than a condition such as antiphospholipid and/or Sjögren's syndrome associated with SLE. Research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committees of the Hospital Universitario de Canarias and the Hospital Universitario Doctor Negrín (both in Spain), and all subjects provided informed written consent (Approval Number 2015_84).

Data collection

Patients included in the study completed a medication use questionnaire and underwent a physical examination. Medical records were reviewed to verify specific diagnoses and

medications. SLE disease activity and damage were assessed using the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index -2000 (SLEDAI-2K) (6) and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index -SDI- (7), respectively. For the purpose of the present study, the SLEDAI-2k index was divided into none (0 points), mild (1-5 points), moderate (6-10 points), high (11-19) points, and very high activity (≥ 20) points as previously described (8). The severity of the disease was measured using the Katz index (9). Fasting serum samples were collected and frozen at -80°C until analysis of C system.

Laboratory assessments

The SVAR functional C assays under the Wieslab[®] brand (Sweden) were used to assess CL, AL and LE pathways activity. These tests combine principles of the hemolytic assay for C function with the use of labelled antibodies specific for the neoantigen produced as the result of C activation. The amount of neoantigen generated is proportional to the functional activity of C pathways. Microtiter strip wells are coated with CL, LE, or AL pathway-specific activators. The patient's serum is diluted in a diluent containing a specific blocker to ensure that only the studied pathway is activated. During the incubation of the diluted patient serum in the wells, the specific coating activates C. The wells are then washed, and C5b-9 is detected with an alkaline phosphatase labeled specific antibody against the neoantigen expressed during membrane attack complex (MAC) formation. After an additional washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with alkaline phosphatase substrate solution. The amount of C activation correlates with the intensity of the color and is measured in terms of absorbance (optical density). The amount of formed MAC (neo-epitope) reflects the activity of the C cascade. The result is expressed semi-quantitatively using the optical density ratio between a positive control and the sample. Wieslab[®] has validated these functional assays by studying their correlation and concordance with the classical CH50 and AH50 hemolytic tests (<https://www.svarlifescience.com/>). C2, C3, C3a, C4 and C1q were analyzed by turbidimetry (Roche), C1-inhibitor was analyzed through nephelometry (Siemens) whereas factor D and factor H were assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA Duoset, R&D). Both intra and inter-coefficients of variability were $< 10\%$ for these assays.

Statistical analysis

Demographic and clinical characteristics were described as mean \pm standard deviation (SD) or percentages for categorical variables. For non-normally distributed continuous variables, data were expressed as median and interquartile range (IQR). The relationship of SLE features with circulating C system molecules and pathways was assessed through linear regression analysis. All the analyses used a 5% two-sided significance level and were

performed using Stata software, version 17/SE (StataCorp, College Station, TX, USA). P-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Demographic and disease-related data of patients with systemic lupus erythematosus

Demographic and disease-related characteristics of patients with SLE are shown in Table 1. Most of them were women (92%) and the mean age \pm SD was 50 ± 12 years. The age of diagnosis was 34 ± 13 years, and the duration of the disease was 16 ± 10 years. At the time of recruitment, 67% of the patients were positive for anti-DNA and 69% for ENA, with anti-SSA being the most frequently found antibody (35%). Sixteen percent of patients met the definition of associated antiphospholipid syndrome, and 32% had at least one positive antiphospholipid antibody. The majority of patients with SLE were in the categories of no activity (40%) or mild-moderate activity (55%) as shown by the SLEDAI-2K score. SDI and Katz indexes were 1 (IQR 0-2) and 2 (IQR 1-4), respectively. Sixty-eight percent of the patients had a SDI score equal to or higher than 1. Regarding treatments at the time of assessment, half of the patients (50%) were taking glucocorticoids and the median equivalent daily dose of prednisone was 5 mg/day (IQR 5-7.5 mg). Sixty-nine percent of the patients were taking hydroxychloroquine when the study was performed. Other less used drugs were methotrexate (11%) and azathioprine (15%). Table 1 shows additional information on the data related to SLE.

Functional C assays of the CL, AL and LE pathways were $91 \pm 38\%$, 41 (IQR 12-79) % and 10 (IQR 1-41) %, respectively. Single C components, C1q, C2, C3, C3a, C1-inhibitor (C1-inh), and factor D and H serum values are shown in Table 1.

A graphical representation of the frequency distribution of the three C pathways functional assays is additionally shown in Supplementary Figure 1. In this figure, X axes represents the value of the functional assay, and Y axes is the number of patients with a given value. As it can be observed, while the CL pathway functional test was normally distributed, both AL and LE were skewed to the left toward lower values. Correlations between C routes functional assays and individual components are shown in Supplementary Table 1, and Supplementary Figures 2 (scatterplots of C functional assays and C3 and C3a) and 3 (chord diagrams). C functional assays and molecules were positively and highly correlated with each other, except for factors D and H, which showed a non-significant relationship with C routes and products (Supplementary Table 1). A chord diagram showing a many-to-many relationship between C elements, and routes, as curved arcs within a circle is illustrated in Supplementary Figure 3. Thickness of the arcs are proportional to the significance of the flow. As it can be seen, flows or connections between nodes did not show a specific pattern of C activation, since all C elements generally correlated to each other in a similar manner (Supplementary Figure 3).

TABLE 1 Demographic and disease-related data of patients and controls.

	SLE (n=284)
Age, years	50 ± 12
Women, n (%)	261 (92)
Smoking, n (%)	69 (24)
Diabetes, n (%)	16 (6)
Hypertension, n (%)	111 (39)
Obesity, n (%)	85 (30)
SLE related data	
Age at diagnosis, years	34 ± 13
Disease duration, years	16 ± 10
SLE classification criteria*, n (%)	150 (88)
Antiphospholipid syndrome, n (%)	43 (16)
Auto-antibody profile	
Anti DNA positive, n (%)	151 (67)
ENA positive, n (%)	164 (69)
Anti-Sm	24 (10)
Anti-ribosome	13 (9)
Anti-nucleosome	32 (22)
Anti-histone	22 (15)
Anti-RNP	64 (28)
Anti-SSA/Ro	55 (35)
Anti-SSB/La	36 (21)
Any antiphospholipid antibody, n (%)	61 (32)
ACA IgM	22 (11)
ACA IgG	39 (20)
Anti beta2 glycoprotein IgM	19 (10)
Anti beta2 glycoprotein IgG	28 (15)
Disease scores	
Median SLEDAI-2K	2 (0-4)
SLEDAI-2K categories	
No activity, n (%)	109 (40)
Mild, n (%)	107 (40)
Moderate, n (%)	41 (15)
High or Very High, n (%)	14 (5)
Median SDI	1 (0-2)
SDI ≥ 1, n (%)	191 (68)
Katz Index	2 (1-4)
Katz ≥ 3, n (%)	126 (44)
Functional complement assays, %	

(Continued)

TABLE 1 Continued

	SLE (n=284)
Classical pathway	91 ± 38
Alternative pathway	41 (12-79)
Lectin pathway	10 (1-41)
Individual complement components	
C1q, mg/dl	34 ± 11
C2, mg/dl	2.5 ± 1.2
C4, mg/dl	21 ± 12
Factor D, ng/ml	2593 ± 1835
C3, mg/dl	130 ± 40
C3a, mg/dl	39 ± 10
C1 inhibitor, mg/dl	32 ± 9
Factor H, ng/ml x10e-3	388 (281 - 564)
Immunosuppressants at the time of the visit	
Glucocorticoids, n (%)	140 (50)
Prednisone equivalent daily dose, mg	5 (5-7.5)
Antimalarials drugs, n (%)	194 (69)
Methotrexate, n (%)	31 (11)
Azathioprine, n (%)	43 (15)
Mycophenolate mofetil, n (%)	31 (11)
Belimumab, n (%)	8 (3)
Rituximab, n (%)	8 (3)

Data represent mean ± SD or median (interquartile range) when data were not normally distributed.

SLEDAI-2K categories were defined as: 0, no activity; 1-5 mild; 6-10 moderate; >10 high activity.

*Met either ACR1997 or SLICC 2012 classification criteria (ACR: American College of Rheumatology; SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics).

ACA, anticardiolipin antibodies; ENA, extractable nuclear antibodies; SDI, SLICC/ACR Damage Index; SLE, systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K, SLE Disease Activity Index.

Complement pathway activity and relationship of individual proteins to indices of activity, damage, and disease severity in SLE

The relationship of the SLEDAI-2K, SDI, and Katz indices to the three C pathway functional assays and C products is shown in [Table 2](#). In these analyses, the scores are the independent variable and are considered both continuous and categorized (SLEDAI-2K inactive, mild, and moderate to very high; SDI equal to or greater than 1; and Katz equal to or greater than 3). With respect to SLEDAI-2K, in general, this score was related to lower values of the C pathway tests and products. In particular, C2, C3 and C1q and AL route were the ones that revealed a higher negative relationship with both continuous and categorized crude SLEDAI-2K. In addition, SLEDAI-2K was also associated with lower C3a values in the

comparison between the mild and inactive categories. In contrast, C1-inh and factors D and H did not reveal associations with crude SLEDAI-2K.

Since SLEDAI-2K includes laboratory items (hypocomplementemia and anti-DNA), we additionally calculated the “clinical” SLEDAI-2K in which those two items were not included in the calculation. When the “clinical” - not classical - SLEDAI-2K was tested, most of the significant relationships were lost. This score was only related to higher values of C1q (which belongs to the CL cascade) and higher serum levels of C3a, denoting activation of all three C pathways. (Table 2).

Regarding SDI, this score was related to higher values of the functional tests CL, AL and LE, and higher circulating C2, C3a, C1-inh and C1q. No relationship was found between SDI and C3, C4 and factors D and H. The Katz index was not related, in general, with the functional C tests or with the C components. A positive relationship was only found with C1-inh both when considering this score as continuous or binary (Table 2 and Supplementary Figure 4).

Relationship of SLEDAI-2K and SDI elements to complement pathways and individual proteins

A heatmap representation of C pathways and molecules relationship to SLEDAI-2K and SDI items and domains is represented, respectively, in Figures 1, 2. Some C expression patterns can be deduced from these heat maps. Remarkably, the presence of increased DNA binding was negatively related to all three C pathways and products, except for C1-inh and C3a which were positively related. The negative relationship between DNA binding and C was higher for the CL pathway parameters. In addition, low complement, which is defined in the SLEDAI-2K score through the measurement of C3 and C4 in the clinical setting, was associated with lower levels of both C functional assays and products of all three pathways, including the C3a activation product. The CL pathway showed the greatest relationship with the C consumption item.

Items referring to skin, joint, and renal manifestations were associated with higher levels of most of the C parameters. In this sense, the strongest relationship with arthritis was found for C1q in a positive manner. The functional test CL was the one that presented a higher and positive association with most of the renal items. Instead, the hematological features of the disease were related, in general, with lower levels of C values. Regarding regulator molecules, while factor H was mostly related to thrombocytopenia, it was found that the greatest relationship of C1-inh was with the hypocomplementemia item.

With respect to SDI, an overall view of the heatmap of Figure 2 showed a predominance of blue cells, denoting, therefore, a positive relationship between SDI items and C routes and components. The C parameters that revealed a greater relationship with the CL pathway were the ocular and neuropsychiatric domains, followed by the renal and pulmonary domains. Furthermore, the SDI domain that had the strongest association with the AL cascade was gastrointestinal. Similarly, the C parameters that had the highest correlation with the diabetes and cardiovascular domains were, respectively, C1-inh and factor D. A complete heatmap of all the SDI items is shown in Supplementary Figure 5.

Relationship of autoantibodies to the complement system

The relationship of ENA, anti-DNA and antiphospholipid autoantibodies to C system is shown in Supplementary Figure 6 as a heatmap. Moreover, the relationship of these autoantibodies to the sum of C pathways activation is illustrated in Figure 3. In this sense, anti-ribosomes and anti-nucleosomes were the autoantibodies that showed a greater relationship with C activation, mainly due to the LE and CL pathways. The anti-La was the ENA least related to the AL pathway. Low relationship with AL was also found with anti-DNA and anti-histone. Regarding antiphospholipid antibodies, the most related with C activation were IgG anti- β 2GP, primarily involving the AL pathway.

Discussion

Our study is the first in the literature in which the three C pathways have been fully characterized in a large set of SLE patients with a wide variety of organic manifestations. Our data support the complexity of the C system in patients with SLE and how it is linked to certain manifestations of the disease. Specifically, while accrual damage is related to superior levels of C individual elements and functional assays, increased DNA binding, and anti-ribosomes and anti-nucleosomes, were the autoantibodies that showed a higher relationship with C activation, mainly due to the LE and CL pathways. According to our findings, the identification of C disturbances may serve as a guide in the therapeutic and prognostic approach of SLE patients.

In our work, according to the frequency distribution of the pathways, the lowest values of the functional tests of the AL and LE pathways were more prevalent than those of the CL pathway. This would imply that the deficit or activation of the AL and LE pathways was more frequent compared to the CL pathway in our population with SLE. This finding of lower values in the LE pathway is consistent with current knowledge of SLE and controls on this pathway. In this regard, deficiencies affecting the LE pathway have been reported to be common, and this may result in lower levels of this LE functional assay in both patients and controls (10). However, to date, functional AL tests have been described to be normally distributed in healthy individuals (11). This was not the case in our SLE patients in which AL curve is skewed to the left towards lower values. In this sense, it is well known that the AL pathway is highly influenced by events that occur in other C pathways. In this regard, AL convertase-C3 amplifies C activation initiated in any pathway, exerting positive feedback to the entire system, and SLE patients more frequently suffer from mutations and autoantibodies that affect C system molecules and regulators. Therefore, we believe that the combination of all this may explain why AL functional test values were skewed to the left reflecting deficit but also activation of this route in SLE patients.

In our analysis of C system in SLE, functional assays were positively related to serum molecules and vice versa. This was also the case for C3a, where a negative correlation would have been expected because this molecule is a proteolytically derived activated element and not an inactive zymogen. We believe that this can be

TABLE 2 Complement pathways activity and individual components relation to activity, damage and severity indices.

Beta coefficients (95% confidence interval), p			
	CLASSICAL PATHWAY		LECTIN PATHWAY
	Classical, %	C1q, mg/dl	Lectin, %
SLEDAI-2K	-0.6 (-2-0.5), 0.26	-0.3 (-0.6- -0.003), 0.048	0.1 (-1-1), 0.85
Inactive	-	-	-
Mild	-15 (-25- -5), 0.004	-3 (-6- -0.1), 0.042	-13 (-25- -2), 0.023
Moderate to very high	-13 (-26- -0.6), 0.039	-3 (-7-0.2), 0.062	-0.8 (-15-13), 0.92
Clinical SLEDAI-2K	0.8 (-2-3), 0.58	0.5 (-0.2-1), 0.16	2 (-1-5), 0.20
Inactive	-	-	-
Mild	-5 (-18-8), 0.49	1 (-2-5), 0.50	4 (-11-19), 0.58
Moderate to very high	10 (-14-35), 0.41	7 (0.7-13), 0.030	24 (-3-51), 0.085
SDI	5 (3-8), <0.001	0.88 (0.03-1), 0.042	5 (2-8), 0.001
SDI >=1	12 (2-22), 0.016	3 (0.2-5), 0.038	6 (-5-17), 0.27
Katz	2 (-1-4), 0.14	-0.2 (-0.8-0.4), 0.55	2 (-0.5-5), 0.11
Katz >=3	4 (-5-13), 0.38	-2 (-4-0.8), 0.18	4 (-6-14), 0.44
COMMON ELEMENTS OF THE CLASSICAL AND LECTIN PATHWAYS			
	C2, mg/dl	C4, mg/dl	C1 inh, mg/dl
SLEDAI-2K	-0.05 (-0.08- -0.02), 0.004	-0.3 (-0.7-0.01), 0.058	0.2 (-0.08-0.5), 0.17
Inactive	-	-	-
Mild	-0.7 (-1.0- -0.4), <0.001	-4 (-8- -1), 0.011	-0.9 (-4-2), 0.47
Moderate to very high	-0.7 (-1.1- -0.4), <0.001	-7 (-11- -3), 0.001	1 (-2-5), 0.38
Clinical SLEDAI-2K	0.07 (-0.009-0.1), 0.081	0.4 (-0.5-1), 0.41	0.09 (-0.7-0.9), 0.82
Inactive	-	-	-
Mild	0.3 (-0.1-0.7), 0.20	2 (-3-6), 0.42	1 (-2-5), 0.55
Moderate to very high	0.5 (-0.3-1.2), 0.21	4 (-4-11), 0.37	1 (-6-8), 0.74
SDI	0.09 (0.02-0.2), 0.019	0.4 (-0.5-1), 0.32	0.8 (0.1-1), 0.019
SDI >=1	0.4 (0.1-0.7), 0.004	2 (-1-5), 0.25	3 (0.7-5), 0.011
Katz	0.0004 (-0.07-0.07), 0.99	0.3 (-0.5-1), 0.45	0.7 (0.1-1), 0.017
Katz >=3	-0.1 (-0.4-0.1), 0.31	-1 (-4-2), 0.42	3 (0.6-5), 0.013
ALTERNATIVE PATHWAY			
	Alternative, %	Factor D, ng/ml	
SLEDAI-2K	-2 (-3- -0.6), 0.002	-60 (-123-2), 0.057	
Inactive	-	-	
Mild	-13 (-23- -3), 0.010	-374 (-931-184), 0.19	
Moderate to very high	-20 (-33- -8), 0.002	-552 (-1260-156), 0.13	
Clinical SLEDAI-2K	-0.6 (-3-2), 0.66	-67 (-228-93), 0.41	
Inactive	-	-	
Mild	-10 (-23-3), 0.13	53 (-720-826), 0.89	

(Continued)

TABLE 2 Continued

Beta coefficients (95% confidence interval), p			
ALTERNATIVE PATHWAY			
	Alternative, %	Factor D, ng/ml	
Moderate to very high	1 (-23-25), 0.92	-644 (-2063-776), 0.37	
SDI	2 (-0.1-5), 0.063	108 (-27-242), 0.12	
SDI >=1	11 (1-20), 0.026	301 (-204-805), 0.24	
Katz	-0.5 (-2-2), 0.96	65 (-56-186), 0.29	
Katz >=3	-5 (-14-4), 0.29	82 (-413-577), 0.74	
COMMON ELEMENTS OF THE THREE PATHWAYS			
	C3, mg/dl	C3a, mg/dl	Factor H, ng/ml x10e-3
SLEDAI-2K	-2 (-3- -0.5), 0.006	0.04 (-0.3-0.3), 0.79	-22 (-44-1), 0.063
Inactive	-	-	-
Mild	-18 (-29- -7), 0.001	-4 (-6- -0.9), 0.010	-23 (-228-181), 0.82
Moderate to very high	-27 (-40- -14), <0.001	-1 (-4-2), 0.57	-236 (-496-23), 0.075
Clinical SLEDAI-2K	2 (-1-4), 0.24	0.09 (0.2-2), 0.013	-7 (-66-52), 0.81
Inactive	-	-	-
Mild	8 (-5-22), 0.24	0.3 (-3-4), 0.85	237 (-457-519), 0.10
Moderate to very high	6 (-19-32), 0.62	11 (4-17), 0.001	-242 (-761-276), 0.36
SDI	1 (-2-4), 0.43	1 (0.4-2), 0.001	5 (-59-72), 0.86
SDI >=1	9 (-1-19), 0.093	4 (1-6), 0.006	-93 (-337-151), 0.46
Katz	-0.4 (-3-2), 0.75	0.02 (-0.6-0.6), 0.94	-16 (-75-43), 0.60
Katz >=3	-4 (-14-6), 0.42	1 (-1-4), 0.28	-81 (-32-158), 0.50

Clinical SLEDAI-2K does not account for anti-DNA antibodies or hypocomplementemia items.

SDI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index.

SLEDAI2-K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index. SLEDAI categories were defined as: 0, no activity; 1-5 mild; 6-10 moderate; >10 very high.

*inactive SLEDAI-2K category used as reference level.

Statistically significant values are depicted in bold.

explained by the combination of some evidence: hepatic hyperproduction of complement proteins as acute phase reactants in inflammatory scenarios, spontaneous C3 “tick-over” leading to C3a formation, and secretion of intracellular C3 stores by part of T cells under certain conditions (12). Furthermore, only factors D and H showed non-significant and low relationships with the C pathways or components. One possible explanation could be the presence in SLE of anti-factor H autoantibodies and/or factor H mutations that result in loss of function, as described in other immune-mediated conditions, such as some thrombotic microangiopathies and glomerular diseases (13, 14). Also, factor D, which cleaves factor B, is the only component that can be lost in substantial amounts in the urine. However, in our work an exact amplification pattern or image in SLE could not be described through the representation of chord diagrams. We understand, the high complexity of system C does not allow drawing a clear figure that represents the SLE population.

In our study, the clinical SLEDAI-2K, which does not contain the hypocomplementemia and anti-DNA items, was associated with higher levels of circulating C3a. Despite this, the clinical SLEDAI-2K was not associated with any of the C pathway functional assays or with other serum molecules. This means that, in our work, classical -not clinical- SLEDAI-2K did not capture consumption or alterations in C molecules and pathways. In this regard, it should be remembered that criticism has arisen regarding the SLEDAI-2K score because, for example, only the presence/absence of each item is scored, but its severity cannot be assessed; some elements are over-emphasized while others are under-weighted; and some severe conditions are not captured as activity in this index because there are no items for them (15). According to our results, SLEDAI-2K would not be an optimal tool to capture C disturbances in patients with SLE.

In addition to its key role in host defense, C also promotes inflammation. In this sense, it is known that the activation of the C

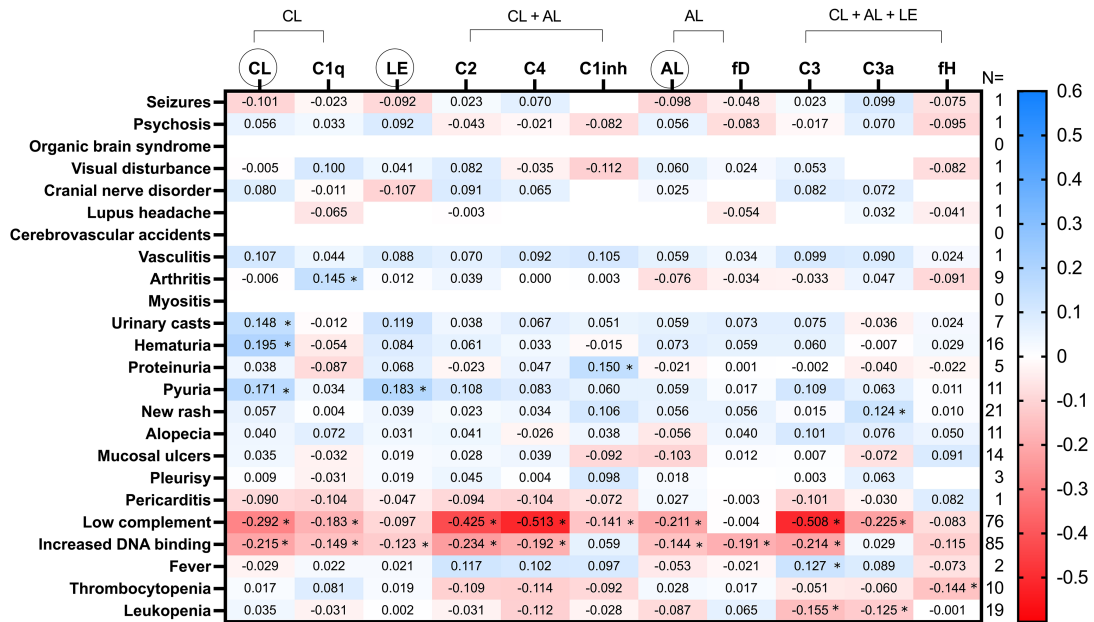


FIGURE 1
Heatmap of SLEDAI-2K items relation to C pathways activation and serum molecules. Values in the cells represent Spearman's rho coefficient (* denotes p value < 0.05). Positive and negative correlations are shown in blue and red, respectively. The number of patients who meet each SLEDAI-2K Item is shown in the right margin. CL, classical; AL, alternative; LE, lectin; fD, factor D; fH, factor H. CL, LE and AL in circles refer to the functional tests of these cascades.

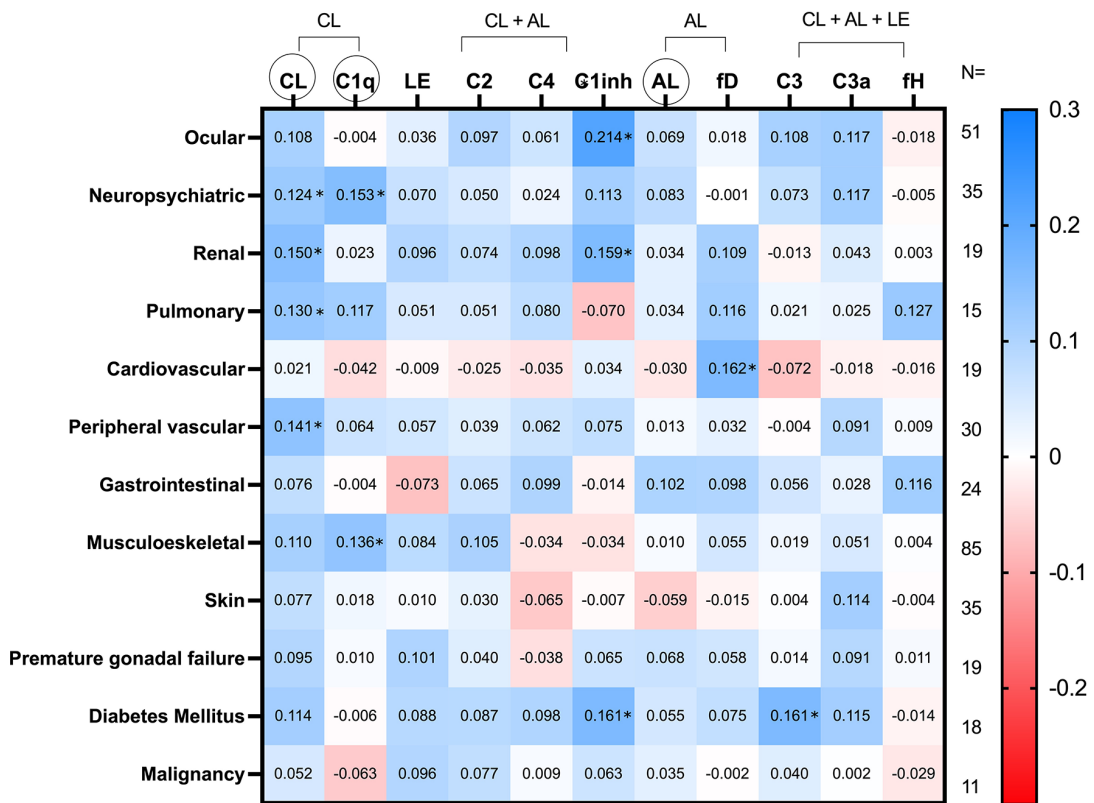


FIGURE 2
Heatmap of SDI items relationship to C pathways activation and serum molecules. Values in the cells represent Spearman's rho coefficient (* denotes p value < 0.05). Positive and negative correlations are shown in blue and red, respectively. The number of patients who complied with each item of the SDI is shown in the right margin. CL, classical; AL, alternative; LE, lectin; fD, factor D; fH, factor H. CL, LE and AL in circles refer to the functional tests of these cascades.

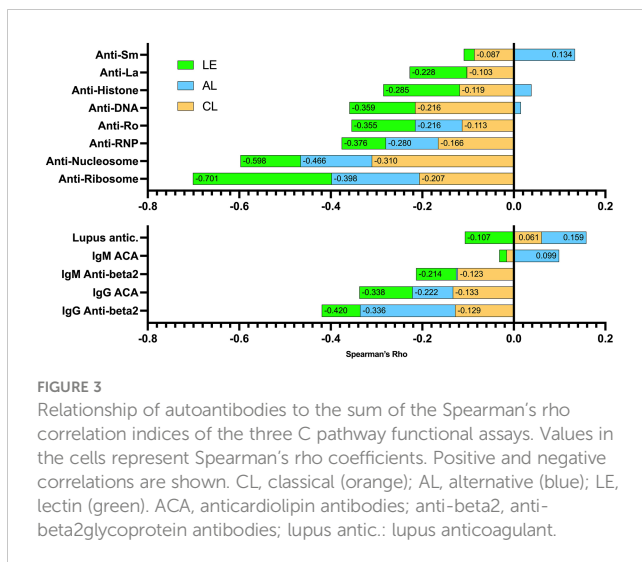


FIGURE 3
Relationship of autoantibodies to the sum of the Spearman's rho correlation indices of the three C pathway functional assays. Values in the cells represent Spearman's rho coefficients. Positive and negative correlations are shown. CL, classical (orange); AL, alternative (blue); LE, lectin (green). ACA, anticardiolipin antibodies; anti-beta2, anti-beta2glycoprotein antibodies; lupus antic.: lupus anticoagulant.

system leads to the release of “anaphylatoxin” peptides, which are potent mediators of the inflammatory and immune response. These anaphylatoxins bind to their respective receptors on cells to initiate inflammation and vasodilation that in turn activate many cell types (16). Accordingly, C participates in angiogenesis, mobilization of hematopoietic progenitor cells (17) and tissue regeneration (18). Furthermore, C3 activation can occur intracellularly, resulting in the production of autocrine produced proinflammatory cytokines to signal the inflammasome (19). In this regard, C causes the release of mediators, such as interleukin 6, tumor necrosis factor alpha, and soluble vascular endothelial growth factor from multiple cell types, including monocytes and macrophages (20).

Our study evaluated for the first time the relationship of cumulative disease damage with C. Regarding this, disease damage assessed by SDI, which does not contain C-related items, showed in our study a positive relationship with serum C levels and its functional tests. This relationship was found not only with functional assays of all three pathways, but also with various components of all three pathways such as C1q (CL pathway), C2 and C1inh (CL and LE pathways) and C3a (common pathway). Furthermore, when the SDI score was broken down into its different domains and items, the strongest positive relationships were found mainly with the ocular, neuropsychiatric, renal, peripheral vascular, cardiovascular, and diabetes domains. Therefore, we believe that the positive association between the disease damage and the C system is consequence of the inflammation, angiogenesis and tissue repair mechanisms, which has been established due to the accrual damage in different organs.

Regarding the association between SLE and C autoantibodies, some authors have found that anti-Sm, anti-DNA and anti-SSA are related to C3, C4 and/or C3a (13, 21, 22), while others have described a lack of association between anti-RNP autoantibodies and C3 and C4 (23). The relationship of SLE autoantibodies with C functional assays has not been studied until the present work. The fact that these relationships have been evaluated through functional tests, and not using C elements, is of great value. In our study, anti-ribosomes and anti-nucleosomes were the antibodies that had the greatest relationship with the functional tests of C.

It is known that the complement system and coagulation are related. In fact, there is great interference between coagulation and C, so activation of one system can amplify the other (24). For example, higher levels of C5b-9 are reported in patients with antiphospholipid syndrome, many patients with antiphospholipid syndrome have hypocomplementemia and/or elevated levels of C activation products Bb and C3a (25, 26). In addition, C activation has also been reported in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome unrelated to SLE (25). In this sense, it is striking that in our study the antiphospholipid antibody most related to C activation was the anti-β2GP IgG subtype. This is consistent with the fact that this autoantibody is considered etiopathogenic, and the one with a higher relation to clinical manifestations in antiphospholipid syndrome (27).

Dysregulation of the C system is now known to play an important role in various diseases, from autoimmune conditions and sepsis to neurodegenerative disorders and graft rejection. For this reason, an increasing number of pharmaceutical companies are focusing on developing drugs that regulate the C system at different levels and the field of research is growing every year in areas where C is suspected to be a pathological problem, which raises the question if treatment options within system C are needed. We believe that a better understanding of the role of C in SLE, as shown in our study, could pave the way for the development of therapies related to the C system in patients with SLE. However, it should be noted that our study is mainly exploratory. Correlations of disease manifestations with C pathways and molecules are shown descriptively. The fact that the correlations were sometimes not significant should not be interpreted as a limitation since several manifestations of the disease are rare and infrequent. Our representation through heatmaps aims to describe patterns of activation of the C system for certain manifestations of the disease.

In our study we used novel assays that analyzed C activity based on enzyme immunoassay technology and not through the traditional haemolytic based methods. These new assays have been validated and correlate well with the classical haemolytic ones. Besides, it is well known that the ELISA format offers superior ease of handling, increased objectivity in interpretation, faster turnaround time and increased stability and reagent quality as compared to haemolytic assays. Moreover, the ELISA is suitable for automation which further adds to the ease of use. Reports that use this technology in several diseases and conditions have become frequent in the literature. For example, these assays have been used to assess C function in vasculitis (28, 29), in the study of C deficiencies (30), response to treatments in conditions like retinopathies and coronavirus infection (30, 31) and other diseases (32).

We acknowledge the limitation that our study has a cross-sectional design and therefore causality cannot be inferred. Besides, the prospective implications that the C abnormalities found in our study may have in disease expression warrant further studies in the future. Genetic deficiencies of many C components are strongly associated with the development of SLE and influence the disease. In this regard, we also acknowledge that we have not performed a genetic evaluation of the C system or studied the presence of antibodies against C particles. A potential limitation of our study could be that we did

not test C in healthy controls and focused specifically on patients with SLE, as these patients are known to have C abnormalities.

In conclusion, our study demonstrates the complexity of the C system in patients with SLE. All three pathways, not just the CL pathway, appear to be disrupted in SLE patients. Alterations of the C system may contribute to the expression of the disease in terms of serological and clinical manifestations, activity, and damage.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Committee at Hospital Universitario de Canarias and Hospital Universitario Doctor Negrín. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

Conceptualization: IF-A, MAG-G, MG-G. Methodology: IF-A, MAG-G. Formal analysis: IF-A. Data curation: MG-G, FG-B, YF-C, AG-R, AD-G, JQ-A, ID-F. Writing – original draft preparation: IF-A, MAG-G, MG-G. Writing – review & editing: IF-A, MAG-G, MG-G. Funding acquisition: IF-A. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by a grant to IF-A from the Spanish Ministry of Health, Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 and by Fondo Europeo de Desarrollo Regional - FEDER - (Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS PI20/00084).

Conflict of interest

Author IF-A received grants/research supports from Abbott, MSD, Janssen, and Roche, as well as consultation fees from company sponsored speakers bureaus associated with Abbott, Pfizer, Roche, Sanofi, Celgene, and MSD. Author MAG-G has received grants/research supports from AbbVie, MSD, Janssen, and Roche, as well as consultation fees/participation from company sponsored speakers bureaus tied to AbbVie, Pfizer, Roche, Sanofi, Lilly, Celgene, and MSD.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1167055/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Frequency distribution of the three complement pathways functional assays in the SLE patients. X axes represents the percentage value of each pathway; Y axes express the number of SLE patients. Functional C pathways are shown semi-quantitatively using the optical density ratio between a positive control and the sample. While classical pathway functional test was normally distributed, the alternative and lectin routes were skewed to the left toward lower values showing, therefore, activation of these paths.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Scatterplots of the correlation between C functional assays of the 3 pathways and C3 and C3a.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3

Chord diagrams of the relationship of all C pathway functional assays and the serum molecules between them (left), and of the three C pathway functional tests to serum C elements (right). This diagram shows a many-to-many relationship between C elements and routes as curved arcs within a circle. Thickness of the arc is proportional to the significance of the flow. As it can be seen, flows or connections between nodes did not show a specific pattern from which a certain association can be inferred. CL, classical; AL, alternative; LE, lectin; fD, factor D; fH, factor H.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4

Relation of SDI score (continuous variable) and C functional assays of the three routes. CL, classical; AL, alternative; LE, lectin.

SUPPLEMENTARY FIGURE 5

Heatmap of complete SDI items relationship to activation of C pathways and serum molecules. Values in the cells represent Spearman's rho coefficient (* denotes p value < 0.05). Positive and negative correlations are shown in blue and red, respectively. The number of patients who met each SDI item is shown in the left margin. CL, classical; AL, alternative; LE, lectin; fD, factor D; fH, factor H. CL, LE and AL in circles refer to the functional tests of these pathways.

SUPPLEMENTARY FIGURE 6

Heatmap of complete autoantibodies and lupus anticoagulant relation to C pathways functional assays and serum molecules. Values in the cells represent Spearman's rho coefficient (* denotes p value < 0.05). Positive and negative correlations are shown, respectively, in blue and red. The number of patients who presented each autoantibody is shown in the right margin. CL, classical; AL, alternative; LE, lectin; fD, factor D; fH, factor H. ACA: anticardiolipin antibodies, anti-beta2: anti-beta2glycoprotein antibodies; lupus antic., lupus anticoagulant. CL, LE and AL in circles refer to the functional tests of these cascades.

SUPPLEMENTARY TABLE 1

Spearman's rho correlations between C pathways and products. In columns CL: classical pathway functional assay, LE: lectin path functional assay, AL: alternative pathway functional assay. Units are only shown in rows. Spearman's Rho correlation index and p value are shown in cells. Significant p values are depicted in bold.

References

- Holers VM. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:433–59. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120154
- Macedo ACL, Isaac L. Systemic lupus erythematosus and deficiencies of early components of the complement classical pathway. *Front Immunol* (2016) 7:55. doi: 10.3389/fimmu.2016.00055
- Kao AH, Navratil JS, Ruffing MJ, Liu CC, Hawkins D, McKinnon KM, et al. Erythrocyte C3d and C4d for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2010) 62:837–44. doi: 10.1002/art.27267
- Weinstein A, Alexander RV, Zack DJ. A review of complement activation in SLE. *Curr Rheumatol Rep* (2021) 23(3):16. doi: 10.1007/s11926-021-00984-1
- Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* (1997) 40:1725. doi: 10.1002/art.1780400928
- Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* (2002) 29:288–91.
- Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating Clinics/American college of rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (1996) 39:363–9. doi: 10.1002/art.1780390303
- Mosca M, Bombardieri S. Assessing remission in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 24:S-99–104.
- Katz JD, Senegal J-L, Rivest C, Goulet J-R, Rothfield N. A simple severity of disease index for systemic lupus erythematosus. *Lupus* (1993) 2:119–23. doi: 10.1177/096120339300200210
- Trolldborg A, Thiel S, Trendelenburg M, Friebus-Kardash J, Nehring J, Steffensen R, et al. The lectin pathway of complement activation in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (2018) 45:1136–44. doi: 10.3899/jrheum.171033
- Palarasah Y, Nielsen C, Sprogøe U, Christensen ML, Lillevang S, Madsen HO, et al. Novel assays to assess the functional capacity of the classical, the alternative and the lectin pathways of the complement system. *Clin Exp Immunol* (2011) 164:388–95. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04322.x
- Arbore G, Kemper C, Kolev M. Intracellular complement - the composome - in immune cell regulation. *Mol Immunol* (2017) 89:2–9. doi: 10.1016/j.molimm.2017.05.012
- K.Liszewski M, Atkinson JP. Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *J Intern Med* (2015) 277:294–305. doi: 10.1111/joim.12338
- Vaught AJ, Braunstein EM, Jasem J, Yuan X, Makhlin I, Eloundou S, et al. Germline mutations in the alternative pathway of complement predispose to HELLP syndrome. *JCI Insight* (2018) 3(6):e99128. doi: 10.1172/jci.insight.99128
- Ohmura K. Which is the best SLE activity index for clinical trials? *Mod Rheumatol* (2021) 31(1):20–8. doi: 10.1080/14397595.2020.1775928
- Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* (2004) 4(2):133–42. doi: 10.1038/nri1269
- Lee HM, Wyszczynski M, Liu R, Shin DM, Kucia M, Botto M, et al. Mobilization studies in complement-deficient mice reveal that optimal AMD3100 mobilization of hematopoietic stem cells depends on complement cascade activation by AMD3100-stimulated granulocytes. *Leukemia* (2010) 24:573–82. doi: 10.1038/leu.2009.271
- Mastellos DC, DeAngelis RA, Lambris JD. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Semin Immunol* (2013) 25:29–38. doi: 10.1016/j.smim.2013.04.002
- Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* (2015) 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262
- Markiewski MM, Daugherty E, Karbowniczek M, Reese B. The role of complement in angiogenesis. antibodies. *Antibodies (Basel)* (2020) 9(4):67. doi: 10.3390/antib9040067
- Cai YH, Deng J, Chen ZL, Mei H, Tang L, Luo SS, et al. Brief report on the relation between complement C3a and anti dsDNA antibody in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* (2022) 12(1):7098. doi: 10.1038/s41598-022-10936-z
- Iwasaki T, Doi H, Tsuji H, Tabuchi Y, Hashimoto M, Kitagori K, et al. Phenotypic landscape of systemic lupus erythematosus: An analysis of the Kyoto lupus cohort. *Mod Rheumatol* (2022) 32:571–6. doi: 10.1093/mr/roab020
- Hubbard EL, Pisetsky DS, Lipsky PE. Anti-RNP antibodies are associated with the interferon gene signature but not decreased complement levels in SLE. *Ann Rheum Dis* 81:632–43. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221662
- Foley JH, Conway EM. Cross talk pathways between coagulation and inflammation. *Circ Res* (2016) 118(9):1392–408. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306853
- Breen KA, Seed P, Parmar K, Moore GW, Stuart-Smith SE, Hunt BJ. Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* (2012) 107:423–9. doi: 10.1160/TH11-08-0554
- Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* (2009) 68:1030–5. doi: 10.1136/ard.2008.090670
- Yin D, de Laat B, Devreese KMJ, Kelchtermans H. The clinical value of assays detecting antibodies against domain I of β 2-glycoprotein I in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* (2018) 17:1210–8. doi: 10.1016/j.autrev.2018.06.011
- Kojima T, Inoue D, Wajima T, Uchida T, Yamada M, Ohsawa I, et al. Circulating immune-complexes and complement activation through the classical pathway in myeloperoxidase-ANCA-associated glomerulonephritis. *Ren Fail* (2022) 44(1):714–23. doi: 10.1080/0886022X20222068445
- Selvaskandan H, Kay Cheung C, Dormer J, et al. Inhibition of the lectin pathway of the complement system as a novel approach in the management of IgA vasculitis-associated nephritis. *Nephron* (2020) 144:453–8. doi: 10.1159/000508841.
- Khan AH, Pierce CO, De Salvo G, Griffiths H, Nelson M, Cree AJ, et al. The effect of systemic levels of TNF-alpha and complement pathway activity on outcomes of VEGF inhibition in neovascular AMD. *Eye* (2021) 36:11. doi: 10.1038/s41433-021-01824-3
- Holter JC, Pischke SE, de Boer E, Lind A, Jenum S, Holten AR, et al. Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2020) 117:25018–25. doi: 10.1073/pnas.2010540117
- Diatlov D, Bohorquez A, Jackson M, Cheong M, Kahr WHA, Kuo KHM, et al. Pediatric sickle cell disease: A potential role for the complement system. *Blood* (2022) 140:2517–8. doi: 10.1182/blood-2022-167696

The complement system is linked to insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus

M. García-González¹, F. Gómez-Bernal², J.C. Quevedo-Abeledo³,
Y. Fernández-Cladera², A.F. González-Rivero², R. López-Mejías⁴,
F. Díaz-González^{1,5}, M.Á. González-Gay^{6,7,8}, I. Ferraz-Amaro^{1,5}

¹Division of Rheumatology, ²Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ³Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ⁴Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain; ⁵Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), Tenerife, Spain; ⁶Division of Rheumatology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ⁷University of Cantabria, IDIVAL, Santander, Spain; ⁸Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa.

Abstract Objective

Systemic lupus erythematosus (SLE) patients more commonly have insulin resistance (IR) than control subjects. Recent studies have revealed that the complement (C) system is not only a mediator of the immune system but is also related to the pathogenesis of atherosclerosis in the general population. Given that the C alteration is a characteristic of SLE, in the present work we set out to analyse if there is a relationship between the C system and IR in patients with SLE.

Methods

New generation functional assays of the three pathways of the C system were performed in 225 non-diabetic patients with SLE. In addition, the serum levels of inactive (C1q, C2, C3, C4, factor D), activated (C3a) and regulators (C1 inhibitor and factor H) molecules of the C system were evaluated. Insulin and C-peptide serum levels were measured, and insulin resistance and indices of beta cell function were calculated using the homeostatic model assessment (HOMA). Metabolic syndrome criteria fulfillments were applied. Multivariable linear regression analysis was performed to assess the relationship between C system and IR indices and the presence of metabolic syndrome.

Results

After adjusting for covariates that included traditional cardiovascular risk factors associated with IR and prednisone, serum C3a and factor H levels were positively related to higher levels of the HOMA2-IR index. Besides, in the multivariable analysis, after adjustment for covariates, serum levels of C1q and C3 associated with a higher odds ratio for the presence of metabolic syndrome.

Conclusion

IR and metabolic syndrome are positively and independently related to higher serum levels of some serum C elements in patients with SLE with a predominant role of the alternative pathway elements.

Key words

insulin resistance, complement system, systemic lupus erythematosus.

María García-González, MD
Fuensanta Gómez-Bernal, PhD
Juan Carlos Quevedo-Abeledo, MD
Yolanda Fernández-Cladera, MD
Agustín F. González-Rivero, MD
Raquel López-Mejías, PhD
Federico Díaz-González, MD
Miguel Á. González-Gay, MD, PhD*
Iván Ferraz-Amaro, MD, PhD*

*These authors shared senior authorship.

Please address correspondence to:
Iván Ferraz-Amaro
Servicio de Reumatología,
Hospital Universitario de Canarias,
Ofra, s/n La Cuesta, La Laguna,
38320 Santa Cruz de Tenerife, Spain.
E-mail: iferrazamaro@hotmail.com

and to:
Miguel Ángel González-Gay
Division of Rheumatology,
IIS-Fundación Jiménez Díaz,
Av. de los Reyes Católicos 2,
28040 Madrid, Spain.
E-mail: miguelaggay@hotmail.com

Received on May 22, 2023; accepted in revised form on July 10, 2023.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2024.

Funding: this work was supported by a grant to I. Ferraz-Amaro from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), co-funded by European Regional Development Fund - FEDER - (PI20/00084); and by a grant to I. Ferraz-Amaro from Ayudas para la Intensificación para la Investigación de la Actividad Investigadora 2021 (Fundación Española de Reumatología).

Competing interests: the authors declare that there are no conflicts of interest. Nevertheless, I. Ferraz-Amaro would like to acknowledge that he has received grants/research support from Abbott, MSD, Janssen, and Roche, as well as consultation fees from company sponsored speakers' bureaus associated with Abbott, Pfizer, Roche, Sanofi, Celgene, and MSD. M.Á. González-Gay has received grants/research support from AbbVie, MSD, Janssen, and Roche, as well as consultation fees/participation from company sponsored speakers' bureaus tied to AbbVie, Pfizer, Roche, Sanofi, Lilly, Celgene, and MSD.

Introduction

Insulin resistance (IR) is defined as the inability of a known amount of endogenous insulin to increase glucose uptake and utilisation in an individual as much as it does in a normal population. IR occurs as part of a group of cardiovascular and metabolic abnormalities commonly known as the metabolic syndrome. This cluster of abnormalities may lead to the development of type 2 diabetes or accelerated atherosclerosis. Chronic inflammation has been described as a key component in the pathogenesis of IR and metabolic syndrome. In this sense, many studies have focused on the role of inflammation as a common mediator that relates IR to both the pathogenesis of diabetes (1) and atherosclerosis (2). Pro-inflammatory cytokines can cause IR in adipose tissue, skeletal muscle, and liver by inhibiting insulin signal transduction (3). Supporting this notion, IR is augmented in patients with inflammatory diseases like systemic lupus erythematosus (SLE) (4-7) and rheumatoid arthritis (8-10) compared with control subjects.

An increasing body of evidence supports a functional role for complement system (C) activation in the pathogenesis of IR, diabetes, and cardiovascular disease through pleiotropic effects on endothelial and haematopoietic cell function and homeostasis (11). For example, C proteins contribute to the development of type 1 diabetes by enhancing the underlying organ-specific autoimmune processes while complement upregulation appears to be an important feature of IR and type 2 diabetes (12). This has been supported by prospective and case control studies that confirmed strong relationships between several C components and cardiovascular outcomes (13, 14). Moreover, *in vitro* studies and animal models supported this dysfunctional role (15). Patients with SLE exhibit disruption of the C system. Low serum C components occur in about 50 percent of patients with SLE, reflecting in most cases activation of the classical complement pathway by immune complexes. In the present study we have evaluated the three pathways of the C system in a large group of patients with SLE

by means of functional assays and the measurement of the individual C components belonging to these three pathways. We assessed if there is a relationship between the C system and IR in patients with SLE.

Material and methods

Study participants

This was a cross-sectional study that included 225 patients with SLE. All patients were 18 years or older, had a clinical diagnosis of SLE, and met ≥ 4 American College of Rheumatology (ACR) classification criteria (16). They had been diagnosed by rheumatologists and were regularly followed up in rheumatology outpatient clinics. Patients were excluded if they had a history of cancer, chronic liver and/or renal failure, evidence of acute and/or chronic active infection, and/or any other chronic autoimmune disease other than a condition such as antiphospholipid and/or Sjögren's syndrome associated with SLE. Patients with diabetes mellitus were excluded. All patients had to have a fasting blood glucose < 110 mg/dl, and none of them was being treated with hypoglycaemic drugs or insulin. Research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committees of the Hospital Universitario de Canarias and the Hospital Universitario Doctor Negrín (both in Spain), and all subjects provided informed written consent (approval number 2015_84).

Data collection

Patients included in the study completed a medication use questionnaire and underwent a physical examination. Medical records were reviewed to verify specific diagnoses and medications. SLE disease activity and damage were assessed using the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) (17) and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index -SDI- (18), respectively. For the present study, the SLEDAI-2K index was divided into none (0 points), mild (1-5 points), moderate (6-10 points), high (11-19 points),

and very high activity (>20 points) as previously described (19). The severity of the disease was measured using the Katz index (20). The presence of metabolic syndrome was determined using the National Cholesterol Education Program (NCEP/ATPIII) criteria (21). According to the NCEP ATP III definition, metabolic syndrome is present if three or more of the following five criteria are met: waist circumference over 102 cm (men) or 88 cm (women), blood pressure over 130/85 mmHg, fasting triglyceride level over 150 mg/dl, fasting high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level less than 40 mg/dl (men) or 50 mg/dl (women) and fasting blood sugar over 100 mg/dl.

Laboratory assessments

The homeostatic model assessment (HOMA) method was performed to determine IR. Briefly, the HOMA model enabled an estimate of insulin sensitivity (%S) and β -cell function (%B) from fasting plasma insulin, C peptide, and glucose concentrations. In this study we used HOMA2, the updated-computer HOMA model (22). This model can be used to assess insulin sensitivity and β -cell function from paired fasting plasma glucose and specific insulin, or C peptide, concentrations across a range of 1–2,200 pmol/l for insulin and 1–25 mmol/l for glucose. C peptide better estimates β -cell function since it is a marker of secretion; and insulin data is preferable when calculating %S since HOMA-%S is derived from glucose disposal as a function of insulin concentration. In our study, IR and %S were calculated using insulin serum levels. Otherwise, %B was calculated using C-peptide serum levels. The computer model provided a value for insulin sensitivity expressed as HOMA2-%S (in which 100% is normal). HOMA2-IR (insulin resistance index) is simply the reciprocal of %S. Insulin (Architect Abbott, 2000I) and C peptide (Immulate 2000, Siemens) were determined by chemiluminescent immunometric assays. Additionally, standard techniques were used to measure plasma glucose, C-reactive protein, and serum lipids. The SVAR functional C assays under the Wieslab® brand (Sweden) were

used to assess the activity of the classical (CL), alternative (AL) and lectin (LE) pathways. These tests combine principles of the haemolytic assay for C function with the use of labelled antibodies specific for the neoantigen produced as the result of C activation. The amount of neoantigen generated is proportional to the functional activity of C pathways. Microtitre strip wells are coated with CL, LE, or AL pathway-specific activators. The patient's serum is diluted in a diluent containing a specific blocker to ensure that only the studied pathway is activated. During the incubation of the diluted patient serum in the wells, the specific coating activates C. The wells are then washed, and C5b-9 is detected with an alkaline phosphatase labeled specific antibody against the neoantigen expressed during membrane attack complex formation. After an additional washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with alkaline phosphatase substrate solution. The amount of C activation correlates with the intensity of the color and is measured in terms of absorbance (optical density). The amount of formed membrane attack complex (neo-epitope) reflects the activity of the C cascade. The result is expressed semi-quantitatively using the optical density ratio between a positive control and the sample. Wieslab® has validated these functional assays by studying their correlation and concordance with the classical CH50 and AH50 haemolytic tests (<https://www.svarlifescience.com/>). C2, C3, C3a, C4 and C1q were analysed by turbidimetry (Roche), C1-inhibitor -C1-inh- was analysed through nephelometry (Siemens) whereas factor D and factor H were assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA Duoset, R&D). Both intra and inter-coefficients of variability were <10% for these assays. Fasting serum samples were collected and frozen at -80°C until analysis of C system.

Statistical analysis

Demographic and clinical characteristics were described as mean \pm standard deviation (SD) or percentages for categorical variables. For non-normally distributed continuous variables, data

were expressed as median and interquartile range (IQR). The relationship of circulating C system molecules and pathways functional tests with IR indices and the presence of metabolic syndrome was assessed through multivariable linear and logistic regression analysis. Confounders were selected if they had a significant relationship with exposure or outcome with a *p*-value less than 0.20 and were not on the causal pathway between both variables. All the analyses used a 5% two-sided significance level and were performed using Stata software, v. 17/SE (StataCorp, College Station, TX, USA). *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Demographic and disease-related data of patients with systemic lupus erythematosus

Demographic and disease-related characteristics of patients with SLE are shown in Table I. Most of them were women (92%) and the mean age \pm SD was 49 \pm 12 years. The age of diagnosis was 34 \pm 13 years, and the duration of the disease was 15 \pm 10 years. At the time of recruitment, 66% of the patients were positive for anti-DNA and 70% for extractable nuclear antigens -ENA-, with anti-SSA being the most frequently found antibody (35%). Sixteen percent of patients met the definition of associated antiphospholipid syndrome, and 35% had at least one positive antiphospholipid antibody. Most patients with SLE were in the categories of no activity (39%) or mild-moderate activity (56%) as shown by the SLEDAI-2K score. SDI and Katz indexes were 1 (IQR 0–2) and 2 (IQR 1–4), respectively. Sixty-three percent of the patients had an SDI score equal to or higher than 1. Regarding treatments at the time of assessment, half of the patients (48%) were taking glucocorticoids and the median equivalent daily dose of prednisone was 5 mg/day (IQR 4.25–7.5 mg). Seventy percent of the patients were taking hydroxychloroquine when the study was performed. Other less commonly used drugs were methotrexate (11%) and azathioprine (16%). Table I shows additional information on the data related to SLE.

Table I. Demographics and disease-related data of SLE patients.

	SLE (n=225)
Age, years	49 ± 12
Female, n (%)	207 (92)
SLE related data	
Age at diagnosis, years	34 ± 13
Disease duration, years	15 ± 10
Antiphospholipid syndrome, n (%)	35 (16)
Auto-antibody profile	
Anti-DNA positive, n (%)	113 (66)
ENA positive, n (%)	133 (70)
Anti-Sm	15 (8)
Anti-ribosome	11 (8)
Anti-nucleosome	27 (20)
Anti-histone	18 (13)
Anti-RNP	46 (25)
Anti-SSA	50 (35)
Anti-SSB	5 (4)
Antiphospholipid antibodies, n (%)	39 (35)
ACA IgM	16 (10)
ACA IgG	29 (19)
Anti beta2 glycoprotein IgM	13 (9)
Anti beta2 glycoprotein IgG	24 (16)
Disease scores	
Median SLEDAI-2K	2 (0-4)
SLEDAI-2K categories	
No activity, n (%)	84 (39)
Mild, n (%)	83 (39)
Moderate, n (%)	36 (17)
High or Very High, n (%)	11 (5)
Median SDI	1 (0-2)
SDI ≥ 1, n (%)	141 (63)
Katz Index	2 (1-4)
Katz ≥ 3, n (%)	100 (44)
Comorbidity	
Smoking, n (%)	57 (25)
Hypertension, n (%)	76 (34)
Dyslipidaemia, n (%)	168 (75)
Abdominal circumference, cm	92 ± 14
Body mass index, kg/m ²	27 ± 6
Obesity, n (%)	63 (28)
Metabolic syndrome, n (%)	75 (33)
Treatment at the time of the visit	
Statins use, n (%)	48 (21)
Aspirin use, n (%)	63 (29)
Glucocorticoids, n (%)	107 (48)
Prednisone equivalent daily dose, mg	5 (4.25-7.5)
Antimalarials drugs, n (%)	155 (70)
Methotrexate, n (%)	24 (11)
Azathioprine, n (%)	35 (16)
Mycophenolate mofetil, n (%)	26 (12)
Belimumab, n (%)	7 (3)
Rituximab, n (%)	6 (3)
Glucose homeostasis molecules and IR indices	
Glucose, mg/dl	91 ± 9
Insulin, µU/ml	6.8 (4.4-9.9)
C-peptide, ng/ml	2.2 (1.5-3.4)
HOMA2-IR	0.88 (0.60-1.30)
HOMA2-S%	115 (78-171)
HOMA2-B%-C-peptide	134 (99-180)
Functional complement assays, %	
Classical pathway	80 ± 40
Lectin pathway	9 (1-40)
Alternative pathway	35 (7-71)
Individual complement components	
C1q, mg/dl	34 ± 11
C2, mg/dl	2.4 ± 1.2
C4, mg/dl	20 ± 12
Factor D, ng/ml	2517 ± 1808
C3, mg/dl	128 ± 36
C3a, mg/dl	38 ± 10
C1 inhibitor, mg/dl	32 ± 8
Factor H, ng/ml x10e-3	587 (173-923)

Data represent mean ± SD or median (interquartile range) when data were not normally distributed. SLEDAI categories were defined as: 0 no activity; 1-5 mild; 6-10 moderate; >10 high activity. ENA: extractable nuclear antibodies; ACA: anticardiolipin antibodies; SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SDI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index; HOMA2-IR: Insulin resistance index through homeostatic model assessment (calculated with glucose and insulin serum levels). HOMA2-S%: Insulin sensitivity index through homeostatic model assessment (calculated with glucose and insulin serum levels). HOMA2-B%-C-peptide: β-cell function index through homeostatic model assessment (calculated with glucose and C-peptide serum levels).

Functional C assays of the CL, AL and LE pathways were 80±40%, 35 (IQR 7–71)% and 9 (IQR 1–40)%, respectively. Besides, single C components C1q, C2, C3, C4 and factor D (inactivated zimogens), activated molecule C3a, and regulators (C1-inh and and factor H) serum values are shown in Table I. HOMA2-IR was 0.88 (IQR 0.60–1.30) and HOMA2-B%-C peptide had a value of 134 (IQR 99–180). Thirty-three percent of the patients met the definition of metabolic syndrome (Table I).

Univariable associations of demographics and disease related data with HOMA2-IR and HOMA2-B% are shown in Supplementary Table S1. Traditional IR risk factors such as hypertension, obesity, dyslipidaemia, body mass index (BMI), and waist circumference were highly and significantly associated with higher values of both IR and β-cell function. Regarding SLE related data, disease damage (SDI) and severity (Katz) scores were significantly associated with higher values of β-cell function. Similarly, the presence of ENA, and, specifically, positivity to anti-SSB, were also significantly related to a greater HOMA2-B%.

Association of complement system pathways with insulin resistance indices

C system pathways functional tests and individual elements showed significant relationships with IR indices in the univariable and multivariable analysis (Table II). In this regard, after multivariable analysis that included age, hypertension, dyslipidaemia, BMI and the use of statins and prednisone, serum C3a and factor H values were associated with higher HOMA2-IR levels. In contrast, after adjusting for covariates, no relationship was found between system C and the HOMA2-B% index expressing β-cell function.

Differences of C system pathways between patients with and without metabolic syndrome

Seventy-five (33%) patients fulfilled the definition of metabolic syndrome using the NCEP ATP III criteria. The differences between SLE patients with and without metabolic syndrome are shown in

Table II. Relationship of complement system to insulin resistance and beta cell function indices.

	HOMA2-IR x 100				HOMA2-B%-C-peptide			
	Beta coef. (95%), p							
	Univariable		Multivariable		Univariable		Multivariable	
<i>Classical pathway</i>								
Functional test, %	0.3 (-0.05-0.6)	0.094	0.1 (-0.2-0.5)	0.36	0.08 (-0.2-0.4)	0.61	-0.03 (-0.3-0.3)	0.83
C1q, mg/dl	0.05 (-0.8-2)	0.45	0.03 (-1-1)	0.96	1 (0.2-2)	0.023	0.9 (-0.2-2)	0.099
<i>Lectin pathway</i>								
Functional test, %	0.1 (-0.2-0.4)	0.46	0.07 (-0.2-0.4)	0.66	-0.09 (-0.4-0.2)	0.53	-0.1 (-0.4-0.1)	0.35
<i>Common elements of the classical and lectin pathways</i>								
C2, mg/dl	-4 (-15-8)	0.52	-8 (-20-3)	0.13	8 (-2-18)	0.13	5 (-5-15)	0.31
C4, mg/dl	0.6 (-0.6-2)	0.34	0.4 (-0.9-2)	0.56	0.5 (-0.5-2)	0.33	0.4 (-0.6-1)	0.99
C1 inhibitor, mg/dl	2 (0.06-4)	0.043	0.8 (-1-3)	0.44	2 (0.03-3)	0.018	1 (-0.6-3)	0.22
<i>Alternative pathway</i>								
Functional test, %	0.4 (0.03-0.8)	0.032	0.3 (-0.04-0.7)	0.082	-0.07 (-0.4-0.3)	0.68	-0.1 (-0.5-0.2)	0.37
Factor D, ng/ml	0.003 (-0.006-0.01)	0.57	-0.0003 (-0.009-0.009)	0.94	-0.0005 (-0.008-0.007)	0.90	-0.0005 (-0.008-0.007)	0.90
<i>Common elements of the three pathways</i>								
C3, mg/dl	0.4 (-0.05-0.7)	0.083	0.2 (-0.3-0.6)	0.48	0.1 (-0.2-0.5)	0.41	0.06 (-0.3-0.4)	0.73
C3a, mg/dl	3 (1-4)	<0.001	2 (0.2-3)	0.030	2 (0.7-3)	0.003	1 (-0.1-2)	0.081
Factor H, ng/ml x10e-3	0.02 (0.002-0.04)	0.033	0.02 (0.003-0.04)	0.019	0.005 (-0.01-0.02)	0.51	0.006 (-0.008-0.02)	0.39

Beta coefficients are expressed using HOMA2-IR and HOMA2-B% as the dependent variables. Linear regression analysis is adjusted for age, hypertension, dyslipidaemia, body mass index and the use of statins and prednisone. HOMA2-IR is calculated using insulin and glucose serum levels; HOMA2-B% is calculated with circulating C peptide and glucose. Significant p-values are depicted in bold.

Table III. Differences of C system pathways between patients with and without metabolic syndrome.

	Metabolic syndrome			Univariable		Multivariable	
	No=148	Yes=75	p	Odds ratio, 95%(CI)	p	Odds ratio, 95%(CI)	p
<i>Classical pathway</i>							
Functional test, %	85 ± 41	98 ± 36	0.036	1.01 (1.00-1.02)	0.038	1.00 (0.99-1.01)	0.26
C1q, mg/dl	32 ± 9	37 ± 13	0.004	1.04 (1.01-1.07)	0.005	1.04 (1.01-1.07)	0.011
<i>Lectin pathway</i>							
Functional test, %	8 (1-41)	9 (1-39)	0.76	1.00 (0.99-1.01)	0.76	-	-
<i>Common elements of the classical and lectin pathways</i>							
C2, mg/dl	2.3 ± 1.1	2.6 ± 1.3	0.060	1.26 (0.99-1.60)	0.062	1.28 (0.98-1.66)	0.070
C4, mg/dl	20 ± 11	22 ± 13	0.14	1.02 (0.99-1.04)	0.15	1.01 (0.99-1.04)	0.36
C1 inhibitor, mg/dl	31 ± 9	34 ± 7	0.047	1.04 (1.00-1.08)	0.050	1.02 (0.98-1.07)	0.31
<i>Alternative pathway</i>							
Functional test, %	35 (6-67)	42 (10-80)	0.13	1.01 (1.00-1.01)	0.13	1.01 (0.99-1.02)	0.19
Factor D, ng/ml	2238 ± 1617	3055 ± 2041	0.004	1.00 (1.00-1.00)	0.010	1.00 (0.99-1.00)	0.064
<i>Common elements of the three pathways</i>							
C3, mg/dl	122 ± 30	141 ± 42	<0.001	1.02 (1.01-1.03)	0.000	1.02 (1.01-1.03)	0.001
C3a, mg/dl	37 ± 8	40 ± 12	0.033	1.03 (1.00-1.06)	0.036	1.03 (0.99-1.06)	0.12
Factor H, ng/ml x10e-3	385 (284-550)	389 (291-614)	0.51	1 (0.99-1)	0.52	-	-

According to the NCEP ATP III definition, metabolic syndrome is present if three or more of the following five criteria are met: waist circumference over 102 cm (men) or 88 cm (women), blood pressure over 130/85 mmHg, fasting triglyceride (TG) level over 150 mg/dl, fasting high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level less than 40 mg/dl (men) or 50 mg/dl (women) and fasting blood sugar over 100 mg/dl. Metabolic syndrome is considered the dependent variable in this analysis. NCEP ATP III criteria for metabolic syndrome could not be calculated in 2 of 225 patients. Multivariable analysis is adjusted for age, prednisone and hydroxychloroquine intake. Significant p-values are depicted in bold.

Supplementary Table S2. In this regard, as expected, patients with metabolic syndrome were significantly older, used statins and antihypertensive treatment more frequently, suffered more commonly obesity and dyslipidaemia, and had higher values of BMI and abdominal circumference. Regarding disease-related data, in the univariable analysis, patients with metabolic syndrome had more accrual damage measured through the SDI score, and less frequently were

taking hydroxychloroquine when the study was performed (Suppl. Table S2). Besides, SLE patients with metabolic syndrome had some differences in C system routes functional assays and inactive and active individual C elements. With respect to this, in the univariable analysis, patients with metabolic syndrome exhibited higher serum levels of C1q, factor D, C3, C3a and C1-inh (Table III). Besides, in the multivariable analysis, after adjustment for

covariates, serum levels of C1q and C3 were associated with a higher odds ratio for the presence of metabolic syndrome (Table III).

Discussion

The present study evaluated for the first time the relationship between a complete characterisation of the C system and IR in patients with SLE. According to our results, both processes seem to be linked independently. Given that the key

phenomenon in SLE pathophysiology is the presence of a dysfunctional C system, our findings suggest that alteration of the C pathways may influence the changes in insulin sensitivity that these patients present. However, the interplay between C and IR observed in our study points to a predominant role of the AL pathway elements, rather than plasmatic activation of the CL pathway.

Previous studies have shown that IR is increased in patients with SLE compared with control subjects, that C-peptide levels are up-regulated in these patients (23, 24), and that IR is related to the disease damage accrual and may accelerate subclinical atherosclerosis (4). The patients with SLE in our series presented IR levels around one. This means that they did not have high IR levels. However, β -cell function was upregulated. This is probably consistent with the fact that the patients had a pre-insulin resistant state. It is known that the first mechanism to be altered in the process leading to IR is β -cell function, raising C-peptide and the corresponding indices of β -cell function. Subsequently, as the process progresses, the development of a peripheral phenomenon occurs that will eventually lead to hyperglycaemia (23). We believe this is the case in our SLE population in which β -cell dysfunction was evidenced, but IR indices remained within the normal range. We understand this is likely because the patients were relatively young and had low to moderate disease activity at enrolment. Despite this, in our series, SDI and Katz Severity Index were associated with IR. This has been described previously and supports the notion that the pathophysiological mechanisms of the disease lead to the alteration in hydrocarbon metabolism (25).

There are no studies in the literature that have studied the relationship between a complete analysis of the C system, which includes the evaluation of its three pathways and activated and non-activated components, and the presence of IR. Remarkably, factor H and C3a, which are common elements of the three pathways, showed an independent relationship to HOMA2-IR. This fact is not expected in a plasmatic C activation scenario, where factor H should be con-

sumed. On the other hand, C3a levels were also positively associated, even though plasmatic C activation measured through functional assays was not apparent. Similarly, C1q and C3 were positively related to the presence of metabolic syndrome after adjustment for confounders. Interestingly, other studies have also found positive relations between IR and C3 in non SLE patients (26), and between IR and C1q in murine models and *in vitro* experiments (11). Besides, positive relationships between C and IR and metabolic syndrome in our cohort occurred even though SLE pathophysiology is characterised by activation of the classical pathway by immune complexes, which usually leads to hypocomplementaemia. However, it is known that the majority of the C elements are acute phase reactants, and they rise in inflammatory states (27). Non-canonical activation mechanisms of the alternative pathway through innate and adaptative immune cells (28), and the presence of autoantibodies and mutations that interfere with factor H function (29), could have also contributed to these positive associations between C system parameters and IR related variables.

Thirty-three percent of the patients in our series met the definition of metabolic syndrome. This is consistent with the fact that the prevalence of metabolic syndrome in SLE has been reported to range from 18% to 30% depending on the definitions of the syndrome, the size of the sample, the age of the patients, the distribution by gender, and bias in patient selection (30). In a previous study of 50 women with SLE, patients with metabolic syndrome had significantly higher serum concentrations of C3 and C4 (31). Similarly, in another study of 114 patients with SLE in whom twenty-three (16%) met the criteria for metabolic syndrome, higher serum levels of C3, but not C4, were related to the presence of metabolic syndrome (32). In contrast, in a report of 200 women with SLE, the presence of low C3 levels (as a binary variable) in 10 subjects was associated with a higher odds ratio for the presence of metabolic syndrome (33). Compared with previous reports, our study has recruited a larger number of patients, the

characterisation of the complement system was more exhaustive, and we performed a multivariable analysis.

In our work we found that patients with metabolic syndrome took hydroxychloroquine less frequently. This speaks in favor of a protective role of this drug for the development of metabolic syndrome. The protective effect on the prevalence of metabolic syndrome in SLE patients has been described before. For example, in a report of 104 SLE patients, chloroquine was less frequently used in metabolic syndrome-SLE patients (34). It is believed that the anti-hyperglycaemic, anti-hyperlipidaemic, cardioprotective, anti-hypertensive, and anti-obesity effects of antimalarials might be elicited through reduction of inflammatory response and oxidative stress, improvement of endothelial function, activation of insulin signalling pathway, inhibition of lipogenesis and autophagy, as well as regulation of adipokines and apoptosis (35).

We also recognise some limitations. For example, our study has a cross-sectional design and therefore it cannot be inferred how disruption of C might affect IR in SLE patients over time. In addition, the euglycemic hyperinsulinaemic clamp test is considered the gold standard for IR measurement. However, it is technically complex and cannot be performed in a large number of patients like those recruited in our work. For this reason, we used the HOMA2 index which compares favourably with the clamp method (22).

The link between C system and IR has some potential avenues of research that will need to be pursued. This includes biology approaches, such as transcriptomics, proteomics, and metabolomics, to comprehensively analyse the changes induced by C activation in insulin-resistant states; to explore the potential of C-targeted therapies in improving insulin sensitivity and glycaemic control; or conducting observational and interventional studies in human populations to establish correlations between C activation, IR, and metabolic disorders.

In conclusion, C system is linked to IR and metabolic syndrome in SLE patients, with a predominant role of the alternative pathway elements.

References

1. TSALAMANDRIS S, ANTONOPOULOS AS, OIKONOMOU E *et al.*: The role of inflammation in diabetes: current concepts and future perspectives. *Eur Cardiol* 2019; 14(1): 50-59. <https://doi.org/10.15420/ecr.2018.33.1>
2. ORMAZABAL V, NAIR S, ELFEKY O, AGUAYO C, SALOMON C, ZUÑIGA FA: Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 2018;17(1): 122. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>
3. DE LUCA C, OLEFSKY JM: Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008; 582(1): 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.057>
4. SÁNCHEZ-PÉREZ H, TEJERA-SEGURA B, DE VERA-GONZÁLEZ A *et al.*: Insulin resistance in systemic lupus erythematosus patients: Contributing factors and relationship with subclinical atherosclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35(6): 885-92.
5. QUEVEDO-ABELEDI JC, HERNANDEZ-DÍAZ M, SÁNCHEZ-PÉREZ H *et al.*: Amylin serum levels are upregulated in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2022; 40(7): 1378-84. <https://doi.org/10.55563/clinexp/rheumatol/h5cidq>
6. MARTÍN-GONZÁLEZ C, FERRER-MOURE C, QUEVEDO-ABELEDI JC, GONZÁLEZ-GAY M, FERRAZ-AMARO I: Apolipoprotein C3 and beta-cell dysfunction are linked in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2022; 40(11): 2032-7. <https://doi.org/10.55563/clinexp/rheumatol/cejnir>
7. GARCÍA-DORTA A, QUEVEDO-ABELEDI JC, RUA-FIGUEROA Í *et al.*: Beta-cell function is disrupted in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2021; 60(8): 3826-33. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa874>
8. TEJERA-SEGURA B, LÓPEZ-MEJÍAS R, DOMÍNGUEZ-LUIS MJ *et al.*: Incretins in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017; 19(1): 229. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1431-9>
9. FERRAZ-AMARO I, GONZÁLEZ-JUANATEY C, LÓPEZ-MEJÍAS R, RIANCHO-ZARRABELTIA L, GONZÁLEZ-GAY MA: Metabolic syndrome in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 710928. <https://doi.org/10.1155/2013/710928>
10. FERRAZ-AMARO I, GARCÍA-DOPICO JA, MEDINA-VEGA L, GONZÁLEZ-GAY MA, DÍAZ-GONZÁLEZ F: Impaired beta cell function is present in nondiabetic rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(1): R17. <https://doi.org/10.1186/ar4149>
11. SHIM K, BEGUM R, YANG C, WANG H: Complement activation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2020; 11(1): 1-12. <https://doi.org/10.4239/wjdv11.i1.1>
12. AJJAN RA, SCHROEDER V: Role of complement in diabetes. *Mol Immunol* 2019; 114: 270-7. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.07.031>
13. SZÉPLAKI G, PROHÁSZKA Z, DUBA J *et al.*: Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. *Atherosclerosis* 2004;177(2): 383-9. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.022>
14. ENGSTRÖM G, HEDBLAD BO, JANZON L, LINDGÄRDE F: Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based cohort study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(3): 392-7. <https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000244582.30421.b2>
15. DISTELMAIER K, ADLBRUCH C, JAKOWITSCH J *et al.*: Local complement activation triggers neutrophil recruitment to the site of thrombus formation in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2009; 102(3): 564-72. <https://doi.org/10.1160/th09-02-0103>
16. HOCHBERG MC: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1725. <https://doi.org/10.1002/art.1780400928>
17. GLADMAN DD, IBÁÑEZ D, UROWLITZ MB: Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002; 29(2): 288-91.
18. GLADMAN D, GINZLER E, GOLDSMITH C *et al.*: The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39(3): 363-9. <https://doi.org/10.1002/art.1780390303>
19. MOSCA M, BOMBARDIERI S: Assessing remission in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24(6 Suppl. 43): S99-104.
20. KATZ JD, SENEGAL J-L, RIVEST C, GOULET J-R, ROTHFIELD N: A simple severity of disease index for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993; 2(2): 119-23. <https://doi.org/10.1177/096120339300200210>
21. CLEEMAN JI: Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285(19): 2486-97. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
22. WALLACE TM, LEVY JC, MATTHEWS DR: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004; 27(6): 1487-95. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.6.1487>
23. CERF ME: Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 37. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00037>
24. ZUCCHI D, ELEFANTE E, SCHILIRÒ D *et al.*: One year in review 2022: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2022; 40(1): 4-14. <https://doi.org/10.55563/clinexp/rheumatol/nolysy>
25. KUO CY, TSAI TY, HUANG YC: Insulin resistance and serum levels of adipokines in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Lupus* 2020; 29(9): 1078-84. <https://doi.org/10.1177/0961203320935185>
26. ONAT A, CAN G, REZVANI R, CIANFLONE K: Complement C3 and cleavage products in cardiometabolic risk. *Clin Chim Acta* 2011; 412(13-14): 1171-9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.03.005>
27. MARKIEWSKI MM, LAMBRIS JD: The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* 2007; 171(3): 715. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070166>
28. HARRISON RA, HARRIS CL, THURMAN JM: The complement alternative pathway in health and disease-activation or amplification? *Immunol Rev* 2023; 313(1): 6-14. <https://doi.org/10.1111/imr.13172>
29. LUCIENTES-CONTINENTE L, MÁRQUEZ-TIRADO B, GOICOECHEA DE JORGE E: The Factor H protein family: The switchers of the complement alternative pathway. *Immunol Rev* 2023; 313(1): 25-45.
30. MOK CC: Metabolic syndrome and systemic lupus erythematosus: the connection. *Expert Rev Clin Immunol* 2019; 15(7): 765-75. <https://doi.org/10.1111/imr.13166>
31. CASTEJON R, JIMENEZ-ORTIZ C, ROSADO S, TUTOR-URETA P, MELLOR-PITA S, YEBRABANGO M: Metabolic syndrome is associated with decreased circulating endothelial progenitor cells and increased arterial stiffness in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2016; 25(2): 129-36. <https://doi.org/10.1177/0961203315603138>
32. BULTINK IEM, TURKSTRA F, DIAMANT M, DIJKMANS BAC, VOSKUYLA E: Prevalence of and risk factors for the metabolic syndrome in women with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(1): 32-8.
33. PARKER B, AHMAD Y, SHELMEARDINE J *et al.*: An analysis of the metabolic syndrome phenotype in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20(14): 1459-65. <https://doi.org/10.1177/0961203311416695>
34. MUNIZ LF, PEREIRA RMR, SILVA TF, BONFÁ E, BORBA EF: Impact of therapy on metabolic syndrome in young adult premenopausal female lupus patients: beneficial effect of antimalarials. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015; 67(9): 1255-62. <https://doi.org/10.1002/acr.22593>
35. WONG SK: Repurposing new use for old drug chloroquine against metabolic syndrome: a review on animal and human evidence. *Int J Med Sci* 2021; 18: 2673. <https://doi.org/10.7150/ijms.58147>



Article

HDL Cholesterol Efflux and the Complement System Are Linked in Systemic Lupus Erythematosus

María García-González ¹, Fuensanta Gómez-Bernal ², Juan C. Quevedo-Abeledo ³,
Yolanda Fernández-Cladera ², Agustín F. González-Rivero ², Raquel López-Mejías ⁴,
Federico Díaz-González ^{1,5}, Miguel Á. González-Gay ^{6,7,*} and Iván Ferraz-Amaro ^{1,5,*}

¹ Division of Rheumatology, Hospital Universitario de Canarias, 38320 Tenerife, Spain; margagon23@hotmail.com (M.G.-G.); federico.diaz.gonzalez@gmail.com (F.D.-G.)

² Division of Central Laboratory, Hospital Universitario de Canarias, 38320 Tenerife, Spain; fuensanta95@gmail.com (F.G.-B.); yolanda.fernandezcladera@gmail.com (Y.F.-C.); afgonriv@gmail.com (A.F.G.-R.)

³ Division of Rheumatology, Hospital Doctor Negrín, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; quevedojcarlos@yahoo.es

⁴ Epidemiology, Genetics and Atherosclerosis Research Group on Systemic Inflammatory Diseases, Instituto de Investigación sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, Spain; rlopezmejias78@gmail.com

⁵ Department of Internal Medicine, University of La Laguna (ULL), 38200 Tenerife, Spain

⁶ Division of Rheumatology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain

⁷ Department of Medicine and Psychiatry, University of Cantabria, 39005 Santander, Spain

* Correspondence: miguelaggay@hotmail.com (M.Á.G.-G.); iferrazamaro@hotmail.com (I.F.-A.)

Abstract: Cholesterol efflux capacity (CEC), the ability of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol to accept cholesterol from macrophages, has been linked to cardiovascular events. Systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by the consumption of complement (C) proteins and has been associated with an increased risk of cardiovascular disease. CEC is reduced in SLE patients compared to controls. In the present work, our objective was to analyze whether the disruption of C influences CEC in patients with SLE. New-generation functional assays of the three pathways of the C system were performed in 207 patients with SLE. Additionally, serum levels of inactive (C1q, C2, C3, C4, and factor D) and activated (C3a) molecules, and regulators (C1-inhibitor and factor H) of C system were measured. CEC, using an in vitro assay, and lipoprotein serum concentrations were assessed. Multivariable linear regression analysis was performed to assess the relationship between C system and CEC. After full multivariable analysis, the alternative C cascade functional test showed a significant and negative relationship with CEC. This was also the case for C2 and C3, in which the associations were found to be positive and statistically significant, after adjustment for covariates. In conclusion, C system and CEC are interconnected in patients with SLE.

Keywords: cholesterol efflux capacity; complement system; systemic lupus erythematosus



Citation: García-González, M.; Gómez-Bernal, F.; Quevedo-Abeledo, J.C.; Fernández-Cladera, Y.; González-Rivero, A.F.; López-Mejías, R.; Díaz-González, F.; González-Gay, M.Á.; Ferraz-Amaro, I. HDL Cholesterol Efflux and the Complement System Are Linked in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 5405. <https://doi.org/10.3390/jcm12165405>

Academic Editor: Andrea Latini

Received: 22 July 2023

Revised: 7 August 2023

Accepted: 17 August 2023

Published: 20 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cholesterol efflux capacity (CEC) is the ability of an individual's high-density lipoproteins (HDL) to promote cholesterol efflux from cholesterol-donor cells, such as macrophages. In other words, CEC measures the process of reverse HDL cholesterol transport, whereby excess cellular cholesterol from peripheral tissues is transported to the liver, where it is excreted [1]. CEC has been inversely associated with the incidence of cardiovascular (CV) events in population-based cohorts [2].

Systemic lupus erythematosus (SLE) is associated with several CV manifestations, of which accelerated atherosclerosis with coronary artery disease is a major cause of morbidity and premature death [3]. In addition to a higher prevalence of traditional risk factors, glucocorticoid therapy, active disease, lupus nephritis, and antiphospholipid antibodies predispose SLE patients to a high risk of CV events [3]; besides, these patients often have an

altered lipid profile [4]. They have reduced CEC compared to matched controls regardless of other inflammation-related lipid pattern modifications that occur during the disease [5,6], and this has been associated with the presence of carotid plaques in patients with SLE. However, the exact mechanism that leads to impaired CEC in these patients remains unknown [6].

It has been described that the complement (C) system plays an important role in the pathogenesis of SLE. In this sense, SLE is associated with the activation and consumption of C, which can cause tissue damage. It is known that hereditary C deficiency can cause SLE, and disease processes in SLE result in the development of autoantibodies against certain C proteins [7]. In the present study, we have evaluated, in a large group of patients with SLE, the three pathways of the C system through functional assays and the measurement of the individual components of C belonging to these three pathways. Our objective was to analyze the relationship between this complete characterization of the C system and CEC in patients with SLE.

2. Materials and Methods

2.1. Study Participants

This cross-sectional study encompassed 207 individuals diagnosed with SLE. All participants were aged 18 years or older, possessed a clinical SLE diagnosis, and satisfied a minimum of 4 classification criteria for the disease as outlined by the American College of Rheumatology (ACR) [8]. Rheumatologists confirmed their SLE diagnoses, and these patients received regular monitoring at rheumatology outpatient clinics. Exclusions from the study involved individuals with a history of chronic liver ailments, cancer, renal failure, ongoing acute or chronic infections, or any other chronic autoimmune condition not directly linked to SLE (excluding conditions such as antiphospholipid syndrome and/or Sjögren's syndrome associated with SLE). The chosen participants displayed no known medical conditions or drug regimens that might impact lipid levels, and they were not utilizing lipid-lowering drugs apart from statins. The research adhered to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The study's protocol garnered approval from the Institutional Ethics Committees at Hospital Universitario de Canarias and Hospital Universitario Doctor Negrín (both situated in Spain), and all participants granted informed written consent (approval number 2015_84).

2.2. Data Collection

Patients who participated in the study were required to complete a questionnaire regarding their medication usage and also underwent a thorough physical examination. To ensure accuracy, their medical records were carefully reviewed to confirm specific diagnoses and medications. The researchers assessed the disease activity and damage related to SLE using established tools, namely, the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 (SLEDAI-2K) [9] and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index (SDI) [10], respectively. The SLEDAI-2K index was categorized into different levels of disease activity, including none (0 points), mild (1–5 points), moderate (6–10 points), high (11–19 points), and very high activity (>20 points), as previously defined [11]. The disease's severity was also measured using the Katz index [12].

2.3. Lipids and Cholesterol Efflux Assessments

Fasting serum samples were gathered and promptly frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent analysis of circulating lipids. Cholesterol, triglyceride, and HDL cholesterol levels underwent measurement through the enzymatic colorimetric assay (Roche). Lipoprotein A and lipoproteins were evaluated via a quantitative immunoturbidimetric assay (Roche). Cholesterol levels ranged from 0.08 to 20.7 mmol/L, with an intra-assay coefficient of variation at 0.3%. Triglyceride levels spanned from 4 to 1000 mg/dL, carrying an intra-assay coefficient of variation of 1.8%. HDL cholesterol levels ranged from 3 to 120 mg/dL, accompanied

by an intra-assay coefficient of variation at 0.9%. The atherogenic index was determined by employing the total cholesterol:HDL cholesterol ratio as per the Castelli formula. LDL cholesterol levels were derived using the Friedewald formula. High-sensitivity CRP was assessed using a standard technique.

Macrophage-specific cholesterol efflux capacity (CEC) was evaluated utilizing BODIPY cholesterol, adhering to a previously established procedure [13]. Initially, J774 macrophages were seeded in a 96-well plate at a density of 7×10^4 cells per well. On the following day, the cells were exposed to BODIPY-tagged cholesterol (25 μ M; Avanti Polar Lipids), 0.2% BSA, and 2 μ g/mL ACAT inhibitor Sandoz 58-035 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS) for a duration of 1 h. Afterward, the cells were rinsed with MEM-HEPES and incubated overnight in serum-free RPMI supplemented with 0.3 mM cAMP, 0.2% BSA, and 2 μ g/mL ACAT inhibitor. Apolipoprotein B-depleted plasma was obtained from study participants using polyethylene glycol precipitation. Subsequent to washing the BODIPY cholesterol-labeled cells again with MEM-HEPES, they were subjected to a 4 h incubation with 2.8% apolipoprotein B-depleted plasma, 0.15 mM cAMP, and 2 μ g/mL acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor in MEM-HEPES buffer at 37 °C. The extent of BODIPY cholesterol effluxed into the media was directly gauged using a spectrofluorometer plate reader (Tecan, Trading AG, Männedorf, Switzerland) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission detection at 530 nm. CEC was computed as the ratio of effluxed BODIPY cholesterol to the initial cellular content of BODIPY cholesterol. Each analysis was conducted in triplicate, and samples exceeding a 7% variation threshold were reanalyzed.

2.4. Complement System Assays

The SVAR Functional Complement Assays offered under the Wieslab® brand in Sweden are utilized to evaluate the activity of the classical, alternative, and lectin pathways within the complement system. These assays employ a combination of the hemolytic assay principle for assessing complement function along with the utilization of labeled antibodies specific to the neoantigen generated as a result of complement activation. The quantity of neoantigen produced is proportional to the functional activity of the complement pathways. In these assays, microtiter strip wells are coated with activators specific to the classical, alternative, or lectin pathways. The patient's serum is diluted using a diluent that contains a particular blocker, ensuring that only the targeted pathway is activated. During incubation of the diluted patient serum in the wells, the specific coating triggers complement activation. Subsequently, the wells are washed, and the presence of C5b-9 is detected using an alkaline phosphatase-labeled specific antibody directed against the neoantigen expressed during the formation of the membrane attack complex (MAC). Following an additional washing step, detection of the specific antibodies is achieved by incubating with an alkaline phosphatase substrate solution. The degree of complement activation is correlated with the intensity of color and quantified in terms of absorbance (optical density). The extent of MAC formation (neo-epitope) reflects the activity of the complement cascade. The test results are semiquantitatively expressed by calculating the optical density ratio between a positive control and the sample. Notably, lower levels of classical, alternative, and lectin cascade values indicate a greater activation of the respective pathway. Wieslab® has validated these functional assays by assessing their correlation and agreement with the classical CH50 and AH50 hemolytic tests (<https://www.svarlifescience.com/> accessed on 15 April 2023).

2.5. Statistical Analysis

Demographic and clinical characteristics were presented as mean \pm standard deviation (SD) or percentages for categorical variables. For continuous variables that did not follow a normal distribution, data were described as the median and interquartile range (IQR). To examine the relationship between circulating C system molecules and pathways with lipid profile-related molecules, multivariable linear regression analysis was employed. Confounding variables were selected if they demonstrated a significant association with

both the exposure and outcome variables, with a p -value below 0.20. To avoid issues of collinearity, regression models excluded variables that were derived from a formula, such as LDL cholesterol, LDL:HDL ratio, non-HDL cholesterol, ApoB:ApoA1, and atherogenic index. Collinearity in the multivariable regression models was assessed using the variance inflation factor (VIF), considering a VIF value greater than 10 as indicative of collinearity. All statistical analyses were conducted with a two-sided significance level set at 5% and were performed using Stata software, version 17/SE (StataCorp., College Station, TX, USA). The p -values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Demographic and Disease-Related Data of Patients with Systemic Lupus Erythematosus

Table 1 displays the demographic and disease-related characteristics of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. The majority of the participants were women, accounting for 94% of the sample, with a mean age \pm standard deviation (SD) of 50 ± 11 years. The average age of diagnosis was 35 ± 13 years, and the disease duration was 15 ± 10 years. Upon recruitment, 72% of the patients tested positive for anti-DNA antibodies, while 66% were positive for ENA (extractable nuclear antigens), with anti-SSA being the most detected antibody (38%). Twelve per cent of the patients met the criteria for associated antiphospholipid syndrome, and 35% exhibited at least one positive antiphospholipid antibody. Based on the SLE Disease Activity Index-2000 (SLEDAI-2K) score, the majority of patients fell into the categories of no activity (43%) or mild–moderate activity (62%). The median Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index (SDI) and Katz index scores were 1 (with an interquartile range—IQR of 0–2) and 2 (IQR 1–4), respectively. Seventy-five per cent of patients had an SDI score of 1 or higher, indicating some degree of damage associated with the disease. Regarding treatments at the time of assessment, half of the patients (50%) were taking glucocorticoids, with a median equivalent daily dose of prednisone at 5 mg/day (IQR 5–7.5 mg). Sixty-nine per cent of the patients were also receiving hydroxychloroquine during the study. Other less commonly used drugs included methotrexate (12%) and azathioprine (13%). Additional information related to SLE can be found in Table 1.

C assays values of the classical, alternative, and lectin pathways were $92 \pm 40\%$, 60 (IQR 22–88)% and 12 (IQR 1–42)%, respectively; besides, single C components serum values (C1q, C2, C4, C3 (inactive zymogens) and FD), activated molecule C3a, and regulators (C1-inhibitor (C1-inh)) are shown in Table 1.

3.2. Disease-Related Data Association with CEC

Demographics and disease-related data association with CEC is shown in Table 1. Overall, no associations were found between disease characteristics or comorbidity and CEC. Only the use of methotrexate showed a positive significant relationship to CEC (beta coef. 3 [95%CI 0.8–4], $p = 0.005$). Similarly, a positive trend to association with CEC was observed for azathioprine use. On the contrary, age and hypertension showed a trend to be negatively associated with CEC, although, in these cases, statistical significance was not reached.

3.3. Full Lipid Profile Molecules Relationship to Routes and Individual Elements of the C System

Values of the lipid profile molecules assessed in the present work are shown in Figure 1 and Supplementary Table S1. The univariable relation of these lipid pattern to the cascades functional assays and individual components of the C system is exposed as Spearman's rho correlation coefficients. In this sense, many associations were found in the univariable analysis. Regarding lipid molecules and ratios, most of the relations turned out to be positive (blue in the heatmap). The strongest ones, with a coefficient greater than 0.2, were found between C1q (classical pathway inactive zymogen) and the serum levels of LDL, LDL:HDL ratio, and non-HDL cholesterol; between C2 (common inactive zymogen of the classical and lectin pathways) and total cholesterol and non-HDL cholesterol; between the

alternative pathway functional test and apolipoprotein B; and between factor H (shared regulator of the three cascades) and apolipoprotein B and ApoB:ApoA1 ratio. The only negative significant relation between the C system and lipid molecules was observed between HDL and the active protein C3a. Regarding lipid profile indexes, the atherogenic index was positively related to C1q, C2, C1-inh (regulator of both the classical and lectin pathways), and C3a. On the other hand, CEC was significantly and negatively associated with the alternative pathway functional assay and positively with C4 (common inactive zymogen of the classical and lectin cascades). Remarkably, the functional test of the lectin pathway showed no significant relation with any of the lipid pattern variables, while the alternative route functional test, together with C1q, were the C parameters more broadly related with the lipid profile (Figure 1 and Supplementary Table S1).

Table 1. Demographics and disease-related data of SLE patients and their association with cholesterol efflux capacity.

		SLE (n = 207)		
		CEC%		
		β Coef. (95%CI)	<i>p</i>	
Age, years		50 ± 11	−0.04 (−0.09–0.02)	0.19
Female		195 (94)	−0.2 (−3–3)	0.91
SLE-related data				
Age at diagnosis, years		35 ± 13	−0.01 (−0.06–0.03)	0.57
Disease duration, years		15 ± 10	−0.02 (−0.09–0.04)	0.46
Antiphospholipid syndrome		24 (12)	0.02 (−2–2)	0.87
Auto-antibody profile				
	Anti-DNA positive	110 (72)	−0.8 (−2–0.7)	0.29
	ENA positive	123 (66)	0.2 (−1–2)	0.77
	Anti-Sm	22 (12)	−1 (−3–0.8)	0.24
	Anti-ribosome	10 (10)	1 (−2–5)	0.44
	Anti-nucleosome	15 (15)	1 (−2–4)	0.42
	Anti-histone	9 (9)	1 (−2–5)	0.41
	Anti-RNP	51 (29)	−0.6 (2–0.9)	0.44
	Anti-SSA	40 (38)	0.3 (−2–3)	0.77
	Anti-SSB	4 (4)	0.7 (−10–11)	0.90
	Antiphospholipid antibodies	31 (35)	0.02 (−2–2)	0.87
Disease scores				
	Median SLEDAI-2K	0 (0–2)	−0.02 (−0.2–0.2)	0.84
	SLEDAI-2K categories			
	No activity	85 (43)	-	-
	Mild activity	78 (40)	−1 (−2–0.4)	0.17
	Moderate activity	24 (12)	−0.5 (−2–1)	0.62
	High or very high activity	9 (5)		
	Median SDI	1 (0–2)	0.03 (−0.3–0.4)	0.85
	SDI ≥ 1	156 (75)	0.3 (−1–2)	0.70
	Katz index	2 (1–4)	0.2 (−0.1–0.5)	0.28
	Katz ≥ 3	86 (42)	1 (−0.3–2)	0.12
Comorbidity				
	Smoking	48 (23)	−0.05 (−1–1)	0.94
	Diabetes	11 (5)	−0.4 (−3–2)	0.76
	Hypertension	85 (41)	−0.9 (−2–0.4)	0.17
	Obesity	58 (28)	−0.4 (−2–1)	0.60
	Body mass index, kg/m ²	27 ± 6	0.04 (−0.07–0.2)	0.45
	Abdominal circumference, cm	93 ± 14	0.02 (−0.02–0.07)	0.33
Treatment at the time of the visit				

Table 1. *Cont.*

		SLE (n = 207)		
		CEC%		
		β Coef. (95%CI)	<i>p</i>	
	Statins	54 (26)	−0.2 (−2−1)	0.79
	Aspirin	55 (27)	−0.2 (−2−1)	0.82
	Antihypertensive treatment	78 (38)	−0.5 (−2−0.7)	0.41
	Glucocorticoids	102 (50)	0.7 (−0.5−2)	0.25
	Prednisone equivalent daily dose, mg	5 (5−7.5)	−0.09 (−0.4−0.2)	0.52
	Antimalarials drugs	141 (69)	0.1 (−1−1)	0.83
	Methotrexate	24 (12)	3 (0.8−4)	0.005
	Azathioprine	27 (13)	1 (−0.6−3)	0.19
	Mycophenolate mofetil	17 (8)	0.2 (−2−2)	0.86
	Belimumab	3 (1)	0.4 (−4−5)	0.86
	Rituximab	6 (3)	−1 (−5−2)	0.55
Complement system parameters				
<u>Functional complement assays, %</u>				
	Classical pathway	92 ± 40	−0.007 (−0.02−0.009)	0.39
	Lectin pathway	12 (1−42)	−0.008 (−0.02−0.007)	0.28
	Alternative pathway	60 (22−88)	−0.03 (−0.04−0.01)	0.001
<u>Individual complement components</u>				
	C1q, mg/dL	35 ± 11	0.004 (−0.02−0.08)	0.26
	C2, mg/dL	2.6 ± 1.3	0.5 (0.02−1)	0.043
	C4, mg/dL	21 ± 12	0.04 (−0.01−0.09)	0.15
	Factor D, ng/mL	2749 ± 1700	−0.0001 (−0.0006−0.0003)	0.55
	C3, mg/dL	134 ± 42	0.01 (−0.0009−0.03)	0.065
	C3a, mg/dL	38 ± 11	0.03 (−0.03−0.09)	0.28
	C1 inhibitor, mg/dL	31 ± 10	−0.02 (−0.08−0.05)	0.59
	Factor H, ng/mL × 10 ^{−3}	448 (302−745)	−0.0002 (−0.0009−0.0004)	0.45

Data represent mean ± SD or median (interquartile range) for quantitative variables, and frequency (percentage) for categorical variables. Significant *p* values are depicted in bold. In the univariable regression analysis, cholesterol efflux capacity (CEC) is the dependent variable. For categorized SLEDAI-2K ordinal variable, no activity category is taken as the reference level. SLEDAI-2K categories were defined as: 0, no activity; 1–5 mild; 6–10 moderate; >10 high activity. Aspirin use defined as 100–150 mg daily intake of acetylsalicylic acid. CEC: cholesterol efflux capacity. ENA: extractable nuclear antibodies. SLEDAI-2K: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index. SDI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index.

3.4. Multivariable Analysis of the Association of C System Pathways and Components with CEC

The association of C functional assays and individual C elements with CEC is represented in Table 2. We performed a multivariable analysis controlling for hypertension, Katz index, methotrexate, azathioprine (disease-related data that had a *p* value inferior to 0.20 in relation to CEC), statins intake, and all lipids profile molecules that were not derived from a formula (to avoid collinearity). After this adjustment, the functional assay of the alternative route showed a significant and negative relationship with CEC (beta coef. −0.02 [95%CI−0.04−−0.002], *p* = 0.030). This was also the case for C2 and C3 (inactive zymogen common to the three pathways), in which the associations were found to be positive and statistically significant (Table 2).

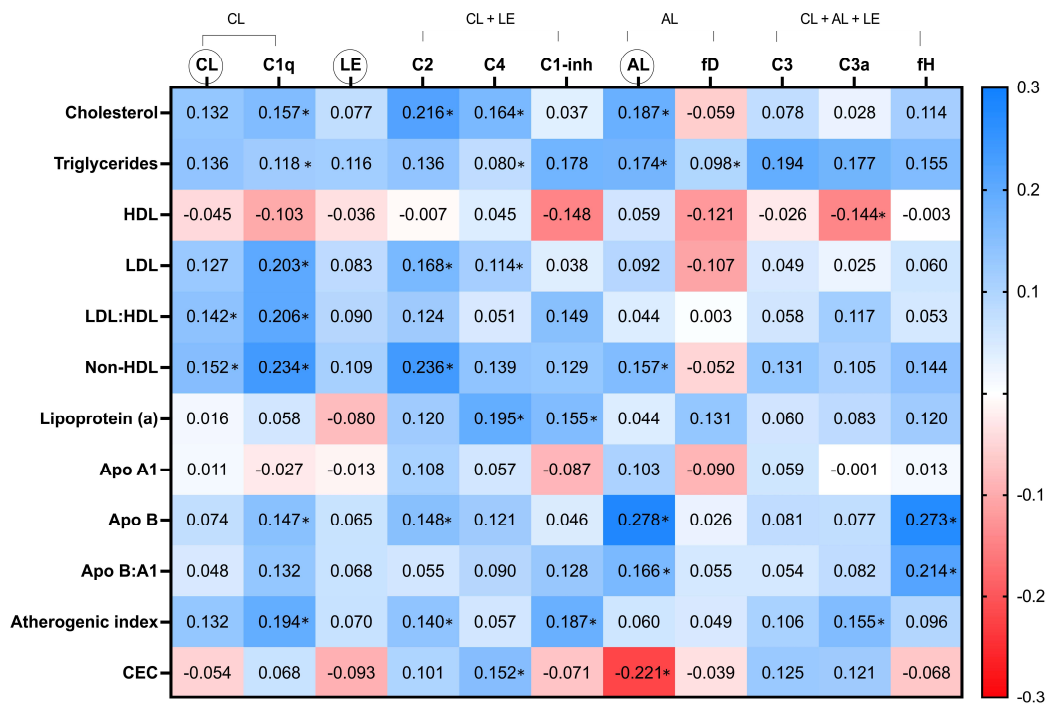


Figure 1. Heat map of the relationship of lipid profile molecules and complement pathways functional tests and individual elements. CL: classical, AL: alternative, LE: lectin, HDL: high-density lipoprotein cholesterol, LDL: low-density lipoprotein cholesterol, Apo: apolipoprotein, CEC: cholesterol efflux. CL, LE, and AL in circles refer to the functional tests of these cascades. Values in the cells represent Spearman’s rho coefficient (* denotes p value < 0.05).

Table 2. Multivariable analysis of the association of complement system pathways and components with cholesterol efflux capacity.

	β Coef. (95%CI), p			
	CEC%			
	Univariable		Multivariable	
<i>Classical pathway</i>				
Functional assay, %	−0.007 (−0.02–0.009)		0.39	
C1q, mg/dL	0.004 (−0.02–0.08)		0.26	
<i>Lectin pathway</i>				
Functional assay, %	−0.008 (−0.02–0.007)		0.28	
<i>Common elements of the classic and lectin pathways</i>				
C2, mg/dL	0.5 (0.02–1)		0.043	0.5 (0.005–1)
C4, mg/dL	0.04 (−0.01–0.09)		0.15	0.05 (−0.01–0.1)
C1 inhibitor, mg/dL	−0.02 (−0.08–0.05)		0.59	
<i>Alternative pathway</i>				
Functional assay, %	−0.03 (−0.04–−0.01)		0.001	−0.02 (−0.04–−0.002)
Factor D, ng/mL	−0.0001 (−0.0006–0.0003)		0.55	0.030
<i>Common elements of the three pathways</i>				
C3, mg/dL	0.01 (−0.0009–0.03)		0.065	0.02 (0.005–0.04)
C3a, mg/dL	0.03 (−0.03–0.09)		0.28	
Factor H, ng/mL × 10 ^{−3}	−0.0002 (−0.0009–0.0004)		0.45	

Complement routes and elements are considered the independent variable. Multivariable analysis is adjusted for hypertension, Katz index score ≥ 3 , methotrexate, azathioprine, statins intake and total cholesterol, HDL, lipoprotein (a), triglycerides and apolipoproteins A1 and B serum levels.

4. Discussion

The present report is an extension of a previous study in which we measured CEC in patients with SLE. In that work, we described that these patients had lower levels of CEC compared to matched controls, and that CEC was negatively and independently related to the presence of carotid plaque [6]. Our work now delves into the mechanisms that lead to this altered CEC in subjects with SLE. This study is the first in the literature to evaluate the relationship between the C system and CEC in patients in this autoimmune disease. According to our results, they could be related. In this sense, the disruption of the C system that occurs in patients with SLE may participate in the mechanisms that lead to the alteration of CEC observed in these patients.

Serum HDL cholesterol levels are inversely associated with CV disease events. It is the functional properties of HDL, in particular its reverse cholesterol transport capacity, and not simply its serum concentration, that are believed to be the key protective mechanism mediating its beneficial effect. The potential value of assessing macrophage CEC was evaluated in a study of 2924 individuals free from CV disease [2]. In this work, the primary endpoint was defined as a first nonfatal myocardial infarction, nonfatal stroke, or coronary revascularization or death from CV causes. After a median follow-up period of 9.4 years, there was a strong inverse relationship between cholesterol efflux capacity and the primary endpoint (adjusted hazard ratio (HR) 0.33, 95% CI 0.19–0.55) comparing the highest quartile with the lowest. Baseline HDL cholesterol was not associated with cardiovascular events in this study. Similarly, a recent meta-analysis has shown an inverse relationship between CEC levels and the risk of adverse CV events or atherosclerotic CV disease [13]. Moreover, CEC has also been evaluated as a CV disease risk predictor. In one study it improved risk prediction beyond that of coronary artery calcification, family history, and high-sensitivity C-reactive protein [14]. This seems to be the case not only in the general population but also in immune-mediated inflammatory diseases [15–19]. However, the mechanisms that link inflammation and CEC remain unknown.

C system is a complex network of proteins with a canonical role in the immune response; besides, its implication in metabolic disease processes such as atherosclerosis has been demonstrated. In this regard, it has been described that depending on the stage of C activation, C can either mitigate or promote lesion formation, and there is increasing evidence that local C expression is key to understanding atherosclerosis [20]. This has been supported by the fact that circulating C5 was significantly elevated in patients with subclinical atherosclerosis and was positively correlated with plaque volume and coronary calcification [21]. Furthermore, elevated serum C5a levels predicted future CV events in patients with symptomatic peripheral arterial disease regardless of acute phase markers [22]. Similarly, hyperactive terminal pathway activation as judged by serum C5b-9 complex levels was found to be associated with carotid plaque instability and acute ischemic stroke outcomes [23].

Regarding lipid profile molecules, a relationship between the C system and the metabolism and/or function of circulating lipoproteins has been suggested. For example, in a random population of 1068 subjects, circulating C3 levels were positively correlated with conventional CV risk factors, such as LDL cholesterol and triglycerides [24]. In the Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM), studies on plasma C concentrations (C3, properdin, factor H, factor D, C3a, Bb) and lipoprotein subclass profile (as measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy) were performed in 523 participants [25]. Those with higher C3 concentrations had more circulating VLDL, IDL, and LDL and small HDL [25]. All these findings were consistent with our analysis. However, none of the previously mentioned reports evaluated a complete characterization of the C system through measurement of C pathways functional tests and individual active, inactive, and regulatory components. In our work, we found that different C pathways and components were associated with many lipid profile molecules in the univariable analysis. In addition, after multivariable analysis, the levels of C2, which can be considered to belong to the classical and lectin pathways, and the levels of C3, a common element of the three pathways, pre-

sented a positive relationship with CEC. According to that, the inactive particles C2 and C3 have a beneficial relationship with higher levels of CEC. This implies that adverse CEC may be present in patients with lower C2 and C3 levels due to active disease. We also observed a negative relationship between CEC and the alternative pathway of the C. It is difficult to infer a certain expression pattern of C in its relation to CEC. C components are known to have proinflammatory functions, including chemotaxis, exudation of plasma proteins at sites of inflammation, and opsonization of infectious agents and damaged cells [26]. We believe that the fact that inflammation increases certain C particles, and that disease also causes their consumption, motivates this complex relationship.

Unlike the alternative pathway, in our work we did not find that both the classical and the lectin functional assays were associated with CEC. Of note, the lectin pathway was not related to any of the lipid profile molecules. The usual pattern of C activation in SLE involves the classical pathway. However, a percentage of patients demonstrate a predominant activation of the alternative pathway [27]. In this sense, the alternative cascade does not require antibodies or prior contact with a microbe to function and serves as an independent immune system, capable of recognizing and destroying infecting elements. Our findings are consistent with previous experimental findings in which the alternative C pathway was causally involved in lipid metabolism. For instance, mice that are deficient in C3 showed delayed postprandial triglyceride clearance and increased fasting and postprandial free fatty acids levels [28]. In line with this, mice that lack other components of the alternative pathway, such as factor B or properdin, also showed delayed postprandial lipid clearance and altered systemic lipid levels [29,30]. Our results are also supported by the CODAM study in which independent associations were observed for most alternative pathway C components and HDL subclasses and enrichment in triglyceride [25].

A potential limitation of our study is its cross-sectional design, and that we specifically focused on patients with SLE and, therefore, did not recruit controls. We also acknowledge that most patients had low disease activity. However, given that disease activity did not show a relationship with CEC, it does not seem that SLE activity status had influenced the association between the C system and CEC. However, our study has the strength that it involves a large series of patients, with different disease patterns, and that we have analyzed a complete profile of lipid molecules.

5. Conclusions

Our results reinforce the claim of a link between CEC and C in patients with SLE. Non-canonical C system routes, other than classical pathway activation, might be implied. More studies are needed to better elucidate this complex relationship.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm12165405/s1>, Table S1: Full lipid profile molecules relation to routes and individual elements of the complement system.

Author Contributions: Conception, design, and interpretation of the data: I.F.-A., M.G.-G. and M.Á.G.-G.; acquisition of the data: Y.F.-C., F.G.-B., M.G.-G., J.C.Q.-A., A.F.G.-R., R.L.-M., F.D.-G. and A.F.G.-R. All the authors have agreed to be personally accountable for the author's own contributions and to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and the resolution documented in the literature. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant to I.F.-A. from the Spanish Ministry of Health, Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación, and by Fondo Europeo de Desarrollo Regional—FEDER (Fondo de Investigaciones Sanitarias, PI20/00084).

Institutional Review Board Statement: Research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committees of the Hospital

Universitario de Canarias and the Hospital Universitario Doctor Negrín (both in Spain), and all subjects provided informed written consent (approval number 2015_84).

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

Data Availability Statement: The data sets used and/or analyzed in the present study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. Nevertheless, Iván Ferraz-Amaro would like to acknowledge that he has received grants/research support from Abbott, MSD, Jansen and Roche, as well as consultation fees from company-sponsored speakers' bureaus associated with Abbott, Pfizer, Roche, Sanofi, Celgene, and MSD. M.A. González-Gay has received grants/research supports from AbbVie, MSD, Jansen, and Roche, as well as consultation.

References

1. Rhoads, D.; Tardif, J.C. From HDL-Cholesterol to HDL-Function: Cholesterol Efflux Capacity Determinants. *Curr. Opin. Lipidol.* **2019**, *30*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rohatgi, A.; Khera, A.; Berry, J.D.; Givens, E.G.; Ayers, C.R.; Wedin, K.E.; Neeland, I.J.; Yuhanna, I.S.; Rader, D.R.; de Lemos, J.A.; et al. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Incident Cardiovascular Events. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2383–2393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Schoenfeld, S.R.; Kasturi, S.; Costenbader, K.H. The Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease among Patients with SLE: A Systematic Review. *Semin. Arthritis Rheum.* **2013**, *43*, 77–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Szabó, M.Z.; Szodoray, P.; Kiss, E. Dyslipidemia in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunol. Res.* **2017**, *65*, 543–550. [[CrossRef](#)]
5. Ronda, N.; Favari, E.; Borghi, M.O.; Ingegnoli, F.; Gerosa, M.; Chighizola, C.; Zimetti, F.; Adorni, M.P.; Bernini, F.; Meroni, P.L. Impaired Serum Cholesterol Efflux Capacity in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 609–615. [[CrossRef](#)]
6. Sánchez-Pérez, H.; Quevedo-Abeledo, J.C.; De Armas-Rillo, L.; Rua—Figueroa, Í.; Tejera-Segura, B.; Armas-González, E.; MacHado, J.D.; García-Dopico, J.A.; Jimenez-Sosa, A.; Rodríguez-Lozano, C.; et al. Impaired HDL Cholesterol Efflux Capacity in Systemic Lupus Erythematosus Patients Is Related to Subclinical Carotid Atherosclerosis. *Rheumatology* **2020**, *59*, 2847–2856. [[CrossRef](#)]
7. Leffler, J.; Bengtsson, A.A.; Blom, A.M. The Complement System in Systemic Lupus Erythematosus: An Update. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 1601–1606. [[CrossRef](#)]
8. Hochberg, M.C. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* **1997**, *40*, 1725. [[CrossRef](#)]
9. Gladman, D.D.; Ibañez, D.; Urowltz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. *J. Rheumatol.* **2002**, *29*, 288–291.
10. Gladman, D.; Ginzler, E.; Goldsmith, C.; Fortin, P.; Liang, M.; Urowitz, M.; Bacon, P.; Bombardieri, S.; Hanly, J.; Hay, E.; et al. The Development and Initial Validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* **1996**, *39*, 363–369. [[CrossRef](#)]
11. Mosca, M.; Bombardieri, S. Assessing Remission in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2006**, *24*, S99.
12. Katz, J.D.; Senegal, J.-L.; Rivest, C.; Goulet, J.-R.; Rothfield, N. A Simple Severity of Disease Index for Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* **1993**, *2*, 119–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lee, J.J.; Chi, G.; Fitzgerald, C.; Kazmi, S.H.A.; Kalayci, A.; Korjian, S.; Duffy, D.; Shaunik, A.; Kingwell, B.; Yeh, R.W.; et al. Cholesterol Efflux Capacity and Its Association with Adverse Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 1887. [[CrossRef](#)]
14. Mody, P.; Joshi, P.H.; Khera, A.; Ayers, C.R.; Rohatgi, A. Beyond Coronary Calcification, Family History, and C-Reactive Protein: Cholesterol Efflux Capacity and Cardiovascular Risk Prediction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *67*, 2480–2487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tejera-Segura, B.; Macía-Díaz, M.; Machado, J.D.; de Vera-González, A.; García-Dopico, J.A.; Olmos, J.M.; Hernández, J.L.; Díaz-González, F.; González-Gay, M.A.; Ferraz-Amaro, I. HDL Cholesterol Efflux Capacity in Rheumatoid Arthritis Patients: Contributing Factors and Relationship with Subclinical Atherosclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **2017**, *19*, 113. [[CrossRef](#)]
16. Ferraz-Amaro, I.; Hernández-Hernández, M.V.; Tejera-Segura, B.; Delgado-Frías, E.; Macía-Díaz, M.; Machado, J.D.; Díaz-González, F. Effect of IL-6 Receptor Blockade on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type-9 and Cholesterol Efflux Capacity in Rheumatoid Arthritis Patients. *Horm. Metab. Res.* **2019**, *51*, 200–209. [[CrossRef](#)]
17. Ferraz-Amaro, I.; Hernández-Hernández, M.V.; Armas-González, E.; Sánchez-Pérez, H.; Machado, J.D.; Díaz-González, F. HDL Cholesterol Efflux Capacity Is Related to Disease Activity in Psoriatic Arthritis Patients. *Clin. Rheumatol.* **2020**, *39*, 1871–1880. [[CrossRef](#)]
18. Quevedo-Abeledo, J.C.; Sánchez-Pérez, H.; Tejera-Segura, B.; de Armas-Rillo, L.; Armas-González, E.; Machado, J.D.; González-Gay, M.A.; Díaz-González, F.; Ferraz-Amaro, I. Differences in Capacity of High-Density Lipoprotein Cholesterol Efflux between Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res.* **2021**, *73*, 1590–1596. [[CrossRef](#)]

19. Ferraz-Amaro, I.; Delgado-Frías, E.; Hernández-Hernández, V.; Sánchez-Pérez, H.; de Armas-Rillo, L.; Armas-González, E.; Machado, J.D.; Diaz-González, F. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Lipid Profile in Patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **2021**, *23*, 62. [[CrossRef](#)]
20. Kiss, M.G.; Binder, C.J. The Multifaceted Impact of Complement on Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2022**, *351*, 29–40. [[CrossRef](#)]
21. Martínez-López, D.; Roldan-Montero, R.; García-Marqués, F.; Nuñez, E.; Jorge, I.; Camafeita, E.; Minguez, P.; Rodriguez de Cordoba, S.; López-Melgar, B.; Lara-Pezzi, E.; et al. Complement C5 Protein as a Marker of Subclinical Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *75*, 1926–1941. [[CrossRef](#)]
22. Speidl, W.S.; Exner, M.; Amighi, J.; Kastl, S.P.; Zorn, G.; Maurer, G.; Wagner, O.; Huber, K.; Minar, E.; Wojta, J.; et al. Complement Component C5a Predicts Future Cardiovascular Events in Patients with Advanced Atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **2005**, *26*, 2294–2299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Si, W.; He, P.; Wang, Y.; Fu, Y.; Li, X.; Lin, X.; Chen, F.; Cao, G.; Zhang, H. Complement Complex C5b-9 Levels Are Associated with the Clinical Outcomes of Acute Ischemic Stroke and Carotid Plaque Stability. *Transl. Stroke Res.* **2019**, *10*, 279–286. [[CrossRef](#)]
24. Muscari, A.; Massarelli, G.; Bastagli, L.; Poggiopollini, G.; Tomassetti, V.; Drago, G.; Martignani, C.; Pacilli, P.; Boni, P.; Puddu, P. Relationship of Serum C3 to Fasting Insulin, Risk Factors and Previous Ischaemic Events in Middle-Aged Men. *Eur. Heart J.* **2000**, *21*, 1081–1090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Xin, Y.; Hertle, E.; van der Kallen, C.J.H.; Vogelzangs, N.; Arts, I.C.W.; Schalkwijk, C.G.; Stehouwer, C.D.A.; van Greevenbroek, M.M.J. C3 and Alternative Pathway Components Are Associated with an Adverse Lipoprotein Subclass Profile: The CODAM Study. *J. Clin. Lipidol.* **2021**, *15*, 311–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ward, P.A. The Dark Side of C5a in Sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 133–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dema, B.; Charles, N. Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors. *Antibodies (Basel)* [Internet]. 2016 Jan 4; 5(1). Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31557984/> (accessed on 8 May 2023).
28. Murray, I.; Sniderman, A.D.; Cianflone, K. Mice Lacking Acylation Stimulating Protein (ASP) Have Delayed Postprandial Triglyceride Clearance. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1671–1676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Gauvreau, D.; Roy, C.; Tom, F.Q.; Lu, H.L.; Miegueu, P.; Richard, D.; Song, W.C.; Stover, C.; Cianflone, K. A New Effector of Lipid Metabolism: Complement Factor Properdin. *Mol. Immunol.* **2012**, *51*, 73–81. [[CrossRef](#)]
30. Paglialunga, S.; Fisette, A.; Yan, Y.; Deshaies, Y.; Brouillette, J.F.; Pekna, M.; Cianflone, K. Acylation-Stimulating Protein Deficiency and Altered Adipose Tissue in Alternative Complement Pathway Knockout Mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *294*, 521–529. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

