Anticuerpos anti-β₂ glicoproteína I y niveles plasmáticos de la proteína de unión a C4b

Adamczuk Y, Forastiero R, Martinuzzo M, Carreras LO.

SUMMARY

Autoantibodies directed to β₂ glycoprotein I (aβ₂GPI) are frequently found in patients with antiphospholipid antibodies (aPL). They are more strongly associated with clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome than aPL. It has been shown that β₂GPI and C4b binding protein (C4bBP) share certain homology. In a previous study we have shown that anticardiolipin antibodies were associated with a plasma decrease of C4bBP. The aim of the present study was to evaluate in 131 patients with aPL whether the decrease in C4bBP is related to the presence of aβ₂GPI. Lower C4bBP levels (mean ± SD) in the group of patients having aβ₂GPI (n=57) were observed when compared with the normal group (n=44), (74.3% ± 28.1 vs 94.6% ± 20.9, p<0.005). This difference was more significant considering the IgG isotype. The group of patients with positive aβ₂GPI-IgG (n=41) had lower values of C4bBP (70.1% ± 26.8) than both the normal group (p<0.005) and the group of patients with negative aβ₂GPI-IgG (n=90, 86.0% ± 30.5%, p<0.05). C4bBP deficiency (level <70%) was also more frequent in the group aβ₂GPI-IgG (+) (63.4%) than in the group aβ₂GPI-IgG (-) (34.4%, p<0.005). Moreover, patients with aPL and previous venous thrombosis (n=32) showed lower C4bBP values (75.1% ± 27.9) compared with the normal group (p<0.05). At this time, the mechanisms responsible for the C4bBP decrease are not known. Our findings on the close relationship between abnormalities in the C4bBP/protein S system and the presence of aβ₂GPI could explain the major thrombotic risk in patients having these autoantibodies.

INTRODUCCION

Los anticuerpos antifosfolípidos (aFL) son una familia muy heterogénea de anticuerpos y se detectan por ensayos de coagulación como anticoagulante lúpico (AL) y por ensayos inmunológicos como anticuerpos anticardiolipina (aCL) (12). Sin embargo, en estos últimos años se demostró que los aFL presentan especificidad por ciertas proteínas que unen fosfolípidos y en particular por la β₂ glicoproteína I (β₂GPI) y la protrombina de origen humano (3-8). La asociación de los aFL con trombosis, pérdidas fetales y/o trombocitopenia define al síndrome antifosfolípido (SAF) (7,8). Recientemente se presentaron evidencias de que la presencia de anticuerpos dirigidos específicamente contra la β₂GPI (aβ₂GPI) es un mejor marcador del riesgo de eventos clínicos relacionados al SAF que la presencia de aFL. Esto ha sido demostrado particularmente para la trombosis venosa y las complicaciones obstétricas (9-14).

Durante la última década se han publicado varios estudios que evaluaron el posible efecto patogénico de los aFL sobre las plaquetas, células endoteliales y las proteínas del sistema de coagulación (15,16). Sin embargo, las anomalías detectadas deberían ser reevaluadas teniendo en cuenta el nuevo concepto de la verdadera especificidad de estos anticuerpos. Una de las hipótesis fisiopatológicas más atractivas es la relacionada a la interferencia de los aFL en el sistema antitrombótico de la proteína C. Hay varios estudios que demostraron la inhibición de la inactivación del factor Va por la proteína C activada (APC) cuando están presentes los aFL (17,18). En un estudio que publicamos recientemente encontramos que este efecto estaba relacionado...
preferentemente con los αβ₂GPI (19). Otra de las alteraciones encontradas en estos pacientes fueron las deficiencias adquiridas de la proteína S y también de la proteína de unión a C4b (C4bBP) preferentemente en aquellos con aCL (20). Es conocido que la C4bBP y la β₂GPI pertenecen a la superfamilia de las proteínas que controlan el sistema del complemento, las cuales comparten cierta homología estructural por la presencia de dominios sushi (20). Por lo tanto, se decidió evaluar si había relación entre la presencia de αβ₂GPI y los niveles plasmáticos de C4bBP en pacientes con aCL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 131 pacientes con aCL (78 mujeres y 53 hombres) y la media de edad era de 45 años (rango de 5 a 79 años). La actividad de AL se detectó en 44 (33,6%) pacientes. aCL en 26 (19,8%) y 61 (46,6%) presentaban simultáneamente AL y aCL. Setenta pacientes tenían diagnóstico de SAF y de ellos 14 eran pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Además había 16 pacientes con LES sin SAF y 45 conformaban el grupo de miceléneas (asintomáticas, neoplasias, enfermedades cardíacas, etc.). La historia de trombosis venosa estaba presente en 32 pacientes, la de trombosis arterial en 26 y 21 mujeres habían presentado complicaciones obstétricas (abortos o pérdidas fetales recurrentes). El grupo control estaba constituido por 44 voluntarios sanos con una media de edad de 40 años.

Las muestras de sangre para la determinación de AL fueron obtenidas por punción venosa y recogidas en tubos plásticos conteniendo citrato de sodio 0,11M en una relación de 9 partes de sangre y 1 parte de anticoagulante. El plasma pobre en plaquetas (PPP) fue obtenido por doble centrifugación a 2,500 g durante 10 minutos y ensayado dentro de las dos horas de extraído. Para la preparación de los sueros las muestras fueron recolectadas en tubos de vidrio y luego de una incubación de 4 horas a 37°C se centrifugaron durante 10 minutos. Los sueros fueron alicuotados y almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

Actividad de anticoagulante lúpico

Se evaluó en plasma usando tres ensayos de coagulación para el screening: tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) con los reactivos Actin FSL (Dade International Inc., Miami, FL, USA) y PTT-LA (Diagnostica Stago, Asnieres, France); tiempo del veneno de víbora Russell diluido (dRVVT) usando cefalina de cerebro de conejo y veneno de víbora de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA y tiempo de protrombina con tromboplastina diluida usando tromboplastina tisular recombinante (Innovin, Dade International) diluida 1:500 en solución de Cl₂, Ca 25 mM. Estos ensayos fueron realizados en el PPP del paciente, del normal y en las mezclas 1:1 y 4:1 (paciente: normal). La presencia del AL se confirmó mediante la prueba de neutralización con plaquetas en los ensayos de APTT y DRVVT y además con el ensayo de inhibición de la tromboplastina tisular utilizando la tromboplastina recombinante diluida y sin diluir. Se consideró la presencia del AL cuando al menos una de las pruebas de screening y de confirmación fueron positivas de acuerdo a los criterios que se establecieron previamente (11,22).

ELISA para aCL

Los aCL de ambos isotipos (IgG e IgM) fueron determinados con el ELISA de referencia (2). En el ensayo se utilizó la curva de calibración preparada con los estándares internacionales (Louisville APLDiagnostics, Louisville, KY, USA) y con nuestros sueros controles. Los resultados se expresaron en unidades estándar para IgG (uGPL) o IgM (uMPL). Valores menores de 10 unidades fueron considerados resultados negativos, entre 10 y 20 positivo débil, entre 20 y 80 positivo moderado y mayores de 80 unidades positivo fuerte.

ELISA para αβ₂GPI

El ensayo fue realizado como se describió previamente para ambos isotipos de inmunoglobulinas (9,10). Se utilizaron placas de poliestireno (Nunc-ImmunoPlate Maxisorp, Kamstrup, Roskilde, Denmark) irradiadas con rayos de electrón a una dosis de 100 kGy, β₂GPI humana purificada (Diagnostica Stago) y soluciones basadas en albúmina bovina (Sigma). En cada muestra de suero se determinó además la unión no específica (en pocillos sin antígeno) para obtener la actividad real de unión a la β₂GPI. El punto de corte del ELISA, expresado en densidad óptica (DO), para cada isótopo fue calculado por el método de los percentiles y se estableció en el percentil 99. Ellos fueron 0,055 (IgG) y 0,050 (IgM). Los niveles de los anticuerpos fueron categorizados en grados de positividad de acuerdo al siguiente esquema: positivo débil (DO: 0,055 a 0,150 para el isótopo IgG y 0,050 a 0,150 para el isótopo IgM), positivo moderado (DO: 0,150 a 0,300 para ambos isotipos) y positivo fuerte (DO: >0,300 para ambos isotipos).

Dosaje de C4bBP

Fue realizado por el método inmunológico que utiliza micropartículas de látex cubiertas con anticuerpos anti-C4bBP unidos en forma covalente (Lis test C4bBP, Diagnostica Stago). Los resultados se expresaron en porcentaje respecto a un pool de 20 plasmas normales. Este ensayo inmunológico fue comparado previamente con el método de electroimunodifusión (rocket) de Laurell (20) y se obtuvo una excelente correlación entre ambas técnicas. El rango de referencia normal es de 70 a 140%.
Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en valores medios ± desviación estándar (DE) o valores medios y sus intervalos de confianza de 95%. La distribución de los datos mostró ser normal y por lo tanto se utilizaron métodos paramétricos. Para los análisis grupales se realizó el ANOVA y para las comparaciones posteriores se utilizó el procedimiento de Bonferroni con un ajuste en el nivel de significación. Los datos de proporciones fueron comparados mediante la prueba de chi cuadrado con la corrección de Yate. La significación fue considerada cuando la probabilidad (p) era menor de 0,05.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados de los niveles plasmáticos de C4bBP en los 131 pacientes con aFL agrupados de acuerdo a la presencia de AL y/o aCL. En el análisis grupal, incluyendo el grupo normal, se obtuvo una diferencia significativa (p<0,01) y el análisis posterior de comparación múltiple demostró que la única diferencia significativa era dada por los niveles disminuidos de C4bBP en el grupo de 61 pacientes con la presencia simultánea de aCL y AL respecto del grupo normal. Cuando los niveles de C4bBP (media ±DE) en los pacientes con aCL (n=87; 79,0% ± 31,1) fueron comparados con aquellos sin aCL (n=44; 85,2% ± 28,3) y los controles normales (n=44; 94,6% ± 22,9) se observó una diferencia significativa sólo entre el grupo aCL(+) versus el grupo normal (p<0,02).

Considerando estos datos de los niveles más bajos de C4bBP en los pacientes con aCL se decidió evaluar si existían diferencias dentro de este grupo teniendo en cuenta la presencia de aβ₂GPI. Los valores medios de C4bBP inmunológico se presentan en la Tabla I y el análisis estadístico mostró que los resultados más bajos se observan en los pacientes con reactividad simultánea en los ELISAs de aCL y aβ₂GPI (p<0,001 vs normal).

La figura 1A muestra los intervalos de confianza de 95% para las medias del grupo normal y los grupos de pacientes con aFL que presentaron resultados negativos o positivos en el ensayo de aβ₂GPI (IgG y/o IgM). El ANOVA mostró diferencias significativas (p<0,002) y el análisis posterior de comparación múltiple demostró niveles más bajos en los pacientes aβ₂GPI(+) comparados con el grupo normal (p<0,005). Cuando se consideró el isotipo de inmunoglobulina, no se encontraron diferencias en los niveles de C4bBP al evaluar el isotipo IgM en comparación con los normales (datos no mostrados). Por el contrario, cuando los pacientes se agruparon de acuerdo a la presencia o ausencia de aβ₂GPI de isotipo IgG, el ANOVA mostró una significación mayor (p<0,0001) que la mencionada anteriormente sin discriminación del isotipo de inmunoglobulina. Además se observó que los niveles de C4bBP eran significativamente menores en el grupo aβ₂GPI-IgG(+), y se comparó con el grupo normal (p<0,005) o con el de los pacientes aβ₂GPI-IgG(-) (p<0,05) (Figura 1B).

En la Tabla II se observan las frecuencias de valores de C4bBP por debajo del límite inferior del rango de

Tabla I. Niveles de la proteína de unión a C4b (C4bBP) en los diferentes grupos de pacientes con anticuerpos antifosfolípidos agrupados según el tipo de anticuerpo.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Grupo</th>
<th>C4bBP (%)</th>
<th>p</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Normal</td>
<td>44</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>aCL(-) AL(-)</td>
<td>26</td>
<td>83,3 (32,7)</td>
</tr>
<tr>
<td>aCL(+) AL(+)</td>
<td>61</td>
<td>77,6 (34,7)</td>
</tr>
<tr>
<td>aCL(-) AL(+)</td>
<td>44</td>
<td>85,2 (28,3)</td>
</tr>
<tr>
<td>aCL(+) aβ₂GPI(+)</td>
<td>55</td>
<td>75,6 (28,3)</td>
</tr>
<tr>
<td>aCL(+) aβ₂GPI(-)</td>
<td>32</td>
<td>88,2 (33,9)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Tabla II. Prevalencia de pacientes con niveles de la proteína de unión a C4b (C4bBP) por debajo del límite inferior del rango de referencia.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Grupo</th>
<th>n</th>
<th>n</th>
<th>%</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Normal</td>
<td>44</td>
<td>2</td>
<td>4,5</td>
</tr>
<tr>
<td>aβ₂GPI (+)</td>
<td>57</td>
<td>31</td>
<td>54,46</td>
</tr>
<tr>
<td>aβ₂GPI (-)</td>
<td>74</td>
<td>26</td>
<td>35,4</td>
</tr>
<tr>
<td>aβ₂GPI-IgG (+)</td>
<td>41</td>
<td>31</td>
<td>63,466</td>
</tr>
<tr>
<td>aβ₂GPI-IgG (-)</td>
<td>90</td>
<td>31</td>
<td>34,4</td>
</tr>
</tbody>
</table>

aCL: anticuerpos anticardiolipina (IgG y/o IgM), AL: anticoagulante lúpico,
 aβ₂GPI: anticuerpos anti-β₂ Glicoproteína I (IgG y/o IgM)
Figura 1: Niveles inmunológicos de la proteína de unión C4b (C4bBP) presentados como valores medios y sus correspondientes intervalos de confianza de 95% en el grupo de control normal y en los grupos de pacientes con o sin anticuerpos anti-β, Glicoproteína I (αβ, GPI) de isótopos IgG y/o IgM (A) o en los grupos de pacientes con resultados positivos o negativos en el ELISA de αβ, GPI de isótopo IgG (B).

referencia. Aproximadamente el 50% de los pacientes con αβ, GPI de cualquier isótopo tenían niveles menores de 70% y la prevalencia fue aún mayor si considerar solamente a los pacientes con estos anticuerpos de isótopo IgG (63,4%).

El grado de disminución de los niveles plasmáticos de C4bBP no mostró relación con el título de anticuerpos de isótopo IgG y esto puede ser explicado, en parte, por el hecho de que la mayoría de los pacientes tenían títulos moderados o altos, el 82,9% de aquellos con αβ, GPI y el 80,3% de los pacientes con aCL.

En lo que respecta a las complicaciones clínicas se encontró que los pacientes con historia de trombosis venosa (n=32) presentaban niveles significativamente disminuidos de C4bBP (media ± DE: 75,1% ± 27,9) comparados con el grupo normal (p<0,05). Por el contrario, aquellos que no habían sufrido eventos trombóticos venosos previos (n=99) presentaban niveles de esta proteína (83,0% ± 30,8) similares a los controles normales.

No se halló ninguna asociación entre los niveles antígenos disminuidos de C4bBP y la presencia de otras complicaciones clínicas asociadas al SAF (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

La verdadera especificidad de los αKL ha sido un tema de gran desarrollo en los últimos años y es ahora aceptado que la mayoría de los αKL de pacientes con SAF están principalmente dirigidos contra las proteínas β,GPI y protrombina humana complejadas in vivo a fosfolípidos (23). La β, GPI es el principal antígeno reconocido por los aCL de pacientes con SAF o con enfermedades autoinmunes (24-26). En el dominio V de la molécula está el sitio de unión a fosfolípidos aniónicos (27) y fue recientemente demostrado que este dominio es requerido en la exposición del epitope crítico reconocido por los aCL (28). Sin embargo, este último estudio demostró que el epitope no está en el dominio V sino probablemente en el dominio IV de la molécula.

La β, GPI está compuesta de cinco dominios con un patrón conservado de residuos cisteína, prolina y triptófano. Estos dominios sushī, denominados “short consensus repeats” (SCR), son características de la superfamilia de las proteínas que controlan el sistema del complemento (21). Dentro de esta familia se encuentra la C4bBP que existe en plasma en tres isoformas con diferente composición de subunidades (29). La principal isoforma es aquella formada por siete unidades α y una unidad β (αβ), aunque pueden existir otras isoformas (α β y α β). Cada unidad α contiene 8 SCR y posee el sitio de unión a C4b. La subunidad β presenta 3 SCR y el sitio de unión a proteína S. Por lo tanto, la C4bBP es un importante regulador no sólo del sistema del complemento sino que también participa en el sistema antitrombótico de la proteína C al inhibir la actividad cofactor de la proteína S libre como consecuencia de la unión de la misma a su cadena β (30). Datos recientes indican que la proteína S tiene además propiedades anticoagulantes en una forma independiente de la APC. Entre ellas se encuentran la inhibición de la activación de factor X y de protrombina, y se demostró que estas funciones son llevadas a cabo de manera eficientemente por el complejo proteína S-C4bBP que por la proteína S libre (31). Todos estos estudios sugieren que la C4bBP podría tener algún rol en los mecanismos fisiopatogénicos que conducen a los eventos trombóticos.
Una de las complicaciones clínicas más frecuentemente observadas en el SAF es la trombosis y la recurrencia de las mismas está relacionada con la presencia de títulos altos de aCL de isótipo IgG. Considerando que estos autoanticuerpos son generalmente aβ,GPI y en base a nuestra observación previa de la asociación de la presencia de aCL con niveles disminuidos de C4bBP, decidimos evaluar la relación entre estos autoanticuerpos y la concentración antigenica de C4bBP. Los datos indicaron que la disminución más importante de esta proteína se observaba en pacientes con aβ,GPI de isótipo IgG. Además, los pacientes con historia de trombosis venosa presentaron niveles disminuidos de la C4bBP en comparación con el grupo normal. Esto podría estar relacionado con la mayor frecuencia de aβ,GPI-IgG en los individuos con trombosis venosa y aFL. En un estudio reciente se encontró una marcada reducción en la C4bBP en 200 mujeres con preclampsia, pero en ese estudio no se evaluó la presencia de aFL.

Varias hipótesis podrían ser sugeridas para explicar la relación entre los niveles reducidos de C4bBP y la presencia de aβ,GPI. Recientemente se presentaron datos de una interrelación entre los sistemas de coagulación y el complemento donde la β,GPI sería la proteína de conexión al interferir en el complejo C4bBP-proteína S. Los aβ,GPI podrían estimular la unión de la β,GPI a la C4bBP o a la proteína S e inducir un aumento en la degradación de estas proteínas. Esta teoría explicaría la reducción de C4bBP y de la proteína S (datos no publicados) en pacientes aCL/aβ,GPI, pero no coincidiría con la observación previa de niveles normales de β,GPI en pacientes con anticuerpos contra esta proteína. La existencia de anticuerpos específicos contra el complejo C4bBP/proteína S, diferentes de los aβ,GPI, en los pacientes con SAF no pudo ser demostrada en nuestro laboratorio (datos no publicados). El epítopo de laβ,GPI reconocido por los aβ,GPI no ha sido identificado claramente y considerando la homología estructural entre laβ,GPI y la C4bBP podría ser factible que estos anticuerpos presenten reacción cruzada con ambas proteínas y sólo se favorezca el aumento del clearance de la C4bBP por tener un peso molecular diez veces mayor que el de la β,GPI. Otra hipótesis diferente involucraría un fenómeno de regulación a nivel de la síntesis de la C4bBP. Se ha demostrado que en pacientes con SAF existen modificaciones en los niveles de citoquinas y se encontraron concentraciones muy elevadas del factor de necrosis tumoral (TNF). En el estudio de Criado García y col. se evaluó la modulación de la expresión de los genes que codifican para las subunidades α y β de la C4bBP por diferentes citoquinas y se encontró que el TNF solo o en combinación con interleukinas inhibía la expresión de ambas subunidades de la C4bBP en ensayos in vitro. Esto podría conducir a una disminución de la concentración antigenica de la proteína en los pacientes con SAF.

En conclusión, nuestros datos sobre los niveles disminuidos de C4bBP en pacientes con aβ,GPI refuerzan el concepto de la relación fisiológica existente entre ambas proteínas. Teniendo en cuenta los nuevos aspectos funcionales de la C4bBP es posible especular sobre la existencia de algún rol de la misma en la fisiopatología del SAF.

**RESUMEN**

Los anticuerpos dirigidos contra la β,glicoproteína I (aβ,GPI) son reconocidos como uno de los más frecuentes autoanticuerpos presentes en pacientes con anticuerpos antifosfolípidos (aFL). Los aβ,GPI son considerados un mejor marcador de las complicaciones clínicas del síndrome antifosfolípidico que la presencia de aFL. Dado que la β,GPI y la proteína de unión a C4b (C4bBP) presentan cierta homología estructural y en base a la disminución de C4bBP asociada a la presencia de anticuerpos anticardiolipina encontrada en un estudio previo, se evaluó a 131 pacientes con aFL si la disminución de C4bBP estaba asociada a los aβ,GPI. Los niveles antígenicos (media ± DE) de C4bBP fueron menores en el grupo de pacientes con aβ,GPI (n=57) comparados con el grupo normal (n=44) (74,3% ± 28,1 vs. 94,6% ± 20,9, p<0,005). Las diferencias fueron aún más significativas al considerar al isótipo IgG: el grupo aβ,GPI-IgG(+) (n=41) tuvo valores más reducidos de C4bBP (70,1% ± 26,8) que el grupo normal (p<0,005) y el grupo aβ,GPI-IgG(-) (n=90; 86,0% ± 30,5, p<0,05). La falta de C4bBP (niveles < 70%) fue más frecuente en el grupo aβ,GPI-IgG(+) (63,4%) que en el aβ,GPI-IgG(-) (34,4%; p<0,005). Se encontró además que los pacientes con aFL y historia de trombosis venosa (n=32) presentaban niveles de C4bBP menores (75,1% ± 27,9) comparados con el grupo normal (p<0,05). El mecanismo de disminución de C4bBP no ha sido aún aclarado. El hallazgo de la alteración del sistema C4bβI/proteína S, principalmente en pacientes con aβ,GPI podría explicar, al menos en parte, el mayor riesgo trombótico de aquellos pacientes con estos autoanticuerpos.

**BIBLIOGRAFÍA**

3. Bevere EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA.: Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not


34. Merrill JT, Lahita RG. The antiphospholipid syndrome and SLE: is there a clue in the link between complement and coagulation?. Lupus 1996; 5:6-10.