

Vesículas extracelulares endoteliales inducidas por anticuerpos antifosfolípidos: vías implicadas en su producción y potencial procoagulante

Daniel Álvarez. Enf.¹, Carolina Rúa. Microb. MSc.²,
Ángela P. Cadavid. MD. MSc. Dr.Sci³

PRESENTACIÓN

La hemostasia es el equilibrio fisiológico de un conjunto de procesos procoagulantes que tienen como finalidad evitar la pérdida de sangre ante la disrupción del circuito vascular, al cual se acoplan procesos anticoagulantes que simultáneamente previenen la formación o estabilización inusitada de coágulos que impidan el flujo sanguíneo normal. Existen diferentes trastornos que se asocian a la ruptura del equilibrio hemostático, entre ellos destaca el síndrome antifosfolípido (SAF), enfermedad autoinmune que clásicamente se ha relacionado con un estado procoagulante, solo o en conjunto con episodios de morbilidad gestacional. Diferentes autores han realizado esfuerzos para entender la relación entre inmunidad y coagulación, logrando explicar tentativamente por múltiples mecanismos como los anticuerpos antifosfolípidos (aAFL), causa directa del SAF, conducen al desarrollo de trombosis vascular. Dentro de estos mecanismos la activación directa del endotelio, y asociado a ello, la liberación de vesículas extracelulares (VE), ha sido un foco de interés reciente.

Palabras clave: *Síndrome antifosfolípido, vesículas extracelulares, coagulación sanguínea, células endoteliales, transducción de señal.*

Key Words: *Antiphospholipid syndrome, extracellular vesicles, blood coagulation, endothelial cells, signal transduction*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SAF es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la presencia persistente de aAFL, acompañado

por la ocurrencia de al menos una manifestación clínica clásica, es decir, trombosis vascular o morbilidad gestacional. Aunque resulta claro que los aAFL constituyen el factor causal de ambos tipos de manifestaciones clínicas clásicas, algunos autores han planteado que las presentaciones vascular y obstétrica de la enfermedad podrían obedecer a mecanismos patogénicos independientes, observación basada en el efecto diferencial de algunos autoanticuerpos *in vitro*. Uno de los mecanismos que podría ayudar a entender la diferencia entre las manifestaciones clínicas del SAF, es la capacidad de algunos aAFL para inducir en el endotelio la liberación de micropartículas. Las micropartículas son fragmentos de bicapa lipídica a través de las cuales las células intercambian diferentes moléculas. A pesar de su valor fisiológico como mensajeros, estas vesículas constituyen un mecanismo procoagulante directo en la medida que aumentan la superficie total de fosfolípidos aniónicos, y cargan en su membrana la glicoproteína factor tisular. Por este motivo, tentativas diferencias en la producción y el potencial procoagulante de las micropartículas liberadas a causa del estímulo por aAFL (variables estrechamente relacionadas con las vías de señalización implicadas en su producción), podrían explicar la divergencia entre los diferentes cuadros clínicos del SAF.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de las proteínas p38MAPK y MEK1/2, en la producción y en el carácter procoagulante de vesículas extracelulares endoteliales, inducidas por anticuerpos antifosfolípidos de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas del SAF.

METODOLOGÍA

Se plantea un modelo *in vitro* de SAF basado en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), estimuladas con las IgG de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas del SAF. En algunos casos se realizará pretratamiento de las células con los inhibidores SB203580 (para p38MAPK) y U0126 (para MEK1/2). Las VE producidas bajo cada una de las condiciones serán recolectadas del sobrenadante, aisladas por centrifugación, y finalmente, cuantificadas y caracterizadas por medio de citometría de flujo, en tamaño y expresión de CD31 y fosfatidil serina. El potencial procoagulante de estas vesículas será determinado mediante un ensayo de plasma humano normal

¹ Estudiante de maestría en ciencias básicas biomédicas. Grupo Reproducción, Universidad de Antioquia.

² Grupo de Investigación en Trombosis, Universidad de Antioquia, cotutora.

³ Coordinadora Grupo Reproducción y docente Universidad de Antioquia, tutora.

Correo electrónico de contacto: Daniel Álvarez; daniel.alvarezj1@udea.edu.co

Proyecto financiado por Colciencias. Código: 111580762949

recalcificado. El tiempo de retraso, el potencial de coagulación global, y el ratio máximo de coagulación serán calculados y comparados entre poblaciones de vesículas. Para confirmar el efecto de los inhibidores sobre los fenómenos estudiados, la fosforilación de p38MAPK será determinada por medio de citometría fosfo-específica. Finalmente, se determinará el efecto de las moléculas de aspirina, heparina e hidroxiclo-roquina (fármacos usados en el manejo del SAF), en los fenómenos de estudio.

RESULTADOS PRELIMINARES

Durante las etapas iniciales de este proyecto se ha demostrado el funcionamiento de los protocolos estandarizados para el aislamiento y lectura de VE por citometría de flujo, y la medida del potencial global de coagulación en plasma recalcificado. Posteriormente, mediante el uso de la IgG purificada de una paciente con SAF, cuyo efecto ha sido demostrado en otros sistemas, se logró determinar que los aAFL tienen un efecto positivo sobre el potencial procoagulante de la fracción del sobrenadante correspondiente a las VE. Este efecto es notorio desde una hora de estímulo. Al realizar la sustracción del potencial global de coagulación atribuible a la acumulación basal de VE en el sobrenadante, y comparar el efecto de los aAFL con el producido por la IgG de suero humano normal, se observa que, con el paso de las horas, la resolución del efecto procoagulante de los aAFL decae. Esto nos permite concluir que los aAFL a una concentración de 250 µg/mL, y en un tiempo no mayor a 2 horas, inducen en las células endoteliales un incremento en la producción de VE, un incremento en el potencial procoagulante de las VE, o ambos fenómenos simultáneamente. Horas después, debido a la producción basal de VE, y probablemente a la recaptación y aclaramiento de las vesículas en el sobrenadante, el efecto de los aAFL se vuelve difuso.

BIBLIOGRAFÍA

- Lippi G, Adcock D, Favaloro EJ. Understanding the "philosophy" of laboratory hemostasis. *Diagnosis*. 2019;6(3):223-226. doi:10.1515/dx-2018-0099.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, 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. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x.
- Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β2GPI and apoER2. *J Clin Invest*. 2011;121(1):120-131. doi:10.1172/JCI39828.
- Lambrianides A, Carroll CJ, Pierangeli SS, et al. Effects of Polyclonal IgG Derived from Patients with Different Clinical Types of the Antiphospholipid Syndrome on Monocyte Signaling Pathways. *J Immunol*. 2010;184(12):6622-6628. doi:10.4049/jimmunol.0902765.
- Prinz N, Clemens N, Canisius A, Lackner KJ. Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and endothelial cells: Lessons from the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2013;109(3):525-531. doi:10.1160/TH12-06-0421.
- Zhang W, Gao F, Lu D, et al. Anti-β2 glycoprotein I antibodies in complex with β2 glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: apolipoprotein E receptor 2' and glycoprotein I βα. *Front Med*. 2016;10(1):76-84. doi:10.1007/s11684-015-0426-7.
- Bu C, Gao L, Xie W, et al. β2-glycoprotein I is a cofactor for tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation. *Arthritis Rheum*. 2009;60(2):559-568. doi:10.1002/art.24262.
- Rand JH, Wu XX, Quinn AS, et al. Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: Evidence from atomic force microscopy and functional assay. *Am J Pathol*. 2003;163(3):1193-1200. doi:10.1016/S0002-9440(10)63479-7.
- De Laat B, Eckmann CM, Van Schagen M, Meijer AB, Mertens K, Van Mourik JA. Correlation between the potency of a beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant and the level of resistance to activated protein C. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19(8):757-764. doi:10.1097/MBC.0b013e32830f1b85.
- Pericleous C, Clarke LA, Brogan PA, et al. Endothelial microparticle release is stimulated in vitro by purified IgG from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2013;109(1):72-78. doi:10.1160/TH12-05-0346.
- Vikerfors A, Mobarrez F, Bremme K, et al. Studies of microparticles in patients with the antiphospholipid syndrome (APS). In: *Lupus*. Vol 21. ; 2012:802-805. doi:10.1177/0961203312437809.

12. Chaturvedi S, Cockrell E, Espinola R, et al. Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: Characterization and associations. *Thromb Res.* 2015;135(1):102-108. doi:10.1016/j.thromres.2014.11.011.
13. Girardi G, Berman J, Redecha P et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1644-1654. doi:10.1172/JCI18817.
14. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, et al. Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005;106(7):2340-2346. doi:10.1182/blood-2005-03-1319.
15. Poulton K, Ripoll VM, Pericleous C, et al. Purified IgG from patients with obstetric but not IgG from non-obstetric antiphospholipid syndrome inhibit trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(5):390-401. doi:10.1111/aji.12341.
16. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596.
17. Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res.* 1982;10(5):253-257. doi:10.1007/BF00255932.
18. Thomas GM, Brill A, Mezouar S, et al. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2015;13(7):1310-1319. doi:10.1111/jth.13002.
19. Su Y, Deng X, Ma R, Dong Z, Wang F, Shi J. The Exposure of Phosphatidylserine Influences Procoagulant Activity in Retinal Vein Occlusion by Microparticles, Blood Cells, and Endothelium. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:3658476. doi:10.1155/2018/3658476.
20. Ettelaie C, ElKeab AM, Maraveyas A, Collier MEW. P38 α phosphorylates serine 258 within the cytoplasmic domain of tissue factor and prevents its incorporation into cell-derived microparticles. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(3):613-621. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.11.010.
21. Betapudi V, Lominadze G, Hsi L, Willard B, Wu M, McCrae KR. Anti- β 2GPI antibodies stimulate endothelial cell microparticle release via a nonmuscle myosin II motor protein-dependent pathway. *Blood.* 2013;122(23):3808-3817. doi:10.1182/blood-2013-03-490318.
22. Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost.* 2009;7(4):701-709. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03304.x.
23. Collier MEW, Ettelaie C. Regulation of the incorporation of tissue factor into microparticles by serine phosphorylation of the cytoplasmic domain of tissue factor. *J Biol Chem.* 2011;286(14):11977-11984. doi:10.1074/jbc.M110.195214.