

Autoanticuerpos eritrocitarios contra CD47

Soler-Noda G, Romero-Díaz Y, Aquino-Rojas S, Bencomo-Hernández A, Adams-Villalón Y
Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.
Email: gsolern@infomed.sld.cu

1

RESUMEN

La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) se define por la destrucción acelerada de los eritrocitos producida por autoanticuerpos dirigidos contra estas células. En sistemas experimentales utilizando ratones deficientes de CD47, se ha observado que estos eritrocitos son más susceptibles a la destrucción inmune de los mismos mediados por autoanticuerpos. El objetivo del trabajo fue detectar la presencia de autoanticuerpos eritrocitarios contra CD47 y su relación con el proceso hemolítico. Se empleó la técnica de MAIEA para la detección de autoanticuerpos contra CD47 en 141 pacientes con AHAI, de ellos el 63,12 % del sexo femenino (n=89) y 36,87 % (n=52) masculino; el 77,3 % (n=109) con prueba de antiglobulina directa positiva y el 22,69 % (n=32), negativa. La AHAI se presentó en el 58,86% como idiopática y el 41,13 % como secundaria. El 9,92 % de los casos (n=14) presentaron autoanticuerpos contra CD47; con predominio en pacientes con AHAI secundaria a otras patologías (64,28 %). La IgG se detectó en el 71,42 %, mientras que IgA e IgM en el 7,14 y 21,42 %, respectivamente. No se encontró significación estadística entre la presencia de autoanticuerpos contra CD47 y la intensidad del proceso hemolítico ($p>0.05$). Estos datos sugieren que la señalización a través de CD47 en el humano puede ser cualitativamente diferente a la observada en ratones y que la interacción CD47-SIRP- α no es la responsable del aclaramiento de las células rojas.

Palabras clave: Anemia hemolítica autoinmune; AHAI; CD47; CD47/SIRP α ; MAIEA; Especificidad.

INTRODUCCIÓN

La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) se define por la destrucción acelerada de los eritrocitos producida por autoanticuerpos dirigidos contra antígenos que grupo sanguíneos eritrocitarios. Recientemente se han diseñado diferentes estudios en animales y humanos para explicar la pérdida de tolerancia hacia los antígenos eritrocitarios y los mecanismos de destrucción acelerada de los mismos.

CD47 actúa como marcador de lo propio sobre eritrocitos murinos porque cuando se transfunden eritrocitos CD47 nulo en ratones normales, estos eritrocitos son rápidamente aclarados de la circulación por los macrófagos esplénicos, mientras que eritrocitos con expresión normal de CD47 no son destruidos por su interacción con SIRP α sobre los macrófagos. Por consiguiente, eritrocitos de ratones diabéticos no obesos deficientes de CD47 son más sensibles a la hemólisis inducida por anticuerpos monoclonales anti-eritrocitos y resultados similares han sido observados con el empleo de plaquetas.

En estos momentos no existe reporte en la literatura que hagan una relación entre la presencia de autoanticuerpos eritrocitarios contra CD47 en pacientes con AHAI.

OBJETIVO

Detectar la presencia de autoanticuerpos eritrocitarios contra CD47 en pacientes con AHAI y su relación con la intensidad del proceso hemolítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de las muestras: Se estudiaron 141 pacientes con anemia hemolítica autoinmune caliente (AHAIC) de la colección de casos del Departamento de Inmunohematología del Instituto de Hematología e Inmunología en el período comprendido entre los años 2000 al 2012, de los cuales 109 con prueba de antiglobulina directa positiva (PAD+) y 32 negativa (PAD-); 89 del sexo femenino y 52 del sexo masculino. 82 se presentaron como idiopáticos y 59 como secundarios. El rango de edad de los pacientes fue de 1-84 años con una media de 39,85 y una mediana de 45 años.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa y se colectaron en tubos que contenían EDTA al 5%. Los eluatos se obtuvieron por el método del éter.

Detección de la especificidad anti CD47

La detección de la especificidad se determinó por la técnica de inmovilización de antígenos eritrocitarios con anticuerpos monoclonales (MAIEA, por sus siglas en inglés), con el empleo de placas de 96 pocillos (Nunc, Immunoplates) que se recubrieron de la fracción IgG de anticuerpos de carnero anti-inmunoglobulinas (Igs) de ratón (Serotec).

Los complejos trimoleculares se obtuvieron luego de la sensibilización de una suspensión de eritrocitos de grupo O obtenida de una mezcla de 10 donantes de sangre sanos con el eluato de hematíes procedentes de pacientes con AHAI, y del Ac monoclonal murino anti-CD47 (clono BRIC 126, Serotec, UK) en la dilución óptima.

Se utilizaron conjugados de la fracción IgG de carnero anti-Fc de la IgG, IgM e IgA humana (Serotec) marcados con peroxidasa en diluciones óptimas.

Interpretación de los resultados

La técnica de MAIEA requiere de la unión de dos Ac obtenidos en diferentes especies contra el mismo antígeno de la membrana, pero dirigidos contra epítomos diferentes. Generalmente la combinación de Ac utilizados es un Ac monoclonal murino y el Ac policlonal humano en la muestra que se desea caracterizar; en nuestro caso, el anticuerpo policlonal humano está constituido por el auto-Ac presente en el eluato de los eritrocitos de pacientes con AHAI. Si el auto-Ac humano presenta especificidad contra un epítomo del mismo antígeno reconocido por el Ac monoclonal murino, se forma el complejo trimolecular Ac monoclonal-antígeno-auto-Ac humano. Este complejo es liberado de la membrana por lisis y solubilización con detergentes aniónicos a concentración apropiada 5. El complejo es capturado en la placa por la IgG de carnero anti-ratón vía el Ac monoclonal y se detecta por la adición del conjugado de carnero anti-inmunoglobulinas humanas peroxidasa, el cual se une al complejo vía el auto-Ac humano. Se consideró un resultado positivo un valor de densidad óptica superior o igual a 2,5 en la relación

de la DO del lisado de la muestra entre la DO del lisado del control normal; según lo comunicado por otros autores.

Se relacionó la especificidad e isotipo del Auto-Ac contra CD47 con la condición de AHAIC PAD+ y AHAIC PAD-; idiopático y secundario, el grado de hemólisis y la presencia de más de un isotipo de inmunoglobulinas.

La intensidad de la hemólisis se clasificó según la concentración de hemoglobina (Hb) determinada por el método de la cianometahemoglobina; el conteo de reticulocitos realizado por el método del azul brillante de cresilo y las cifras de haptoglobina plasmática determinadas por método turbidimétrico (CPM Científica S.a.s). Se consideró en el grupo con hemólisis de alto grado a aquellos casos que presentaron cifras de Hb menores de 90 g/L, conteo de reticulocitos superiores al 5 % y valores de haptoglobina menores de 0.4 g/L, y en el grupo con hemólisis de bajo grado a aquellos casos que presentaron cifras de Hb entre 90 y 105 g/L, conteo de reticulocitos entre el 3 y el 5 % y valores normales de haptoglobina plasmática.

En todas las comparaciones se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) y se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

De las 141 muestras analizadas, el 9,92 % (n=14) presentaron autoanticuerpos contra CD47. Las densidades óptimas (DO) de las muestra positivas con autoanticuerpos IgG anti-CD47 mostraron un media (M) de 1,7419 con un discriminante (K) de 6,648, los IgA 0,697 y 3,73; y los IgM 0,685 y 4,01.

El 71,42 % de los casos (n=10) se presentaron con PAD+ y 4 (28,57 %) con PAD-; mientras que en el 42,85 % se detectó en los casos idiopáticos y el 57,15 % en los secundarios. No se encontró significación estadística para la presencia de anticuerpos anti-CD47 y las condiciones de idiopático, secundario, PAD+ y PAD- ($p > 0.05$).

La presencia de autoanticuerpos contra CD47 en pacientes con hemólisis del alto grado se presentó en el 42,86 % (n=6) y de bajo grado en 8 pacientes; pero este resultado no tuvo significación con la intensidad del proceso hemolítico ($p>0.05$).

La IgG predominó al detectarse en el 71,42 %, mientras que IgA e IgM se presentaron en el 7,14 y 21,42 %, respectivamente. Sin embargo, este predominio de la IgG no es significativo con la condición de PAD+ y PAD- ($p>0.05$). No se detectaron inmunoglobulinas concomitando con la misma especificidad anti-CD47.

En la hemólisis de bajo grado la IgG predominó en el 57,14 % con respecto a otras inmunoglobulinas; en la hemólisis de alto grado la IgM tuvo mayor presencia.

CONCLUSIONES

1. Los autoanticuerpos eritrocitarios reconocen a la molécula CD47 en pacientes con AHAIC.
2. La intensidad de la hemólisis no está relacionada con la presencia de autoanticuerpos anti-CD47.
3. El isotipo de autoanticuerpo predominante con especificidad anti-CD47 fue la IgG.
4. En la hemólisis de alto grado la IgM con especificidad anti-CD47 predominó con respecto a la IgG e IgA.
5. Es la primera vez que se analiza la relación entre la presencia de autoanticuerpos anti-CD47 con la destrucción inmune de los eritrocitos en pacientes con AHAIC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barcellini W. New Insights in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus Med Hemother* 2015; 42:287–93. DOI: 10.1159/000439002
2. Van Bruggen R. CD47 functions as a removal marker on aged erythrocytes. *ISBT Science Series* 2013; 8: 153–6.
3. Nilsson A, Vesterlund L, and Oldenborg PA. Macrophage expression of LRP1, a receptor for apoptotic cells and unopsonized erythrocytes, can be regulated by glucocorticoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 417 (4): 1304-9.

4. Oldenborg PA. CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematology* 2013, Article ID 614619, 19 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/614619>
5. Burger P, Hilarius-Stokman P, De KD. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* 2012; 119 :5512-21.

