

Instituto de Hematología e Inmunología

## ALTERACIONES DEL SISTEMA COMPLEMENTO EN PACIENTES CON ANEMIA DREPANOCÍTICA EN ESTADO BASAL

Lic. Rinaldo Villaescusa Blanco,<sup>1</sup> Lic. Ada A. Arce Hernández,<sup>1</sup> Dr. Orlando Serrano Barrera,<sup>2</sup> Lic. Julio C. Merlín Linares,<sup>1</sup> Lic. Ana M. Guerreiro Hernández,<sup>1</sup> Lic. Luz M. Morera Barrios<sup>1</sup> y Dr. Edgardo Espinosa Martínez<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se determinó la actividad de las vías clásica y alternativa del complemento, así como la cuantificación de algunos de sus componentes en 46 pacientes con anemia drepanocítica (AD) (hemoglobina SS), 21 sin complicaciones clínicas y 25 con estas; entre las más frecuentes encontramos: número de infecciones, úlceras maleolares, crisis vasooclusivas, hepáticas y aplásticas, considerando como límite un año anterior a la toma de muestra de sangre. Se demostró una disminución significativa de la actividad de la vía alternativa, factor B y del componente C3 en el grupo de pacientes con complicaciones clínicas. Se observó una correlación significativa entre el número de crisis vasooclusivas e infecciones y la actividad de la vía alternativa, el factor B y el C3. Estos resultados sugieren que los fenómenos inflamatorios que pueden persistir en pacientes con AD en estado basal, fundamentalmente aquellos con historia anterior de complicaciones clínicas, pueden provocar alteraciones en la actividad del complemento.

*DeCS:* ANEMIA/complicaciones; VIA ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO; FACTOR B DE COMPLEMENTO/deficiencia.

Los pacientes con anemia drepanocítica (AD) (hemoglobina SS) cursan con anemia hemolítica crónica, episodios dolorosos agudos llamados crisis vasooclusivas y una elevada susceptibilidad a infecciones.<sup>1</sup>

En la AD se han descrito numerosas alteraciones del sistema inmune innato y adquirido, entre las que se destacan: alteraciones en la activación de los

linfocitos T, la pérdida de las funciones del bazo, los trastornos de la migración y opsonización, así como una disminución de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento.<sup>2,3</sup> En pacientes con AD en estado basal se han observado incrementos moderados de reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva, amiloide sérico A, orosomucoide y el leucotrieno C4, lo que evidencia un estado

<sup>1</sup> Instituto de Hematología e Inmunología.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biomodelos Experimentales.

persistente de inflamación, debido a los continuos episodios de oclusión que ocurren en estos pacientes. Esto conduce a la liberación de citocinas inflamatorias y otros mediadores que pueden provocar una disregulación del sistema inmune; es por ello que diversos investigadores han relacionado las infecciones en la AD con el desencadenamiento de fenómenos inflamatorios.<sup>4,8</sup>

En diversas investigaciones se ha demostrado en pacientes con AD en estado basal, una disminución significativa de la actividad de la vía alternativa del complemento, debido a trastornos de la actividad funcional del factor B.<sup>9,10</sup> Teniendo en cuenta que no en todos los pacientes en estado basal se detectan alteraciones de la mencionada vía, nos propusimos profundizar en el estudio del sistema complemento en un grupo de pacientes con AD en estado basal, clasificados de acuerdo con la evolución clínica de la enfermedad.

## MÉTODOS

Se estudiaron 46 pacientes, 30 mujeres y 16 hombres, con un promedio de edad de 30 años y un rango de 18 a 58 años, con el diagnóstico de AD (hemoglobina SS) en estado basal, sin síntomas ni signos clínicos de infecciones, úlceras o crisis, así como sin requerimientos transfusionales en los últimos 3 meses. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes y se analizó la evolución de la enfermedad en el año previo al estudio para establecer la existencia o no de complicaciones clínicas en algún momento de ese período, lo que permitió su clasificación en 2 grupos: uno sin manifestaciones clínicas y un segundo grupo en el que habían ocurrido una o varias complicaciones clínicas como infecciones, úlceras maleolares, crisis vasooclusivas, crisis hepáticas o crisis aplásticas.

Los valores de referencia de las pruebas que se efectuaron se obtuvieron a partir de 30 sujetos sanos con características similares en cuanto a edad y sexo a la de los enfermos estudiados. El suero obtenido se conservó a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los sueros controles se obtuvieron y se conservaron en las mismas condiciones.

La actividad hemolítica de la vía clásica del sistema complemento (AHVC) se determinó por el método descrito por *Mayer*,<sup>11</sup> la actividad hemolítica de la vía alternativa (AHVA) según *Platts-Mills* y otros,<sup>12</sup> y la actividad hemolítica del factor B (AHFB) de la vía alternativa por la técnica de *Aguado* y otros.<sup>13</sup> Los niveles de C3 y C4 se cuantificaron por inmunodifusión radial simple.<sup>14</sup>

Se calcularon la media y la desviación estandar de los controles normales y de los pacientes con y sin complicaciones clínicas. Para la comparación entre los 2 grupos y de cada uno con los controles normales, se utilizó la *t* de Student para muestras independientes. Se determinaron las correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y el número de las diferentes complicaciones clínicas. Se consideró un nivel de confianza del 95 %. Para todo el procesamiento se empleó el paquete estadístico MICROSTA.

## RESULTADOS

Se observó una disminución significativa de la AHVA, AHFB y C3 en los pacientes con antecedentes de complicaciones clínicas en el último año previo al estudio, al compararlos con el grupo sin complicaciones y controles normales (tabla 1).

Se demostró una asociación significativa entre la AHVA, AHFB y C3 con las crisis vasooclusivas e infecciones. El resto de las correlaciones no mostraron significación (tabla 2).

TABLA 1. Comparación de los niveles de complemento entre los grupos de pacientes con anemia drepanocítica y con los controles normales

	Anemia drepanocítica		Controles normales (n = 30)
	Con complicaciones (n = 25)	Sin complicaciones (n = 21)	
AHVC (CH50)	25,8 ± 3,0	26,4 ± 2,8	27,0 ± 2,7
AHVA (%)	78,1 ± 10,2**	97,1 ± 14,8	98,0 ± 16,0
AHFB (%)	75,0 ± 11,3**	98,6 ± 17,4	100,0 ± 24,0
C3 (g/L)	0,90 ± 0,37**	1,53 ± 0,44	1,52 ± 0,50
C4 (g/L)	0,32 ± 0,10	0,33 ± 0,11	0,35 ± 0,15

\*\* Diferencia significativa con respecto a los controles normales y al grupo de pacientes sin complicaciones, para una  $p < 0,001$ .

AHVC: actividad hemolítica de la vía clásica; AHVA: actividad hemolítica de la vía alternativa; AHFB: actividad hemolítica del factor B; n: número de pacientes.

TABLA 2. Correlaciones entre los niveles de complemento y las variables clínicas en los pacientes con anemia drepanocítica

	AHVC (r)	AHVA (r)	AHFB (r)	C3 (r)	C4 (r)
Crisis vasooclusivas	,0572	,5992**	,6646**	,5461**	,1234
Infecciones	,0273	,6124**	,6534**	,5632**	,0516
Úlceras maleolares	,0226	,1988	,1047	,0991	,0465
Otras crisis	,0854	,0291	,0264	,0675	,0904

\*\* Diferencia significativa,  $p < 0,001$ .

(r): coeficiente de correlación lineal; AHVC: actividad hemolítica de la vía clásica; AHVA: actividad hemolítica de la vía alternativa; AHFB: actividad hemolítica del factor B.

## DISCUSIÓN

El aumento de la susceptibilidad a infecciones en la AD tiene un origen multifactorial.<sup>15-17</sup> En pacientes con AD en estado basal se ha demostrado una disminución significativa de la AHVA y de algunos de sus componentes, aunque se debe señalar que no en todos los pacientes se detectan alteraciones del complemento.<sup>9,10</sup> En nuestro trabajo, los enfermos sin complicaciones en el año anterior al estudio, mantuvieron todos los parámetros medidos dentro de límites normales. En el grupo de pacientes con complicaciones clínicas previas se demostró una disminución de la AHVA, AHFB y los niveles de C3, al compararlos con el grupo sin complicaciones y controles normales; se obtuvo

además una asociación significativa entre la frecuencia de crisis vasooclusivas e infecciones con la AHVA, AHFB y la concentración de C3.

En los pacientes con AD en estado basal pueden ocurrir repetidamente procesos inflamatorios subclínicos, debido a fenómenos isquémicos microvasculares que se producen por la adhesión al endotelio de reticulocitos anormales. Se han planteado diversos mecanismos de adhesión, entre los que se encuentran la adhesión de reticulocitos VLA-4 + con su contra receptor ICAM-1, cuya expresión en el endotelio está regulada por citoquinas inflamatorias como la IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-4;<sup>18,19</sup> reticulocitos que expresan la  $\beta$ 3-integrina GPIIb/IIIa se unen con el receptor endotelial de vitronectina (VRN);<sup>20</sup> reticulocitos

CD36+ se unen a la trombospondina, complejo que se adhiere al endotelio vía receptor de VRN y el CD36 endotelial.<sup>21</sup> Todo esto provoca un éxtasis del flujo sanguíneo y obstrucción de los vasos. Dichos trastornos frecuentemente se resuelven de forma espontánea, pero pueden progresar para convertirse en sintomáticos.<sup>22</sup> Resulta evidente, acorde con los datos obtenidos en nuestro trabajo, que existen pacientes cuya capacidad para dar solución a las consecuencias de los fenómenos isquémicos microvasculares es superior a otros casos que presentan manifestaciones clínicas con relativa frecuencia, y que, por tal motivo, pueden liberar a la circulación citocinas y otros mediadores, y provocar

una disregulación del sistema inmune, lo que pudiera explicar las alteraciones de la vía alternativa demostradas en el grupo de pacientes con complicaciones clínicas. Una disminución en la actividad del complemento favorece la elevada susceptibilidad a infecciones que se observa en estos pacientes.

El hecho de que en la muestra de pacientes puedan distinguirse 2 grupos, según la evolución de la enfermedad, indica la heterogeneidad biológica de los individuos, de ahí que difieran en la frecuencia y severidad de las crisis, resistencia a infecciones y en otras alteraciones relacionadas con la respuesta inmune.

## SUMMARY

---

The activity of the classic and alternative complement pathways, as well as the quantitation of some of their components was determined in 46 patients with sickle cell anemia (haemoglobin SS), 21 with no clinical complications and 25 with them. Among the most frequent complications we found: number of infections, malleolar ulcers, and vaso-occlusive, hepatic and aplastic crises. A year previous to the blood sample taking was considered as the limit. A significant reduction of the activity of the alternative pathway, factor B and component C3 was proved in the group of patients with clinical complications. A marked correlation was observed between the number of vaso-occlusive crises and infections and the activity of the alternative pathway, factor B and complement C3. These results suggest that the inflammatory phenomena that may persist among patients with basal sickle cell anemia, mainly those with prior history of clinical complications, may produce alterations in the complement activity.

*Subject headings:* ANEMIA/complications; COMPLEMENT PATHWAY, ALTERNATIVE; COMPLEMENT FACTOR B/deficiency.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bunn HF. Disorders of hemoglobin. En: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (eds). Principles of Internal Medicine. 13<sup>th</sup> ed. New York: McGraw Hill, 1995:1033-9.
2. Cetiner S, Akoglu FF, Kilinc Y, Akoglu E, Kinin M. Immunological studies in sickle cell disease: Comparison of homozygote mild and severe variants. Clin Immunol Immunopathol 1989;53(1):32-9.
3. Moore CM, Ehlayel M, Leiva LE, Sorensen RU. New concepts in the immunology of sickle cell disease. Ann Allerg Asthma Immunol 1996;76(5):385-403.
4. Villaescusa R, Arce AA, Guerreiro AM, Merlín JC, Espinosa E. Alteraciones del sistema complemento y proteína C reactiva en la anemia drepanocítica. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter 1994;10(1-2):2-84.

5. Singhal A, Doherty JF, Raynes JG. Is there an acute-phase response in steady state sickle cell disease? *Lancet* 1993;341:651-3.
6. Hedo CC, Akenova YA, Okpala IE. Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. *J Intern Med* 1993;233:467-70.
7. Monnet D, Diallo T, Sangre A, Yapo AE. Clinical value of C-reactive protein, alpha 1-glycoprotein acid and transferring assay in homozygous cell disease. *Bull Soc Pathol Exot* 1993;86:282-5.
8. Ibe BO, Kurantsin-Mills J, Usha Raj J, Lessin LS. Plasma and urinary leukotrienes in sickle cell disease: possible role in inflammatory process. *Eur J Clin Invest* 1994;24:57-64.
9. Koethe SM, Casper JT, Rodney GE. Alternative pathway activity in sera from patients with sickle cell disease. *Clin Exp Immunol* 1976;23:56-60.
10. Villaescusa R, Arce AA, Guerreiro AM, Merlín JC, Espinosa E. Estudio seriado del sistema complemento e inmunocomplejos circulantes en la anemia drepanocítica. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter* 1995;11(1):18-24.
11. Mayer MM. Complement and complement fixation. En: Kabat EA, Mayer MM (eds). *Experimental Immunochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Illinois: Thomas Publisher, 1967:133.
12. Platts-Mills TAE, Ishizaka K. Activation of the alternate pathway of human complement by rabbit cells. *J Immunol* 1974;113:348-58.
13. Aguado MT, Celada A, Lambert PH. Medida de la función de la vía alternativa del sistema complemento: actividad hemolítica y solubilización de inmunocomplejos. *Inmunología* 1983;2:63-70.
14. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Single radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins. Peeters H (ed). *Int Prot Biol Fluids*. 11<sup>th</sup> Colloqu Bruges. Oxford: Pergamon Press, 1964:370-3.
15. Barrett-Connor E. Bacterial infection an sickle cell anemia. An analysis of 250 infections in 166 patients and a review of the literature. *Medicine* 1971;50:97-100.
16. Steinberg MH. Hemoglobinopathies and thalassemias. En: Stein JH (ed). *Internal Medicine*. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby, 1994:852.
17. Wright CS, Gardner E. A study of the role of acute infection in precipitating crises in chronic hemolytic states. *Ann Intern Med* 1960;52:530-7.
18. Swerlick PA, Eckman JR, Kumar A. Alpha-4/beta-1 integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood* 1993;82:1891-9.
19. Vordermeir S, Singh S, Biggerstaff J. Red blood cells from patients with sickle cell disease exhibited an increased adherence to culture endothelial cell pretreated with tumor necrosis factor. *Br J Haematol* 1992;81:591-7.
20. Wick TM, Moake JL, Udden MM, McIntire LV. Unusually large von Willebrand factor multimers preferentially promote young sickle and non sickle erythrocyte adhesion to endothelial cell. *Am J Hematol* 1993;42:284-92.
21. Brittain HA, Eckman JR, Swerlick RA. Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood* 1993;81:2137-43.
22. Stuart J. Sickle cell disease: acute phase response and sickle crisis (Editorial). *Lancet* 1993;341:664.

Recibido: 17 de octubre del 2000. Aprobado: 12 de diciembre del 2000.

Lic. *Rinaldo Villaescusa Blanco*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537)578268. Fax: (537) 338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu