

ARTÍCULO ORIGINAL

Expresión de las moléculas de adhesión en la anemia drepanocítica

Expression of adhesion molecules in cases of drepanocytemia

DraC. Consuelo Macías Abraham^I; Lic. Lázaro O. del Valle Pérez^I; Lic. Bertha B. Socarrás Ferrer^I; DrC. Joel de León^{II}; Lic. Teresita Badía Martínez^{II}; Dr. Edgardo Espinosa Martínez^I; DraC. Prof. Eva Svarch^I; DrC. Prof. Porfirio Hernández Ramírez^I; DrC. Prof. José M. Ballester Santovenia^I

^I Instituto de Hematología e Inmunología. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Centro de Inmunología Molecular. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

En enfermos con anemia drepanocítica (AD) en estado basal y con crisis vasooclusivas dolorosas (CVOD), se estudió la expresión, en células mononucleares (CMN) y neutrófilos, de las moléculas de adhesión LFA-1, VLA-4, L-selectina e ICAM-1; en sangre periférica (SP), las moléculas VCAM-1 y CD34 y en fracciones de hematíes con diferente densidad, las moléculas VLA-4 y Lutheran, con anticuerpos monoclonales específicos mediante inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo. En ambos grupos de enfermos se observó una disminución significativa en la expresión en las CMN de las moléculas LFA-1 y VLA-4, y de LFA-1 en los neutrófilos de los pacientes en estado basal; disminución de la expresión de la molécula L-selectina en CMN y neutrófilos de pacientes en estado basal. El aumento de las moléculas ICAM-1 (CD54), CD34 y VCAM-1(CD106) en las CMN y sangre periférica de pacientes basales, demuestra la presencia de un estado de activación leucocitaria y endotelial permanente determinado por la continua inflamación subclínica. El incremento significativo de ICAM-1 en neutrófilos y CD34 y VCAM-1 en sangre periférica en ambos grupos de pacientes, con mayor aumento de VCAM-1 en los pacientes en crisis, refleja la activación de monocitos, linfocitos, neutrófilos y de células endoteliales durante las CVOD, y la liberación de estas últimas a la periferia. Se observó una mayor expresión de las moléculas LFA-1, L-selectina e ICAM-1 en los neutrófilos de los enfermos con CVOD e incremento significativo de la molécula CD18 en CMN de los pacientes con CVOD, que puede explicarse por la activación de los monocitos en el fenómeno vasooclusivo.

Palabras clave: moléculas de adhesión, anemia drepanocítica, endotelio vascular, vasooclusión e inflamación.

ABSTRACT

In patients with drepanocytemia (DP) in basal state and with crises of painful vaso-occlusive (PVOC) authors studied the expression in mononuclear cells (MNC) and neutrophils, of LFA-1, VLA-4, L-selectine and ICAM-1; in peripheral blood (PB), VCAM-1 and CD34 molecules, and in red blood cells with different density, VLA-4 and Lutheran molecules, with specific monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence by flux cytometry. In both groups there was a significant decrease in expression of LFA-1 and VLA-4 molecules MNC and of LFA-1 in neutrophils of patients basal state; decrease in L-selectine molecule expression in MNC and in patients in basal state. Increase of ICAM-1 (CD54), CD34 and VCAM-1 (CD106) in MNC and in peripheral blood of basal patients shows the presence of a permanent leukocyte activation state determined by the continuous subclinical inflammation. The significant increase of ICAM-1 in neutrophils and CD34 and VCAM-1 in peripheral blood in both groups of patients with a higher increase of VCAM-1 in patients in crises, shows the monocyte, lymphocyte, neutrophils, and of endothelial cells during the PVOC and the release of these latter to periphery. We note a higher expression of LFA-1, L-selectine and ICAM-1 molecules in neutrophils of patients with PVOC and a significant increase of CD18 molecule in MNC of patients with PVOC that may be explained by monocyte activation in vaso-occlusive phenomenon.

Key words: Adhesion molecules, drepanocytemia, vascular endothelium, vaso-occlusion and inflammation.

INTRODUCCIÓN

La anemia drepanocítica (AD) es la hemoglobinopatía estructural más importante en el mundo. Es muy frecuente en todos los países africanos, en la mayoría de los del Caribe y en algunos de América Central y Suramérica; existe también en Cuba.¹

La oclusión vascular es la primera causa de morbilidad y mortalidad en la AD, cuyo origen se debe fundamentalmente a la polimerización de la hemoglobina S. También se encuentran involucrados otros factores como proteínas plasmáticas y citocinas, anormalidades endoteliales, alteraciones del tono vasomotor y la adherencia de los eritrocitos de estrés y leucocitos al endotelio vascular activado. En la actualidad, es necesario conocer la participación de la microvasculatura endotelial en la fisiopatología de la AD, para poder intervenir en tratar de modificar u optimizar el tratamiento de estos enfermos para lograr una mejor calidad de vida.²⁻⁴

Se ha corroborado por diferentes estudios moleculares que la adhesión anormal al endotelio vascular de eritrocitos y leucocitos desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la vasooclusión en la AD mediada por moléculas de adhesión expresadas, tanto en los hematíes, leucocitos y en la membrana endotelial activada, lo cual se incrementa durante los eventos vasooclusivos.⁵⁻⁹ Por lo anterior, nos propusimos estudiar la expresión de las moléculas de adhesión en los diferentes tipos celulares involucrados en la vasooclusión durante el curso de la enfermedad y analizar su implicación en su fisiopatogenia.

MÉTODOS

Pacientes y grupos de estudio

Se estudiaron 38 pacientes adultos con el diagnóstico de AD atendidos en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI): 26 del sexo femenino y 18 del sexo masculino (edad media 48,4 años), 20 en estado basal y 18 con CVOD osteomioarticulares, abdominales y lumbares; y 20 individuos supuestamente sanos donantes del Banco de Sangre del IHI, en un rango de edad y distribución por sexo similar al del grupo en estado basal.

Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes con el diagnóstico de AD que acudieron al Cuerpo de Guardia del IHI y fueron ingresados con síntomas y signos de CVOD de moderada a severa (definidas con el criterio de una puntuación de 5 ó más en la escala analógica verbal de 0 a 10 y con 2 ó más signos acompañantes como llanto, quejidos, posiciones antálgicas y signos inflamatorios en la zona del dolor), sin recibir otro tratamiento médico que la administración de soluciones hipotónicas antes del estudio; y pacientes en estado basal con ausencia de manifestaciones clínicas y que no recibieron transfusiones en los 3 meses anteriores, que asistieron a consulta médica en el IHI.

Criterios de exclusión

No se incluyeron en el estudio pacientes que presentaron signos de infección en el momento de la CVOD y fiebre de 38 °C o ambos elementos, o que estaban recibiendo alguna droga que provocara alteraciones del endotelio, como hidroxíurea, glucocorticoides, otro inmunomodulador o algún antiinflamatorio no esteroideo; ni pacientes con otros tipos de drepanocitosis (SC, Sβ) o con síndrome torácico agudo.

Cuantificación de leucocitos totales y porcentaje de neutrófilos y linfocitos

A un tubo de ensayo que contenía 200 mL de fosfato bipotásico se le añadieron 200µL de sangre obtenida por punción capilar que se colocó en el contador hematológico automático *GENIUS 20* (Italia).

Citometría de flujo

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena antecubital y se depositaron en tubos con EDTA al 10 %. Todas las muestras estudiadas, controles normales y de pacientes con AD en estado basal y con CVOD, se les cuantificó la

expresión de las moléculas de adhesión CD11a, CD18, CD49d, CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-selectina), CD34 y CD106 (VCAM-1) en sangre periférica, con AcMo específicos (SEROTEC, Inglaterra) mediante inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo.^{10,11}

Se incubaron 100 µL de sangre total con 10 µL de cada AcMo durante 30 min a 4 °C; posteriormente a cada tubo se añadieron 10 µL de anti Ig de ratón (fragmento F(ab¹)₂ conjugado con ficoeritrina (DAKO, Dinamarca) y se incubó durante 30 min a 4 °C; los hematíes fueron lisados con 1 mL de solución lisante (Becton- Dickinson, EE.UU.), las células fueron lavadas 2 veces con solución balanceada de fosfato (PBS pH 7,2) a 1500 rpm, se resuspendieron en 500 µL del mismo PBS y la lectura se realizó en un citómetro de flujo FAC-Scan (Becton- Dickinson, EE.UU.), mediante la adquisición de 50 000 células en cada caso.

Por el mismo método, en cada muestra se cuantificaron los niveles de expresión de CD3, CD19 y CD57 como controles positivos, y como control negativo se utilizó el sobrenadante de hibridoma P3X63 de la subclase IgG1 (donación del Prof. Sánchez Madrid, Servicio de Inmunología del Hospital de la Princesa, Madrid, España).

El análisis de los diferentes tipos celulares, CMN y neutrófilos, se realizó considerando la ventana correspondiente en el gráfico de puntos de adquisición de poblaciones celulares, para lo que se utilizó *forward and side scatter* (FSC vs. SSC). Para el análisis de los marcadores no expresados en sangre periférica, como CD34 y CD106, se consideró la ventana correspondiente a células endoteliales en sangre periférica con muestra lisada (FSC vs. SSC), siguiendo las recomendaciones de la *Internacional Society for Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE). Los datos de fluorescencia se obtuvieron en escala de log y fueron convertidos a escala lineal para su cuantificación. La fluorescencia relativa específica fue obtenida de la compensación del fondo lineal de fluorescencia del control negativo del mieloma P3X63. Los porcentajes de células positivas fueron calculados como el resultado de sustraer el porcentaje del control negativo X63 del obtenido con cada marcador específico.

Estudio de la expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 y Lutheran(Lu) en hematíes

Los hematíes fueron previamente separados en fracción rica en reticulocitos y de mayor densidad, mediante la técnica de Percoll.¹¹ Posteriormente, a ambas fracciones se les cuantificó la expresión de las moléculas VLA-4 y Lu en la membrana eritrocitaria utilizando AcMos específicos anti CD49d y anti Lu (SEROTEC, Inglaterra), mediante inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo.¹²

Técnica de Percoll para la separación de hematíes por su densidad

En un tubo de 100mL se preparó un gradiente de densidad mezclando 35 mL de Percoll (*Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Sweden*); 15 mL de Renografin 60; 0,5 mL de cloruro de sodio al 0,9 % y 28 mL de agua destilada. Posteriormente se centrifugó la sangre a 1 000 x g (3 400 rpm) por 5 min y se eliminó el plasma. Seguidamente se mezcló 1 mL de los hematíes empaquetados con 10 mL de la solución de Percoll. Se transfirieron 5 mL de la mezcla a un tubo de cristal de 13 x 100 mm y se centrifugó a 35 000 x g durante 5 min a 4 °C. Al finalizar la centrifugación, se removieron para un tubo de ensayo las bandas de arriba (consiste en 1-3 cm por encima del menisco) de la fracción rica en reticulocitos, y se lavaron 4 veces en solución salina al 0,9 %. Los hematíes más densos se

colectaron del fondo del tubo con la solución de Percoll y recibieron igual tratamiento. A partir de estas fracciones separadas se realizó el estudio de la expresión de las moléculas de adhesión.

Para ello se incubaron 5 µL de sangre total diluida en 100 µL de PBS con 10 µL de cada AcMo durante 30 min a 4 °C, se añadieron 10 µL de anti Ig de ratón (Fragmento F(ab¹)₂) conjugado con ficoeritrina (DAKO, Dinamarca) y se incubaron durante 30 min a 4 °C; la muestra se lavó 2 veces con PBS y fue resuspendida en 500 µL de este. La lectura se realizó en un citómetro de flujo FAC-Scan (*Becton-Dickinson*), mediante la adquisición lenta o baja de hasta 50 000 células en cada caso. Como control negativo se utilizaron las propias células del paciente que no fueron marcadas con AcMo.

Para el análisis se consideró la zona o ventana en el gráfico de puntos correspondiente a la adquisición de hematíes (FSC vs. SCC). Los datos de fluorescencia se obtuvieron en escala de log y fueron convertidos a escala linear para su cuantificación. La fluorescencia relativa específica fue obtenida por la sustracción del fondo linear de fluorescencia del control negativo. Los porcentajes de células positivas fueron calculados como el resultado de sustraer el porcentaje del control negativo del obtenido con cada marcador específico.

RESULTADOS

Las CMN de los pacientes con AD en estado basal y con CVOD mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) de la expresión de las moléculas LFA-1 (CD11a/CD18) y VLA-4 (CD49d/CD29), y un aumento de la molécula ICAM-1 (CD54) en relación con los controles. Los enfermos en estado basal presentaron también una disminución de la expresión en CMN de la L-selectina. En los 2 estados clínicos de la enfermedad se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el aumento de la expresión en CMN de CD18 y la disminución de la expresión de CD29. En las CVOD también se observó una disminución de los linfocitos T totales CD3+ y un incremento de las células NK CD57+ (tabla 1).

Tabla 1. Expresión de moléculas de adhesión en células mononucleares de controles normales, enfermos con anemia drepanocítica en estado basal y en crisis vasooclusiva dolorosa (CVOD)

	Conjuntos de diferenciación (CD)								
	CD3	CD19	CD57	CD11a	CD18	CD49d	CD29	CD54	CD62L
Controles normales	65,24±7,43	16,91±6,43	29,39±13,95	93,28±4,41	93,73±7,74	60,85±14,78	40,52±17,67	1,60±2,62	25,08±9,76
Enfermos en estado basal	62,26±10,79	16,73±6,96	37,65±17,71	81,44±16,35*	79,30±25,39*	37,21±26,19*	27,55±13,85*	7,23±10,79*	17,67±12,48*

Enfermos en CVO D **	58,88±10,82*	14,83±6,24	44,65±18,18*	87,71±8,01**	95,36±5,38**	38,04±24,66*	16,67**±15,24***	10,19±21,47	23,90±20,92
----------------------	--------------	------------	--------------	--------------	--------------	--------------	------------------	-------------	-------------

Los valores se expresan en media ± DE.

* p < 0,05: cuando se compararon controles y enfermos en estado basal.

** p < 0,05: cuando se compararon controles y enfermos en CVOD.

*** p < 0,05: cuando se compararon ambos grupos de enfermos.

En los neutrófilos de los pacientes en estado basal se observó una disminución significativa (p < 0,05) en la expresión de las moléculas LFA-1 y L-selectina en relación con los sujetos sanos (tabla 2), no así en los pacientes con CVOD, que mostraron además un aumento significativo (p < 0,05) de la molécula ICAM-1 (tabla 2).

Entre los 2 estados de la enfermedad se observaron diferencias significativas (p < 0,05) en el aumento de la expresión en los neutrófilos de los pacientes con CVOD de las moléculas LFA-1, ICAM-1 y L-selectina (tabla 2).

Tabla 2. Expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos de controles normales, enfermos con anemia drepanocítica en estado basal y en crisis vasooclusiva dolorosa (CVOD)

Conjuntos de diferenciación (CD)						
	CD11a	CD18	CD49d	CD29	CD54	CD62L
Controles normales	92,47±6,88	94,69±5,09	11,18±12,09	5,04±12,09	1,78±2,67	36,64±11,07
Enfermos en estado basal	* 74,12±28,42	* 79,89±22,92	10,89±20,56	4,97±11,84	2,77±1,35	* 8,7±8,3
Enfermos en CVOD	*** 95,47±6,88	97,37±4,16	17,93±28,40	24,73±28,91	** *** 22,37±34,48	*** 53,34±8,86

Los valores se expresan en media ± DE.

* p < 0,05: cuando se compararon controles y enfermos en estado basal.

** p < 0,05: cuando se compararon controles y enfermos en CVOD.

*** p < 0,05: cuando se compararon ambos grupos de enfermos.

Al comparar la presencia en SP de los marcadores de activación endotelial CD34 y VCAM-1, normalmente ausentes en los leucocitos, se observó un incremento significativo de ambos marcadores en los 2 grupos de enfermos, pero solo VCAM-1 fue significativamente superior en los pacientes con crisis en relación con los basales (tabla 3).

Tabla 3. Expresión de las moléculas de adhesión CD34 y VCAM-1 (CD106) en sangre periférica de controles normales, enfermos con anemia drepanocítica en estado basal y en crisis vasooclusiva dolorosa (CVOD)

Conjuntos de diferenciación (CD)

	CD 34	CD106
Controles normales	2,38 ± 2,99	2,81 ± 1,81
Enfermos en estado basal	* 11,37 ± 13,57	* 4,25 ± 4,36
Enfermos en CVOD	** 24,40 ± 33,23	** *** 10,75 ± 10,38

Los valores se expresan en media ± DE.

* p < 0,05; cuando se compararon controles y enfermos en estado basal.

** p < 0,05; cuando se compararon controles y enfermos en CVOD.

*** p < 0,05; cuando se compararon ambos grupos de enfermos.

En la expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 y Lu en hematíes previamente separados mediante la técnica de Percoll, en fracción rica en reticulocitos y hematíes más densos, se observó un aumento significativo de la molécula VLA-4 (cadena CD49d) en la fracción rica en reticulocitos dentro del grupo de pacientes en estado basal y de la molécula Lu en la fracción rica en reticulocitos en ambos grupos (p < 0,05). Sin embargo, al comparar estas moléculas entre ambos grupos de enfermos, no se observaron diferencias significativas ([tabla 4](#)).

Tabla 4. Expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 y Lutheran en hematíes de enfermos con anemia drepanocítica en estado basal y en crisis vasooclusiva (CVOD)

Conjuntos de diferenciación (CD)

	CD49d R	CD49d D	Lutheran R	Lutheran D
Enfermos en estado basal	1,45 ± 1,59 *	0,63 ± 0,68 *	42,91 ± 10,92 *	35,42 ± 10,35 *
Enfermos en CVOD	1,79 ± 2	3,72 ± 6,98	40,79 ± 12,58 *	32,06 ± 9,12 *

Los valores se expresan en media ± DE.

* p < 0,05; cuando se compararon la fracción R y D para cada CD.

R: hematíes de la fracción rica en reticulocitos (menos densos).

D: hematíes de la fracción más densa.

Las diferencias en la cuantificación de los leucocitos totales y los valores relativos de linfocitos y neutrófilos, entre los controles, el grupo en estado basal y el grupo con CVOD, reflejaron incremento significativo de los leucocitos totales en ambos grupos de pacientes en relación con los controles y una neutrofilia significativa en los pacientes con CVOD. Sin embargo, en el análisis comparativo de los valores absolutos de linfocitos y neutrófilos entre los 3 grupos estudiados, se observó un incremento de los linfocitos en ambos grupos de enfermos en relación con los controles, sin diferencias entre ellos, y un incremento significativo de los neutrófilos

en ambos estados clínicos en relación con los controles, y en los pacientes con CVOD en relación con los pacientes en estado basal.

DISCUSIÓN

La oclusión vascular es el factor esencial en la morbilidad y mortalidad de los enfermos con AD, lo cual se encuentra relacionado directamente con la heterogeneidad o subpoblaciones de los hematíes circulantes en estos enfermos. En la actualidad, se ha corroborado por diferentes estudios moleculares que la interacción endotelio-eritrocito es mediada por moléculas de adhesión expresadas, tanto en los hematíes como en la membrana endotelial (fundamentalmente por la interacción VLA-4/ VCAM-1) y que existe un incremento de la expresión e inducción de las moléculas que se expresan en la superficie eritrocitaria (VLA-4 y Lutheran) y leucocitaria (ICAM-1), así como en la membrana endotelial (VCAM-1, ICAM-1 y CD34) de los enfermos con AD.¹³⁻²⁰ Aún cuando la oclusión vascular es la consecuencia de la polimerización de la hemoglobina S, se han implicado otros procesos que incluyen las interacciones entre hematíes, leucocitos, proteínas plasmáticas y componentes de la pared vascular, lo que desencadena isquemia, daño tisular e inflamación en diferentes tejidos y órganos.^{5,7-9,21}

Los enfermos con AD tienen frecuentemente leucocitosis, altos niveles de citocinas circulantes y frecuentes infecciones.^{22,23} En nuestro estudio se demostró un aumento de los leucocitos totales en ambos grupos de enfermos, del porcentaje de neutrófilos en los pacientes con CVOD en comparación con los individuos sanos, así como de los valores absolutos de neutrófilos en los pacientes en estado basal, con un aumento significativo en el grupo con CVOD. Esto se puede relacionar con la reducción o ausencia de la función esplénica que deriva un aumento del número de plaquetas y leucocitos, con el estado de inflamación subyacente, los episodios isquémicos subclínicos y la liberación de citocinas debido a la continua vasooclusión en tejidos periféricos que caracteriza a la enfermedad. Esto se ha corroborado por otros autores que encontraron reactantes de fase aguda, como proteína C reactiva, amilasa A sérica, factor sérico amiloide, fibrinógeno y leucotrieno C4, que provocan una estimulación constante de la médula ósea, con incremento en la producción de estos.²⁴⁻³¹

Al estudiar la expresión de las moléculas de adhesión, se observó que los pacientes en crisis presentaron una disminución de los linfocitos T totales, ya que muestran valores de CD3 disminuidos en relación con los individuos sanos, lo que se corresponde con lo descrito por otros autores^{32,33}

En ambos grupos de enfermos estudiados en relación con el grupo control, se observó una disminución significativa en la expresión en las CMN de las moléculas LFA-1 (cadena alfa CD11a) y VLA-4 (CD49d / CD29); una disminución de LFA-1 en los neutrófilos de los pacientes en estado basal y una disminución de la expresión de la molécula L-selectina en CMN y neutrófilos de pacientes en estado basal, lo que se corresponde con lo anteriormente descrito.^{5,34} Todo esto pudiera explicarse por el hecho de que en los pacientes con AD se han descrito alteraciones variables del sistema inmune celular, tanto cuantitativas como cualitativas, que demuestran cierto grado de inmunodeficiencia,³²⁻³⁴ y la expresión disminuida de estas moléculas de adhesión pudiera ser otra manifestación de inmunodeficiencia secundaria en una enfermedad crónica debida a las infecciones recurrentes por el uso de terapia transfusional inmunosupresora y las alteraciones de la inmunorregulación demostradas.^{5,36}

En nuestro estudio se observaron diferencias significativas en la mayor expresión de las moléculas LFA-1, L-selectina e ICAM-1 en los neutrófilos de los enfermos con CVOD, lo que se corresponde con lo encontrado por otros autores en enfermos con complicaciones,²¹ en oposición a otros que no encontraron incremento de la molécula L-selectina en los neutrófilos durante las crisis.³⁷ El aumento de la expresión de la L-selectina en los neutrófilos de los enfermos con CVOD es de gran interés para la comprensión de la fisiopatogenia de las crisis. Se conoce que en condiciones de éstasis eritrocitaria, existe un efecto proactivatorio de la L-selectina en la adhesión celular y una acción sinérgica fisiológica de la IL-8 en la estimulación de la expresión de esta molécula, lo que favorece la adhesión celular y la migración transendotelial.³⁸ Además, la estimulación de la L-selectina favorece el rodamiento y reclutamiento de los neutrófilos y estimula la cadena respiratoria.³⁸ Lo anterior es de gran interés porque la molécula L-selectina se encuentra disminuida en los neutrófilos en estado basal de acuerdo con nuestros resultados y los de otros autores,²¹ y su incremento en las CVOD asociado con la neutrofilia, indica la mayor activación de estas células durante los fenómenos de vasooclusión que hacen que conjuntamente con los mecanismos mediados por los hematíes, faciliten la oclusión vascular de estos pacientes.^{5,8,38} Los PMN no inician la vasooclusión, pero contribuyen a que esta culmine, ya que por su poder oxidativo destruyen las células endoteliales y exponen la membrana basal lo que favorece la adhesión plaquetaria.⁸ Los neutrófilos de pacientes con AD son más adherentes a la FN que los de los individuos normales, los drepanocitos se adhieren a los PMN y provocan el estallido respiratorio y se han observado PMN asociados con las células eritrocitarias, con plaquetas y con trombos de fibrina, lo que ocasiona la oclusión de los sitios involucrados,⁸ lo cual es aún más importante si consideramos que en experimentos realizados en ratas se ha observado que el bloqueo de la unión eritrocito-endotelio a través de la vía de interacción VLA-4/VCAM-1 con AcMo anti VLA-4 a nivel endotelial, ha mostrado que la FN es un contrarreceptor para la molécula VLA-4 eritrocitaria.⁸ Lo anterior puede sugerir interacción de ambos tipos celulares, PMN activados y eritrocitos, durante el fenómeno vasooclusivo que involucren a la molécula VLA-4 u otro receptor relacionado.

Asociados con los niveles elevados de neutrófilos en las CVOD, en nuestro estudio encontramos también niveles elevados de la molécula ICAM-1, lo que se corresponde con lo referido por otros autores.⁸ Esta molécula puede inducirse a nivel del endotelio por el factor de crecimiento del endotelio vascular y otras citocinas, y es responsable de la firme adhesión de estos en la transmigración endotelial, que favorece el reclutamiento leucocitario durante el proceso inflamatorio en las CVOD.⁸ La adhesión de reticulocitos al endotelio causa éstasis leucocitaria y cambios en el patrón del flujo sanguíneo, lo que favorece la adhesión firme de los leucocitos al endotelio a través de sus contrarreceptores endoteliales como ICAM-1.¹⁸

El incremento de la molécula CD57 (marcador de las células NK) en las CVOD se puede explicar por la respuesta del sistema inmune natural frente a un proceso inflamatorio, así como a la liberación de INF γ por linfocitos y células NK durante las CVOD,⁸ lo que provocaría un mecanismo de retroalimentación positivo en el número de estas células. Esto, asociado con el porcentaje elevado de células NK que se adhieren al endotelio,³⁹⁻⁴¹ el incremento de su capacidad de adhesión al ser estimuladas por citocinas por las vías de interacción LFA-1 y VLA-4,³⁹⁻⁴¹ el incremento de la expresión de ambas moléculas en estas células activadas, su capacidad de adherirse a la FN y de agregar entre ellas por la vía de la molécula VLA-4, según hemos demostrado,⁴² nos permite sugerir que este tipo celular está implicado en las CVOD, lo cual no ha sido referido anteriormente. La vía de interacción fundamental de estas células con el endotelio es VLA-4/VCAM-1, la cual

corresponde con la utilizada por los eritrocitos, lo que sugiere que exista interacción entre ambos tipos celulares, de la misma forma que existe interacción entre los neutrófilos, monocitos y plaquetas con los eritrocitos durante las CVOD en el mecanismo fisiopatológico de la AD.

El aumento de las moléculas ICAM-1 (CD54), CD34 y VCAM-1 (CD106) en las CMN y sangre periférica de los pacientes en estado basal en relación con los controles sanos, demuestra la presencia de un estado de activación leucocitario y endotelial permanente determinado por la continua inflamación subclínica existente en el estado basal,^{43,44} y el incremento significativo de ICAM-1, CD34 y VCAM-1 en la sangre periférica de los pacientes en crisis en relación con los pacientes en estado basal, reflejan la activación de monocitos, linfocitos, neutrófilos y de células endoteliales durante las CVOD, y la liberación de estas últimas a la periferia, como se ha descrito por algunos autores.^{45,46}

El incremento de la molécula VCAM-1 en ambos estados clínicos y su incremento significativo en las CVOD, es de gran importancia si se considera que esta molécula es indispensable en la progresión de las crisis en la unión con su contrarreceptor VLA-4 en la membrana de los hematíes y en la adherencia de los neutrófilos, linfocitos B, T y monocitos a la membrana endotelial activada en el proceso inflamatorio provocado por la vasooclusión.⁸ El incremento de la expresión de VCAM-1 en el endotelio vascular de la retina se asocia con una infiltración 20 veces mayor de PMN en esta,⁸ lo que contribuye a la retinopatía existente en estos enfermos y cuyo conocimiento pudiera contribuir a la utilización de medidas preventivas y terapéuticas teniendo en cuenta el desarrollo de nuevos medicamentos que pueden disminuir esta adhesión. Recientemente se han descrito variantes en el gen VCAM-1 y existen evidencias preliminares de que el alelo VCAM-1 G1238C podría estar asociado con una menor posibilidad de derrame cerebral en el paciente con AD, lo cual confirma que las variantes genéticas de VCAM-1 pueden influir en el pronóstico de estos enfermos y quizás la cuantificación de los efectos acumulativos de todas las variantes de este *locus* permitan dilucidar la patogénesis de eventos cerebrovasculares en la enfermedad. Esto nos permitiría identificar los enfermos que requerirían tratamientos preventivos.^{47,48}

Nuestros resultados mostraron un incremento significativo de la molécula CD18 en CMN de los pacientes con CVOD en relación con los pacientes en estado basal, lo que se puede explicar por la activación de los monocitos en el fenómeno vasooclusivo. Esta afirmación se basa en que no se encontró diferencia significativa en la expresión en CMN de la cadena CD11a de la molécula LFA-1 entre pacientes en estado basal y en CVOD; la cadena CD18 se expresa en las moléculas LFA-1 (que se expresa en linfocitos y monocitos), Mac-1 (CD11b/ CD18) y p150/95 (CD11c/ CD18) presentes en los monocitos; la población celular seleccionada para el análisis por citometría de flujo (CMN) incluye a este tipo celular y el número de células analizadas es suficiente para evaluar estos resultados. Los monocitos son activados en la AD, y esta activación puede ocurrir por un incremento de la eritrofagocitosis de eritrocitos senescentes, por micropartículas eritrocitarias que activan la respuesta inflamatoria, or la hemoglobina liberada de los hematíes y oxidantes derivados de grupos hemo, así como por la acción de las citocinas.⁶ Las plaquetas se adhieren a los monocitos a través de la interacción GpIIb/IIIa plaquetaria/ trombospondina.⁴⁹

Una expresión elevada de la molécula VLA-4 se ha observado en los precursores eritroides de enfermos con hemoglobina SC y SS.^{8,43,50,51} El incremento significativo de la expresión de la molécula VLA-4 en la fracción rica en reticulocitos dentro del grupo de pacientes en estado basal, se debe a la presencia de esta en hematíes

más inmaduros o menos densos, lo que concuerda con lo descrito por otros autores.⁵²

El incremento de la expresión de la molécula Lu en la fracción rica en reticulocitos en ambos grupos de pacientes en estado basal y en crisis, también concuerda con lo descrito por otros investigadores.^{14-16,50} El significado de este incremento no ha sido bien estudiado, aunque datos recientes muestran que en la AD, esta molécula se une con VLA-4 y con α V integrinas, lo que sugiere que desempeña un importante papel en la vasooclusión.^{15,16} Probablemente la mayor expresión de la molécula Lu, receptor para la laminina en los hematíes menos densos, esté relacionada con la mayor participación de estos en la adherencia de los eritrocitos al endotelio vascular durante el fenómeno vasooclusivo.

Sin embargo, al comparar ambas moléculas entre los grupos de pacientes en estado basal y con CVOD, no se observaron diferencias significativas, lo cual puede deberse a que nuestro estudio se realizó en sangre periférica y no fue posible la exacta cuantificación de los reticulocitos que tienen una mayor expresión de estas moléculas, pues estos se encuentran en su mayor parte atrapados a nivel de la microcirculación durante la CVOD. Otra posible explicación sería que al separar por gradiente de densidad con Percoll ambas fracciones de hematíes; en la fracción más densa quedarán reticulocitos, lo cual ha sido descrito por otros autores,⁵² y no permitiría cuantificar una diferencia real de expresión entre ambos grupos. Sin embargo, sí se observó un ligero incremento en la expresión de la molécula VLA-4 en ambas fracciones de los pacientes con CVOD en relación con los basales. Kaul y colaboradores han descrito que la adherencia de los hematíes menos densos inicia el proceso vasooclusivo pero las células más densas son atrapadas posteriormente en los sitios de adherencia de los reticulocitos.^{17,52} Otros autores han encontrado que la interacción VLA-4 /VCAM-1 es responsable de la interacción in vitro de la adherencia de células densas y reticulocitos al endotelio macrovascular y microvascular.^{16,52} Por lo tanto, se debe considerar que la fracción más densa de hematíes de pacientes en CVOD que expresan también VLA-4, no se detectó en su totalidad en nuestro estudio en sangre periférica por encontrarse también atrapados en la microcirculación.

Es importante señalar que los valores de los marcadores que reflejan fundamentalmente activación endotelial como ICAM-1, CD34 y VCAM-1, así como la expresión de VLA-4 en los hematíes, mostraron diferencias interindividuales marcadas que afectan las comparaciones estadísticas y los niveles de significación por la gran dispersión de las DE. Esto puede explicarse por el hecho de que la expresión fenotípica en esta enfermedad varía entre pacientes y longitudinalmente en un mismo paciente por la influencia de diferentes factores.³

En este estudio no se incluyeron enfermos que tuvieron signos de infección ni infecciones en los 3 meses anteriores, por lo que los resultados obtenidos no tienen como base fundamental las infecciones recurrentes o subclínicas que generan un proceso inflamatorio secundario, sino la inflamación vascular característica de la enfermedad por las alteraciones generadas por los drepanocitos. Un mecanismo importante por el cual la inflamación vascular contribuiría a las crisis vasooclusivas es a través de una expresión elevada del factor tisular y la activación del sistema de la coagulación. El factor tisular se encuentra elevado en las células endoteliales circulantes de los pacientes con AD y es aún mayor en los enfermos con CVOD.²⁶

Si se consideran una serie de factores asociados, como son: adherencia de los eritrocitos a los grandes y pequeños vasos a través de las moléculas de adhesión eritrocitarias, la liberación y efectos de las citocinas en la activación celular, los

niveles elevados de factor tisular en las células activadas, la activación del sistema de la coagulación, la activación de linfocitos, monocitos, neutrófilos, células NK y células endoteliales, la adherencia de plaquetas a neutrófilos, monocitos y células endoteliales de la misma forma que en el SCA, la inflamación vascular con destrucción endotelial, el daño de los tejidos y el incremento del proceso inflamatorio, podríamos considerar que en la AD existen múltiples factores asociados que provocan efectos polifuncionales en el fenómeno vasooclusivo y la fisiopatogenia de la enfermedad, donde las moléculas de adhesión reguladas por diferentes citocinas tienen una importancia fundamental como vía de comunicación entre diferentes tipos celulares. Estas observaciones nos llevan a reflexionar: ¿precede la inflamación vascular a la vasooclusión o la vasooclusión con su consecuente isquemia precede a la inflamación? Quizás existen 2 diferentes vías funcionales en la fisiopatogenia de la enfermedad que generan mecanismos de retroalimentación entre ambas (figura), con predominio de una u otra vía en sus diferentes estados, que por su estrecha interrelación conformen un sistema de activación secuencial o en cascada.

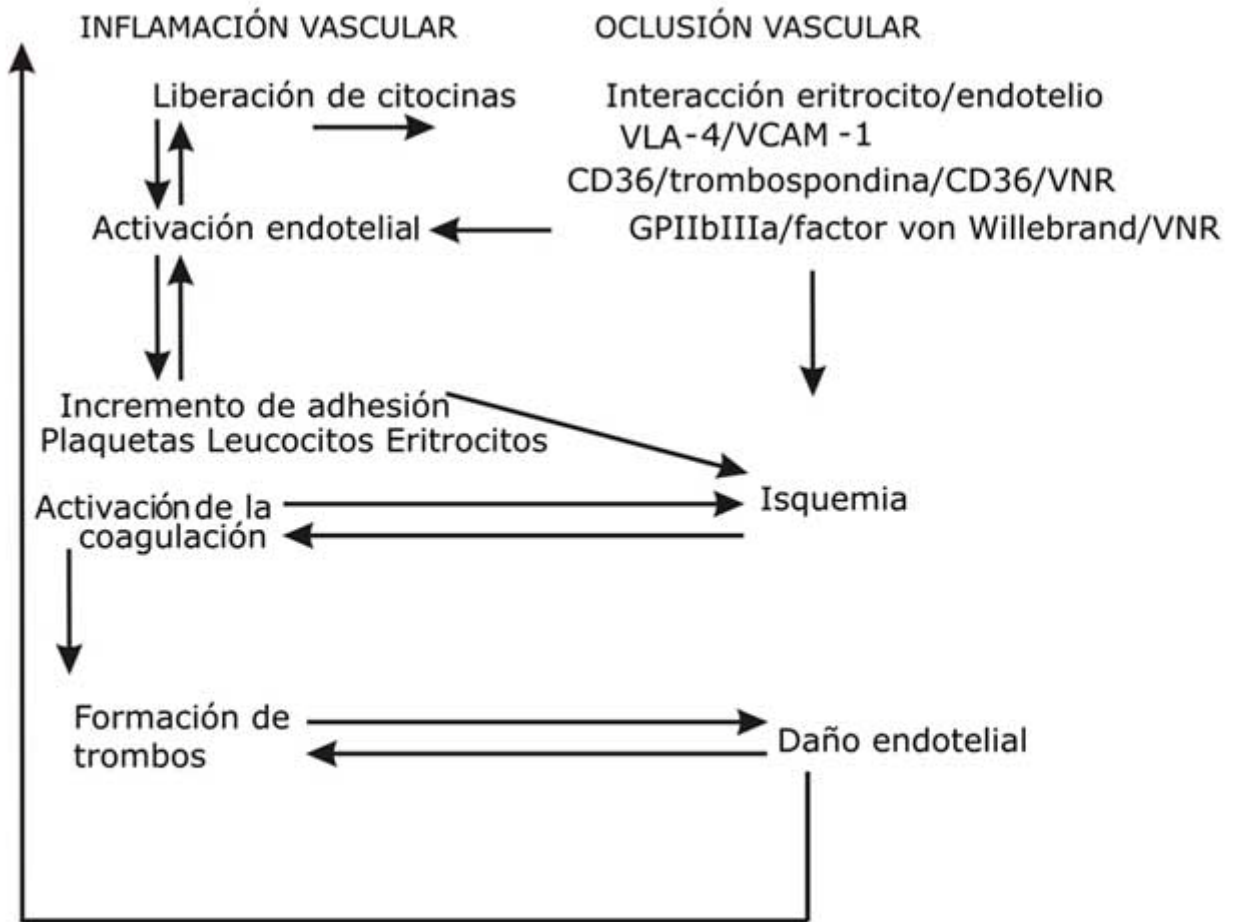


Fig. Vías funcionales de inflamación y oclusión vascular en la fisiopatogenia de la AD

Por sus manifestaciones clínicas y el aumento de los marcadores séricos característicos de la inflamación, como la proteína C reactiva y los niveles elevados de las moléculas de adhesión endoteliales y sus manifestaciones en diferentes tejidos y órganos, la AD puede considerarse una enfermedad sistémica y los

conocimientos adquiridos sobre su fisiopatogenia en la que intervienen diversas células hematopoyéticas y subpoblaciones celulares del sistema inmune, así como la acción de diversas citocinas y quimocinas, nos hacen plantear que en el orden funcional es una enfermedad mucho más compleja, y que durante las CVOD, puede llegar a generarse una avalancha cito-hemato-inmunológica. Estas observaciones abren nuevos caminos para una politerapia integrada y racional futura que permita controlar los principales factores desencadenantes del proceso inflamatorio-oclusivo vascular de la AD.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Espinosa E, Svarch E, Martínez G, Hernández P. La anemia drepanocítica en Cuba. Experiencia de 30 años. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter* 1995; 12: 97-105.
2. Moore CM, Ehlal M, Leiva LE, Sorensen RU. New concepts in the immunology of sickle cell disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 76: 385-403.
3. Ballas SK. Sickle cell anaemia: Progress in pathogenesis and treatment. *Drugs* 2002; 62: 1143-72.
4. Mankad VN. Exciting new treatment approaches for pathophysiologic mechanisms of sickle cell disease. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20: 1-13.
5. Lard LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duis AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 411-5.
6. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: A potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 2000; 96: 2451-9.
7. Kunz M, McLeod DS, Merges C, Cao J, Luty GA. Neutrophils and leucocyte adhesion molecules in sickle cell retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 684-90.
8. Brown MD, Wick TM, Eckman JR. Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20: 47-72.
9. Aramburu J, Balboa MA, Ramírez A, Silva AA, Sánchez-Madrid F, de Landazuri MO, et al. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor + T lymphocytes. *J Immunol* 1990; 144: 3238-47.
10. Macías C, Ballester JM, Hernández P. Expression and functional activity of the very late activation antigen-4 molecule on human natural killer cells in different states of activation. *Immunology* 2000; 100: 77-83.
11. Branch DR, Hian AL, Carlson F, Maslow WC, Petz LD. Erythrocyte age-fractionation using a Percoll-renografin density gradient: Application to autologous red cell antigen determinations in recently transfused patients. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 453-8.

12. Styles LA, Lubin B, Vichinsky E, Lawrence S, Hua M, Test S, et al. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. *Blood* 1997;89:2554-9.
13. Chappey O, Wautier MP, Wautier JL. Adhesion of erythrocytes to endothelium in pathological situations: A review article. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994;36:281-8.
14. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997;99:2561-4.
15. Daniels G. Functional aspects of red cell antigens. *Blood Rev* 1999;13:14-35.
16. Montes RA, Eckman JR, Hsu LL, Wick TM. Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: Role of shear stress in propagation of vaso-occlusion. *Am J Hematol* 2002;70:216-27.
17. Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood* 1996;10:29-44.
18. Walmet PS, Eckman JR, Wick TM. Inflammatory mediators promote strong sickle cell adherence to endothelium under venular flow conditions. *Am J Hematol* 2003;73:215-24.
19. Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996;10:1221-38.
20. Lard LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol* 1999;66:411-5.
21. Serjeant GR. Sickle cell disease. *Lancet* 1997;350:725-30.
22. Forget BG. Anemia de células falciformes y hemoglobinopatías relacionadas. En: La Fayette R, Wyngaarden JB, Smith LH, eds. *Tratado de medicina Interna*. 19 ed. Ciudad México: Interamericana; 1994. p. 1033-9.
23. Stuart J, Stone PCW, Akinola NO. Monitoring the acute phase response to vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. *J Clin Pathol* 1994;47:166-9.
24. Singhal A, Doherty JF, Raynes JG, McAdam KP, Thomas PW, Serjeant BE, et al. Is there an acute-phase response in steady state sickle cell disease? *Lancet* 1993;341:651-3.
25. Hedo CC, Akenova YA, Okpala IE. Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. *J Inter Med* 1993;233:467-70.
26. Monnet D, Diallo I, Sangre A, Yapo AE. Clinical value of C-reactive protein, alpha 1-glycoprotein acid and transferrin assay in homozygous sickle cell disease. *Bull Soc Pathol Exot* 1993;86:282-5.
27. Akinola NO, Stevens SME, Franklin IM. Subclinical ischaemic episodes during the steady state of sickle cell anaemia. *J Clin Pathol* 1992;45:902-6.

28. Ibe BO, Kurantsin-Mills J, Usha Raj J, Lessin LS. Plasma and urinary leukotrienes in homozygous sickle cell disease: possible role in the inflammatory process. *Eur J Clin Invest* 1994;24:57-64.
29. Makis AC, Hatzimichael EC, Mavridis A, Bourantas KL. Alpha-2-macroglobulin and interleukin-6 levels in steady state sickle cell disease patients. *Acta Haematol* 2000;104:164-8.
30. Bourantas KL, Dalekos GN, Makis AC, Chaidos A, Tsiara S, Mavridis A. Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. *Eur J Haematol* 1998;61:49-54.
31. Richardson P, Steingart R. Acute-phase response and sickle crisis. *Lancet* 1993;341:1349.
32. Rivero RA, Aranda RE, Cruz C, Lorigados LC, Hernández P. Subpoblaciones de linfocitos T en la anemia drepanocítica. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemot* 1986;2:90-92.
33. Rivero R, Macías C, del Valle L, Lorigados L, Inclán G, Aranda RE, et al. Alteraciones inmunológicas en la anemia drepanocítica. *Sangre* 1991;36:15-20.
34. Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, Fay M, Vilmer E, Elion J, et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood* 2002;99:2297-303.
35. Kaplan J, Sarmaik SH, Levy J. Transfusion induce immunologic abnormalities not related to AIDS virus. *N engl J Med* 1985;313:1227.
36. Falcao RP, Donadi EA. Infection and immunity in sickle cell disease. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1989;35:70-4.
37. Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Miresluis AR, Dumonde DC, Phillips J, et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 1998;91:266-74.
38. González-Amaro R, Sánchez- Madrid F. Cell Adhesion Molecules: Selectins and Integrins. *Crit Rev Immunol* 1999;19:389-429.
39. Von Andrian UH, Mackay CR. Advances in Immunology: T cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-34.
40. Bianchi G, Sironi M, Ghibaudi E, Selvaggini C, Elices M, Allavena P, et al. Migration of natural killer cells across endothelial cell monolayers *J Immunol* 1993;151:5135-44.
41. Allavena P, Bianchi G, Paganin C, Giardina G, Mantovani A. Regulation of adhesion and transendothelial migration of natural killer cells. *Nat Immun* 1996-97;15:107-16.
42. Macías C, Ballester JM, Hernández P. Expression and functional activity of the very late activation antigen-4 molecule on human natural killer cells in different

states of activation. *Immunology* 2000; 100: 77-83.

43. Moore CM, Ehlal M, Leiva LE, Sorensen RU. New concepts in the immunology of sickle cell disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 76: 385-403.

44. Reiner Z, Tedeschi-Reiner E. New information on the pathophysiology of atherosclerosis. *Lijec Vjesn* 2001; 123: 26-31.

45. Duits AJ, Pieters RC, Saleh AW, van Rosmalen E, Katerberg H, Berend K, et al. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 81: 96-8.

46. Schnog JB, Rojer RA, Mac Gillavry MR, Ten Cate H, Brandjes DP, Duits AJ. Steady-state sVCAM-1 serum levels in adults with sickle cell disease. *Ann Hematol* 2003; 82: 109-13.

47. Dover GJ. SS disease is not a single gene disorder. *Blood* 2002; 100: 4255.

48. Taylor VI JG, Tang DC, Savage ShA, Leitman SF, Heller SI, Serjeant GR et al. Variants in the VCAM-1 gene an drisk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood* 2002; 100: 4303-09.

49. Telen MJ. Red blood cell surface adhesion molecules: Their possible roles in normal human physiology and disease. *Semin Hematol* 2000; 37: 130-42.

50. Belfield H, Green CA, James J, Forbes B, Massey E, Hones J, et al. Elevated expression of Lutheran and LW glycoproteins on red cell and erythroid precursors in haemoglobin SC disease. *Transfusion Medicine* 2002; 12: 20.

51. Luty GA, Taomoto M, Cao J, McLeod DS, Vanderslice P, McIntyre BW, et al. Inhibition of TNF induced sickle RBC retention in retina by a VLA4 antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1349-55.

52. Yamaja BN, Surekha S, Kolkarni M, Stuart J. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell endothelial adhesion. *Blood* 2002; 99: 1564-71.

Recibido: 8 de julio del 2009.

Aprobado: 23 de julio del 2009.

DraC. *Consuelo Macías Abraham*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado Postal 8070, Ciudad de La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 6438268, 6438695, Fax (537) 6442334. e-mail: ihidir@hemato.sld.cu. Sitio web: <http://www.sld.cu/sitios/ih>