

Tabla 6. Valores de las moléculas de adhesión endoteliales solubles en la angina inestable y el infarto agudo de miocardio al diagnóstico y 10 días después.

Moléculas de Adhesion (ng/ml)	Controles normales	Angina inestable		Infarto agudo de miocardio	
		Admisión	10 días después	Admisión	10 días después
VCAM-1	15.3 ± 6.1	34.6 ± 19.8**+	24.4 ± 13.2*†	24.3 ± 14.1**	25.3 ± 14.4**
E-selectina	3.2 ± 1.4	5.9 ± 2.4**‡	5.0 ± 2.4**‡	3.8 ± 1.6*‡	3.2 ± 1.1‡
ICAM-1	18.5 ± 6.9	26.6 ± 21.1	24.9 ± 10.6	27.7 ± 12.4***	29.4 ± 8.8***

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml)

*p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, cuando ambos grupos de pacientes se compararon con los controles';
† p<0.05, cuando los pacientes con angina se compararon en el momento de la admisión y 10 días después;
‡ p<0.05, cuando ambos grupos de pacientes se compararon al momento de la admisión y 10 días después.

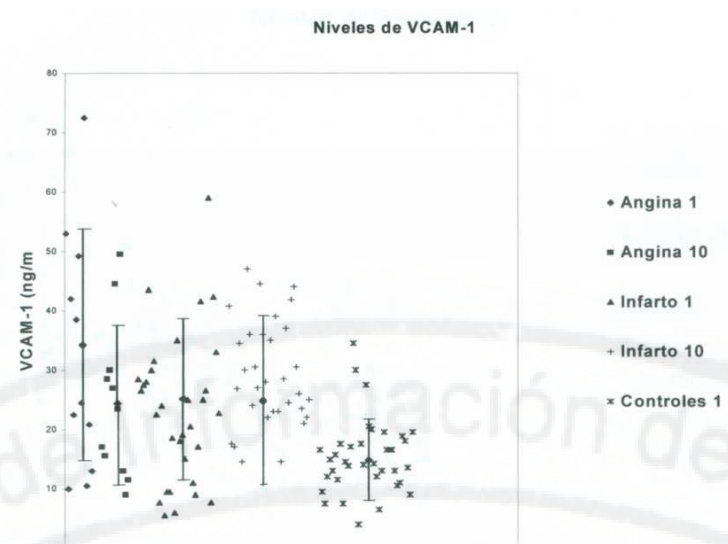


Figura 11. Concentraciones de VCAM-1 en el momento del ingreso y a los 10 días.

Niveles de E-selectina

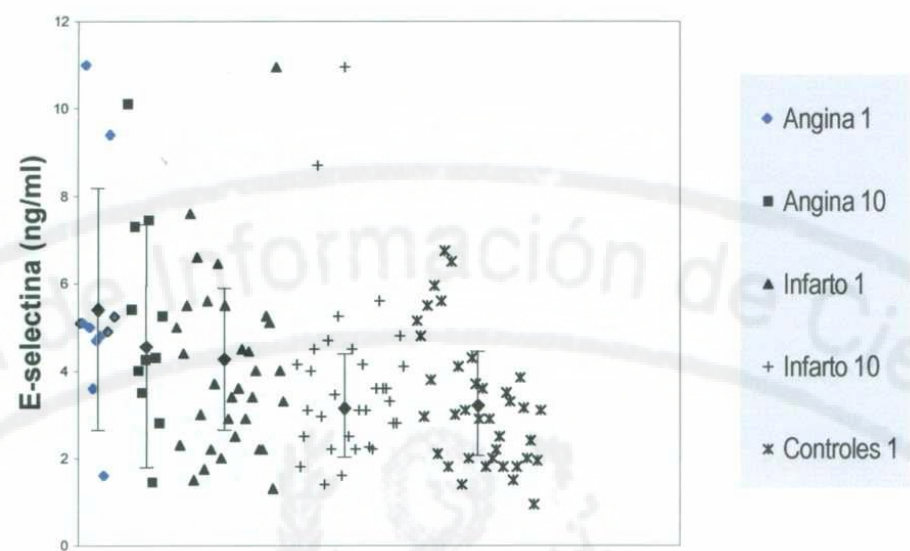


Figura 12. Concentraciones de E-selectina en el momento del ingreso y a los 10 días

Niveles de ICAM-1



Figura 13. Concentraciones de ICAM-1 en el momento del ingreso y a los 10 días.

Tabla 7. Comparación de los valores de moléculas de adhesión endoteliales y el estado electrocardiográfico de la onda Q en el infarto agudo de miocardio

Infarto agudo de miocardio

Moléculas de Adhesión (ng/ml)	Con alteración de la onda Q (n=22)		Sin alteración de la onda Q (n=10)	
	Diagnóstico	10 días después	Diagnóstico	10 días después
VCAM-1	22.5 + 13.3	24.7 ± 15.2	30.8 ±16.2	27.7 ±10.9
E-selectina	3.8 ±1.6	3.2 ±1.1	3.5 ±1.5	3.3 ±1.3
ICAM-1	27.0 ±12.5	29.6 ± 9.2	30.2 ±12.5	28.5 ±8.1

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml)

Tabla 8. Comparación entre los valores de las moléculas de adhesión endoteliales y los resultados de las enzimas cardíacas en la angina inestable

Angina inestable								
Moléculas de adhesión (ng/ml)	Transaminasa glutámico-oxalacética				CK-MB			
	Elevadas (n=2)		Normales (n=9)		Elevadas (n=2)		Normales (n=9)	
	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días
VCAM-1	36.71±13.4	33.8±9.3	34.6±19.8	24.4+13.2	36.7+13.4	33.8±9.3	34.6+19.8	24.4+13.2
E-selectina	4.4±0.7	3.9±0.3	5.9±2.4	5.0±2.4	4.4+0.7	3.9+0.3	5.9±2.4	5.0±2.4
ICAM-1	22.2+8.4	23.5±2.2	26.6±3.4	24.9±10.6	22.2±8.4	23.5±2.2	26.6±21.1	24.9+10.6

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml)

Tabla 9. Comparación entre los valores de moléculas de adhesión endoteliales solubles y los resultados de las enzimas cardíacas en el infarto agudo de miocardio

Infarto agudo de miocardio

Moléculas de adhesión (ng/ml)	Transaminasa glutámico-oxalacética				CK -MB			
	Elevadas (n=20)		Normales (n=12)		Elevadas (n=24)		Normales (n=8)	
	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días
VCAM-1	24.0+14.3	25.6±4.7	21.3±13.6	23.7±13.2	23.4±14.4	25.0+14.7	23.7+13.5	24.9+12.8
E-selectina	3.9±1.6	3.2±1.1	3.6±1.4	3.2±1.2	3.8+1.6	3.1+1.1	3.4±1.1	3.2+1.2
ICAM-1	27.5+12.3	30±9.1	26.8±9.2	30.6+8.7	27.4+12.1	29.8+9.0	27.1±10.6	29.0±8.0

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml)

4.3 Estudio de las moléculas de adhesión en la AD

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 (Tabla 10); los enfermos en estado basal presentaron una disminución de la expresión en CMN de la L-selectina (Tabla 10). En los dos 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 (Tabla 10). En las CVOD también se observó una disminución de los linfocitos T totales CD3+ y un incremento de las células NK CD57+ (Tabla 10).

En los neutrófilos de los pacientes en estado basal existe una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión de las moléculas LFA-1 y L-selectina en relación con los sujetos sanos (Tabla 11), no así en los pacientes con CVOD, que mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) de la molécula ICAM-1 (Tabla 11). Entre los dos 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 11).

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 dos grupos de enfermos, pero sólo VCAM-1 fue significativamente superior en los pacientes con crisis en relación con los basales (Tabla 12).

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 demostraron diferencias significativas (Tabla 13).

Las diferencias en la cuantificación de los leucocitos totales y 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 (Tabla 14). Sin embargo, en el análisis comparativo de los valores absolutos de linfocitos y neutrófilos entre los tres grupos estudiados, se observó un incremento de los linfocitos en ambos grupos de enfermos en relación a los controles, sin diferencias entre ellos y un incremento significativo de los neutrófilos en ambos estados clínicos con relación a los controles y en los pacientes con CVOD en relación a los pacientes en estado basal (Tabla 14).

Tabla 10. 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
	Porcentaje de			expresión (%)					
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 CVOD	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

Tabla 11. 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)

	CD11 a	CD18	CD49d	CD29	CD54	CD62L
	Porcentaje de expresión (%)					
Controles normales	92.47±6.88	94.69 ±5.09	11.18±12.09	15.04±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	14.97±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± 38.86

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

Tabla 12. 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	CD 106
	Porcentaje de	expresión (%)
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

Tabla 13. Expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 y Lutheran en hematíes de enfermos con anemia drepanocítica en estado basal y en crisis vasooclusiva dolorosa (CVOD).

Conjuntos de diferenciación (CD)

	CD49d R	CD49d D	Lutheran R	Lutheran D
	Porcentaje de expresión (%)			
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

Tabla 14. Cuantificación de leucocitos totales, linfocitos y neutrófilos en controles normales, enfermos con anemia drepanocítica en estado basal y con crisis vasooclusivas dolorosas

	Leucocitos totales($10^9/L$)	Linfocitos (%)	Neutrófilos (%)	Linfocitos ($10^9/L$)	Neutrófilos ($10^9/L$)
Controles normales	6.23 $\pm$ 0.9 *	32.45 $\pm$ 6.77	52.75 $\pm$ 9.17	2.01 $\pm$ 0.49 *	3.27 $\pm$ 0.66 *
Enfermos en estado basal	9.50 $\pm$ 3.32 **	38.5 $\pm$ 13.9	50.25 $\pm$ 13.83 **	3.46 $\pm$ 1.37 **	4.92 $\pm$ 2.49 ** ***
Enfermos en CVOD	12.13 $\pm$ 4.84	30.83 $\pm$ 12.54	61.83 $\pm$ 14.57	3.45 $\pm$ 1.45	7.74 $\pm$ 4.36

Los valores se expresan en media $\pm$ DE

*p <0.001 cuando se compararon enfermos en estado basal y controles

**p <0.05 cuando se compararon enfermos en CVOD y controles

*** p <0.05 cuando se compararon ambos grupos de enfermos

Capítulo 5. DISCUSIÓN

5.1 Estudio de la expresión y actividad funcional de las $\beta 2$ integrinas y molécula VLA-4 en las células NK en diferentes estados de activación

Los resultados de nuestro estudio han demostrado una elevada expresión de los heterodímeros LFA-1 y VLA-4 en células NK, que se incrementa por la acción de la IL2r. Las células NK humanas expresan la cadena β del receptor para IL2 (p75 IL2r) lo que le confiere la capacidad de responder "in vitro" a altas concentraciones de esta interleucina. La IL2 induce la síntesis de la p55 (cadena α del IL2 R) y del receptor de alta afinidad (213). Así, la activación de las células NK origina un cambio de la expresión de sus características fenotípicas y funcionales y por tanto, esto se traduce en un incremento de la expresión de los heterodímeros CD49d / CD29 y CD11a / CD18 y la modulación de la expresión de las cadenas CD11b y CD11c (cadenas α de las moléculas Mac-1 y p150/95 respectivamente).

Nuestros resultados demuestran que la agregación inducida por la IL-2r sobre las células NK activadas fue mediada por la vía de adhesión LFA-1/ICAM-1. Esto es conocido para la agregación inducida en las células U937 por el acetato miristato de forbol (PMA) y otros AcMos (subunidad anti LFA-1 y anti sialoforina) que median una interacción leucocitaria homotípica (208).

Al evaluar el posible papel de la integrina VLA-4 en la adhesión celular homotípica se probaron los efectos funcionales de los AcMos sobre la inducción o el bloqueo de la agregación de las células NK. La ausencia de inducción de agregación en las células NK frescas en presencia de algunos AcMos anti cadena α ou sugiere que las mismas expresan una forma no funcional de la molécula VLA-4. Sin embargo, los AcMos HP1/7 y HP2/4 inducen agregación homotípica sobre las células NK activadas, lo cual se relaciona directamente con la activación celular. Las características de esta agregación celular sugieren que VLA-4 constituye una nueva vía de adhesión celular para las células NK independiente de la vía de adhesión LFA-1/ICAM-1. Por lo tanto la agregación celular homotípica puede ser inducida por estos AcMos a través de 2 epitopes diferentes de la cadena α de VLA (Tabla 4).

La agregación sobre las células activadas por estos AcMos puede ser el resultado de un incremento en la expresión de la molécula VLA-4. La activación de las células NK podría inducir un cambio conformacional o transcripcional en una región de la molécula involucrada en la agregación celular homotípica (la región N terminal de 100 aa de la cadena α humana) y llevar a estas de un estado no funcional a un estado funcional (214-216). Este hecho es conocido para otras moléculas integrinas de las familias $\beta 2$ y $\beta 3$ (217-220)

Estos datos sugieren que la citocina IL-2 puede actuar como un regulador directo de los mecanismos adhesivos, así como la IL-4 y el TNF actúan sobre otros tipos celulares (221). Sin embargo, las capacidades adhesivas de la integrina VLA-4 no se alteran después del tratamiento con tripsina, pero sí se modifican las

formas $\alpha 4$ por el tratamiento con altas dosis de pronasa (222). También el proceso de activación de VLA-4 podría inducir la síntesis de una nueva molécula funcional u otras proteínas asociadas con VLA-4. Todas las hipótesis anteriores son posibles.

Los linfocitos B aunque incapaces de unirse a la FN, pueden agregar en presencia de algunos AcMos anti cadena α (210). Los presentes resultados demuestran que las células NK frescas con una alta expresión de la cadena α pueden unirse a la FN y no agregan en presencia de los AcMos anti α , a diferencia de las células NK activadas, que se unen también a la FN y sí agregan en presencia de los AcMos HP1/7 y HP2/4. La adhesión de estas células a la FN es mediada por la molécula VLA-4, lo cual se ha demostrado porque la misma se inhibe mediante el bloqueo del epítipo B1 por el AcMo HP2/1 (anti VLA-4), así como por la incubación previa de las células con el fragmento CS1 (fragmento peptídico LDV de la FN) ligando específico para la molécula VLA-4, lo cual se corrobora por la no inhibición de esta adhesión por el fragmento CS2, que no constituye un ligando para VLA-4 y el AcMo PID6 (anti VLA-5) debido a que la molécula VLA-5 no se expresa en las células NK. Este AcMo fue utilizado como AcMo irrelevante en nuestro estudio y nos permitió corroborar que no existe inducción de la expresión de VLA-5 en las células NK activadas. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de una regulación funcional diferente por las células que expresan VLA-4 en diferentes estados de activación, en la expresión de sus epítopos A y B y su capacidad de interactuar con sus ligandos (223-227). Se conoce que los AcMos que inducen agregación homotípica interaccionan con los 100 aa de la región N terminal de la cadena α humana y que los AcMos que bloquean la adhesión de VLA-4 y VCAM-1 a la FN interaccionan con los 52 aa presentes entre los residuos 152 y 203 de la cadena α humana respectivamente (214,215).

Estos estudios brindan nuevas evidencias de cómo las células NK en diferentes estados de activación mantienen diferentes niveles de la actividad $\alpha 4\beta 1$ integrina y como la actividad de $\beta 1$ integrinas puede ser modulada por activadores de la adhesión celular.

Sin embargo, consideramos necesario ampliar estos estudios para poder precisar si los AcMos anti α pueden inducir algún cambio conformacional o si realmente existe una regulación diferente de la interacción mediada por VLA-4 en su adhesión a la FN y la agregación homotípica intercelular.

A pesar de la elevada expresión de las moléculas LFA-1 y VLA-4 demostrada en las células NK frescas y cultivadas con células Daudi, no se observaron efectos inmunorreguladores de los AcMos específicos anti P2 integrinas y VLA-4 sobre la proliferación celular en 72 horas de cultivo, lo que sugiere que los epítopos de los receptores de adhesión estudiados, por sí solos, no se encuentran asociados a mecanismos de activación inductores de la proliferación en las células NK, o que se necesita de la acción sinérgica de receptores de

activación o el bloqueo de los receptores inhibitorios asociados al reconocimiento o interacción de las moléculas de adhesión para potenciar este proceso activo como se ha descrito para la acción citotóxica de estas células (47), o que las condiciones de estimulación en que realizamos nuestro estudio no son suficientes para lograr una inmunorregulación por esta vía. Estas hipótesis pueden ser posibles.

Las células LAK muestran una actividad lítica incrementada contra las células blanco (228-230). Como esperábamos, nuestro estudio ha comprobado la inhibición de la actividad citotóxica de las células LAK por los AcMos anti CD11a y anti CD18 (cadena α y β de la molécula LFA-1, respectivamente). Estos resultados confirman lo descrito por otros investigadores (47,48,57,57). Las células NK expresan algunas moléculas de adhesión asociadas con subunidades transmisoras de señales, llamadas homodímeros o heterodímeros que involucran a la cadena ζ , del complejo formado por el receptor de las células T (complejo TCR) o de la cadena y del receptor FC (FcR γ) las cuales contienen ITAMs. Estas vías intracelulares que median estas respuestas son posiblemente similares a aquellas que median la activación de las células T a través del complejo TCR (43,52,53).

Springer y otros investigadores, han demostrado que el mecanismo regulatorio de adhesión/desadhesión entre las moléculas LFA-1/ICAM-1 es esencial para la función de las células T citotóxicas (1,10,12). El entrecruzamiento del receptor de las células T incrementa la fuerza del mecanismo de adhesión entre LFA-1 e ICAM-1 (24). Este incremento en la avidéz, el cual es rápido y transitorio provee un mecanismo dinámico para la regulación antígeno-específica de la adhesión y readhesión linfocitaria. La activación de las células T induce un cambio en la conformación del dominio extracelular de LFA-1 lo cual permite incrementar el área de contacto, la fuerza de adhesión y la reorientación del aparato secretor proteico hacia el sitio de unión con las células blanco. Por lo tanto el bloqueo con AcMo anti CD11a inhibe la actividad citotóxica de los LTC (1,10, 12). La activación de las células NK por IL2r pudiera provocar cambios conformacionales en la región extracelular de la molécula LFA-1, lo cual provocaría un aumento de la avidéz en la interacción receptor- ligando LFA-1/ICAM-1, que sería de gran importancia en el contacto célula efectora / célula blanco, lo que ha sido descrito en linfocitos T (12), por lo que consideramos que un bloqueo de esta molécula puede inhibir de manera similar la citotoxicidad de las células Daudi por las células NK.

Otros investigadores han demostrado, en concordancia con nuestros resultados, la inhibición de la actividad citotóxica de células LAK con AcMos anti LFA-1 y anti-ICAM-1 in vivo en ratas provocando el crecimiento de un histiocitoma (57) y que la elevada actividad citolítica de la línea celular NK-92 requiere la expresión de la molécula ICAM-1 en las células blanco (231). La lisis de las células blanco por las células NK puede estar bloqueada por anticuerpos dirigidos contra las moléculas β_2 integrinas e ICAM-2 (48,55).

Los conceptos de adhesión celular en las interacciones leucocitarias son aplicables a diferentes sistemas y contrariamente a lo esperado, a pesar de la alta expresión de la molécula VLA-4 en estas células activadas, los AcMos anticadena α HP1/7, HP2/1 y HP2/4 y anti CD29 no inhiben la actividad citotóxica de las células LAK contra las células Daudi. Este resultado corrobora que la vía de interacción intercelular LFA-1/ICAM-1 es de gran importancia en la citólisis de las células blanco por las células LAK. Sin embargo, la ausencia del efecto de estos AcMos anti VLA-4 no se ha reportado con anterioridad.

Estos resultados son muy interesantes porque los cambios metabólicos inducidos en las células LAK indirectamente promueven una óptima interacción LFA-1/ICAM-1 (47,48,57,58,228) que no es igualmente aplicable para la interacción VLA-4 / ligando en estas mismas células, lo que permite sugerir que la molécula VLA-4 no participa en los mecanismos citolíticos de las células NK activadas lo cual no ha sido adecuadamente esclarecido. Lo anterior demuestra una diferente regulación funcional de las moléculas LFA-1 y VLA-4 en la interacción célula-célula que media la actividad citolítica en las células NK.

Una nueva interrogante surge de estos resultados; ¿la interacción VLA-4/ligando no participa en el mecanismo utilizado en la exocitosis de los gránulos citotóxicos cuando el receptor de las células NK es inhibido por el reconocimiento de su receptor antigénico? Esta respuesta es desconocida. Es necesario realizar estudios adicionales con diferentes células blanco y en diferentes condiciones experimentales para determinar si los AcMos anti-ou pueden inducir algún cambio conformacional y si los epitopes VLA-4-a no participan en la adhesión efectora/célula blanco en el proceso citolítico.

5.2 Estudio de las moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en el SCA

Nuestros resultados muestran niveles elevados de ICAM-1 y VCAM-1 solubles en pacientes con IAM a la admisión y 10 días después. Se observó un patrón característico de liberación de estas moléculas de adhesión: inicialmente estas moléculas se elevaron en la fase aguda del daño isquémico miocárdico, momento en que el flujo sanguíneo coronario está disminuido. Sin embargo, el patrón de E-selectina durante el seguimiento longitudinal difirió del patrón anteriormente descrito para las moléculas ICAM-1 y VCAM-1, ya que no mostró diferencias significativas comparado con los valores normales al momento de la admisión y 10 días después a pesar de la persistencia de los valores incrementados de ICAM-1 y VCAM-1. En los pacientes con AIN se obtuvieron niveles elevados de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina a la admisión y 10 días después pero los valores obtenidos de ICAM-1 no mostraron diferencias significativas comparados con los controles normales y pacientes con IAM .

ICAM-1

Niveles elevados de ICAM-1 han sido previamente reportados en el IAM (95,96,232) y en la AIN (97,233-235). En un estudio reciente se comunicó que pacientes con IAM mostraron niveles elevados de ICAM-1 y E-selectina en la circulación periférica, pero los niveles de E-selectina alcanzaron sus valores máximos entre las 4 y 6 horas posteriores a la admisión retornando a sus niveles basales a las 24 horas (95). Los estudios in vitro también han demostrado diferencias en la cinética de la expresión endotelial de la E-selectina e ICAM-1 (236). Sin embargo, otras investigaciones no han evidenciado incremento de la E-selectina en el IAM (96,97).

La activación de la microcirculación es el principal componente de la respuesta inflamatoria. El endotelio vascular desarrolla y expresa moléculas que inician la inmigración local de leucocitos (237,238). La molécula ICAM-1 puede ser liberada por un incremento en su expresión a nivel del endotelio vascular y también por el tejido dañado o inflamado como consecuencia de una proteólisis inespecífica (239). Estas observaciones podrían explicar los niveles elevados de ICAM-1 en pacientes con síndrome coronario agudo y sus valores más elevados en el IAM.

VCAM-1

VCAM-1 es expresada por el endotelio arterial en las lesiones ateroscleróticas tempranas en un modelo experimental de aterosclerosis en conejo (conejo Watanabe) y podría ser responsable de la atracción de las células mononucleares que desarrollan la lesión aterosclerótica (92). Otros autores han mostrado previamente que VCAM-1 es expresada ampliamente sobre células endoteliales de arterias ocluidas durante la aterosclerosis acelerada (240). La aterosclerosis coronaria es la causa más frecuente de enfermedad cardíaca por isquemia y la ruptura de las placas por trombosis es la principal causa de los síndromes coronarios agudos como la AIN, IAM y muerte súbita (241). Estas observaciones podrían explicar la elevada concentración de VCAM-1 en los síndromes coronarios agudos y por qué existe una ~~significativa~~ disminución en las concentraciones séricas de esta molécula 10 días después en la AIN cuando el flujo sanguíneo coronario ha mejorado.

Nuestros resultados demuestran un significativo incremento de la concentración de E-selectina en el grupo de pacientes con AIN a la admisión y 10 días después. La E-selectina es particularmente interesante a causa de que esta molécula se encuentra solamente en el endotelio activado en contraste con otras moléculas de adhesión las cuales tienen una distribución tisular más amplia. La demostración de E-selectina soluble en la sangre se puede considerar por tanto como una evidencia concluyente de activación endotelial. Esta molécula de adhesión es biológicamente activa mediando la adhesión de neutrófilos a la superficie endotelial, así como

la de monocitos, eosinófilos, basófilos y células NK (242, 243). La E-selectina facilita la fase temprana de adhesión de los polimorfonucleares a la célula endotelial constituyendo un marcador sérico temprano de la respuesta inflamatoria promoviendo el daño celular por isquemia (244,245). Episodios de isquemia breve durante la angioplastia coronaria permiten el estímulo soluble capaz de inducir la expresión de integrinas en el neutrófilo (246,247) y también se ha observado en estudios realizados en pacientes con AIN que la aparición del dolor torácico después de las 48 horas de la angiografía coronaria está relacionado con valores significativamente más altos de activación del neutrófilo, sugiriendo que el grado de activación está relacionado con próximos episodios de angina en reposo (246).

Por otro parte, las concentraciones de interleucina-1 beta (IL-1 b) se han encontrado elevadas en los pacientes con enfermedad cardíaca isquémica en particular en aquellos con enfermedad arterial coronaria mínima y angina (248). La función precisa de la IL-1b en la enfermedad arterial coronaria permanece indeterminada, pero durante la respuesta inflamatoria las células endoteliales expresan E-selectina en respuesta a la IL-1 (248,249). Teniendo en cuenta estas evidencias, los episodios isquémicos podrían actuar como desencadenantes de un mecanismo secuencial representado por la activación endotelial con expresión de E-selectina y su liberación a la sangre, niveles incrementados de IL-1 (3 que promueven la expresión de E-selectina por las células endoteliales y activación de los neutrófilos por la E-selectina soluble, provocando daño celular isquémico y consecuentemente mas liberación de E-selectina por la célula endotelial activada (figura 14). Probablemente estas reacciones integradas podrían explicar por qué la E-selectina se comporta de una manera diferente a la reportada en el IAM por algunos autores (95).

Diferentes hallazgos encontrados por otros autores facilitan la comprensión de nuestros resultados si consideramos que el IAM tiene asociado una respuesta inflamatoria mayor que la AIN (94, 96,97,250-252) y que la AIN se asocia a un mecanismo inflamatorio no relacionado con la presencia de necrosis ni con la extensión de las lesiones coronarias (88).

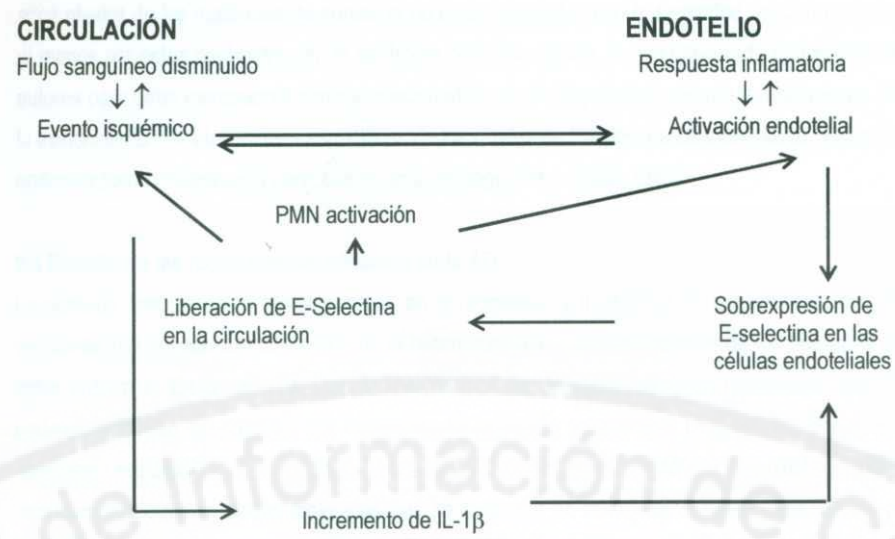


Figura 14: Mecanismo secuencial en el que se observa cómo una reacción de activación endotelial podría prolongar los altos valores de E-Selectina soluble en la sangre.

Relación con el grado de daño miocárdico

En nuestro estudio, no se pudo demostrar relación entre los niveles incrementados de las moléculas de adhesión y los resultados de las enzimas cardíacas y los cambios electrocardiográficos. Esto sugiere que los altos niveles de las moléculas de adhesión no están asociados con la severidad del daño miocárdico medido al menos por estos parámetros en el síndrome coronario agudo, lo que concuerda con lo señalado por otros autores para otros marcadores séricos relacionados con el diagnóstico y pronóstico del mismo (88,252) y con la evidencia de que elevaciones específicas de los niveles de E-selectina podrían indicar activación o daño del endotelio como componente particular de una patología determinada (243).

5.3 Estudio de las moléculas de adhesión en la AD

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 (176-182). 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 (28,29,30-32).

Los enfermos con AD tienen frecuentemente leucocitosis, altos niveles de citocinas circulantes y frecuentes infecciones (28,31,106,107). 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 con relación a los individuos sanos, así como de los valores absolutos de neutrófilos en los pacientes en estado basal con un aumento aún mayor (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 leucocitos (143-151).

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 (159,160).

En ambos grupos de enfermos estudiados, en estado basal y con CVOD, se observó en relación con el grupo control una disminución significativa en la expresión en las CMN de las moléculas LFA-1 (cadena alfa CD11a) y VLA-4 (CD49d / CD29), así como 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 corresponde con lo anteriormente descrito (29,198). Todo esto pudiera explicarse por el hecho de que en los pacientes con AD se han descrito alteraciones variables tanto cuantitativas como cualitativas del sistema inmune celular que demuestran cierto grado de inmunodeficiencia (159-163,168) y la expresión disminuida de estas moléculas de adhesión, pudiera ser otra manifestación de inmunodeficiencia secundaria en una enfermedad crónica debido a las infecciones recurrentes, por el uso de terapia transfusional inmunosupresora y las alteraciones de la inmunorregulación demostradas en la misma (164- 165).

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 (28) en oposición a otros que no encontraron incremento de la molécula L-selectina en los neutrófilos durante las crisis (155). El aumento de la expresión de la L-selectina en los neutrófilos de los enfermos con CVOD es de gran importancia para la comprensión de la fisiopatogenia de las crisis. Se conoce que en condiciones de éstasis eritrocitario 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 (11). Además la estimulación de la L-selectina favorece el rodamiento y reclutamiento de los neutrófilos, estimulando la cadena respiratoria (11). Lo anterior es de interés porque la molécula L-selectina se encuentra disminuida en los neutrófilos en estado basal de acuerdo a nuestros resultados y los de otros autores (29) y su incremento en las CVOD asociado a 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 (28,31,155). Los PMN no inician la vasooclusión pero contribuyen a que culmine la misma, ya que por su poder oxidativo destruyen las células endoteliales, exponiendo la membrana basal lo que favorece la adhesión plaquetaria (31). 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 provocando el estallido respiratorio y se han observado PMN asociados a las células eritrocitarias, a plaquetas y trombos de fibrina ocluyendo los sitios involucrados (31), 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 (31). 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.

En nuestro estudio asociado a los niveles elevados de neutrófilos en las CVOD, encontramos también niveles elevados de la molécula ICAM-1, lo que corresponde con lo referido por otros autores (31). 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 los mismos en la trans migración endotelial, favoreciendo el reclutamiento leucocitario durante el proceso inflamatorio en las CVOD (31). La adhesión de reticulocitos al endotelio causa éstasis leucocitaria y cambios en el patrón del flujo sanguíneo favoreciendo la adhesión firme de los leucocitos al endotelio a través de sus contrarreceptores endoteliales como ICAM-1 (180).

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 (31), lo que provocaría un mecanismo de retroalimentación positivo en el número de estas células. Lo anterior asociado con el porcentaje elevado de células NK que se adhieren al endotelio (18,63,64); el incremento de su capacidad de adhesión al ser estimuladas por citocinas por las vías de interacción LFA-1 y VLA-4 (18,63,64); 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 en este trabajo, 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/ICAM-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, demuestran la presencia de un estado de activación leucocitaria y endotelial permanente determinado por la continua inflamación subclínica existente en el estado basal (25), 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 (83,184,185).

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 (31). 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 la misma (31) 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 susceptibles de tratamientos preventivos (253,254)

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 encontraron diferencias significativas 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 sólo 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, por la hemoglobina liberada de los hematíes y oxidantes derivados de grupos hemo, así como por la acción de las citocinas (30). Las plaquetas se adhieren a los monocitos a través de la interacción GpIIb/IIIa plaquetaria/trombospondina (11).

Una expresión elevada de la molécula VLA-4 se ha observado en los precursores eritroides de enfermos con hemoglobina SC y SS (25,31,203,255). 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 la misma en hematíes más inmaduros o menos densos, lo que concuerda con lo descrito por otros autores (256). 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 (177,178,203). El significado de este incremento no ha sido bien estudiado aunque datos recientes muestran que en la AD, esta molécula se une a VLA-4 y a α V integrinas sugiriendo que desempeña un importante papel en la vasooclusión (177-178). Probablemente la mayor expresión de la molécula Lu, receptor para la laminina

en los hematíes menos densos, esté relacionada con la mayor participación de los mismos 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 (257), 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 (180, 257). También se ha encontrado que la interacción VLA-4 A/CAM-1 es responsable de la interacción in vitro de la adherencia de células densas y reticulocitos al endotelio macrovascular y microvascular (178, 256). Se debe considerar por tanto que la fracción más densa de hematíes de pacientes en CVOD que expresan también VLA-4, no se detectaron 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 (26).

En este estudio no se incluyeron enfermos con signos de infección, ni infecciones en los tres meses anteriores al mismo, por lo que los resultados obtenidos no tienen como base fundamental las infecciones recurrentes o subclínicas generando un proceso inflamatorio secundario, sino la inflamación vascular característica de la enfermedad producto de 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 aún es mayor en los enfermos con CVOD (30).

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 sobre ¿La inflamación vascular precede a la vasooclusión o la vasooclusión con su consecuente isquemia precede a la inflamación?; quizás existen dos diferentes vías funcionales en la fisiopatogenia de la enfermedad generando mecanismos de retroalimentación entre ambas (figura15), con predominio de una u otra vía en los diferentes estados de la misma que por su estrecha interrelación conformen un sistema de activación secuencial o en cascada.

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 el 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.

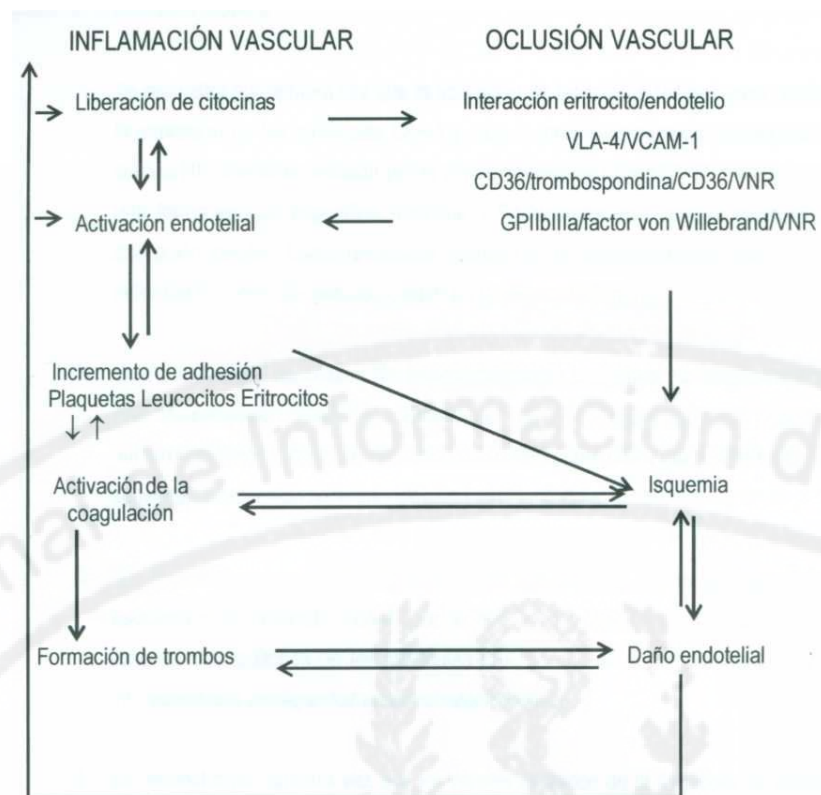


Figura 15: Vías funcionales de inflamación y oclusión vascular en la fisiopatogenia de la anemia drepanocítica.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

1. Se demostró por primera vez que la activación de las células NK humanas con la IL-2r incrementa la expresión de las moléculas LFA-1 y VLA-4, induce agregación homotípica intercelular en las células NK activadas mediada por la vía de interacción LFA-1/ICAM-1 y por la molécula VLA-4 de una forma epitope específica e isotipo y Fc independiente que se relaciona con el grado de activación celular. Estos resultados corroboran la importancia de estas dos moléculas en la actividad funcional de este tipo celular en la respuesta inmune.
2. Se demostró que las células NK frescas presentan una forma no funcional de la molécula VLA-4 para la agregación intercelular homotípica y que tanto estas como las células NK activadas se adhieren a la FN a través de la molécula VLA-4 lo que indica que existen diferentes niveles de la actividad de adhesión $\alpha 4\beta 1$ integrina en este tipo celular.
3. Se demostró que la actividad citotóxica de las células LAK contra las células Daudi no está asociada a la molécula VLA-4, por lo que existe una regulación funcional diferente para la expresión de epitopes de las moléculas LFA-1 y VLA-4 en las células LAK y su capacidad de interactuar con sus ligandos en la actividad citolítica.
4. Se demostró por primera vez que los niveles elevados de la molécula de adhesión endotelial E-selectina medida en el momento del ingreso y días más tarde podría ser un marcador sérico en el diagnóstico para la AI, de utilidad en el diagnóstico diferencial con el IAM para complementar la información de las pruebas convencionales.
5. Se demostró que en los enfermos con AD en estado basal existe un aumento en la expresión de las moléculas ICAM-1 (CD54), CD34 y VCAM-1 (CD106) lo que indica la presencia de un estado de activación leucocitario y endotelial permanente, determinado por la continua inflamación subclínica, y en ambas formas clínicas (estado basal y CVOD) existe una disminución de la expresión de las moléculas LFA-1 y VLA-4 en CMN que pudiera estar relacionada con las alteraciones de la inmunorregulación descritas en esta enfermedad.

6. Se evidenció que en los enfermos con AD y CVOD tenían una mayor expresión en los neutrófilos de las moléculas LFA-1, L-selectina e ICAM-1, un aumento significativo de las moléculas ICAM-1 y CD18 en CMN, y de CD34 y VCAM-1 en sangre periférica, lo que confirma la activación de monocitos, linfocitos, neutrófilos y del endotelio, la liberación de células endoteliales activadas a la circulación y la participación de estos diferentes tipos celulares en la oclusión vascular y el daño endotelial.
7. Se demostró que existe un aumento significativo de la expresión de la molécula VLA-4 en la fracción rica en reticulocitos de los pacientes en estado basal y de la molécula Lutheran tanto en estado basal como en las CVOD, lo que favorece la adhesión de los hematíes más inmaduros o menos densos al endotelio vascular por las vías VLA-4/CAM-1, Lu/laminina y Lu/aV integrina.
8. Se evidenció por primera vez el incremento de las células NK en las CVOD de la AD y la importancia de la adhesión al endotelio vascular de estas células activadas por la vía de interacción VLA-4/CAM-1 durante el proceso inflamatorio, lo que amplía los conocimientos sobre la patogenia de los fenómenos vasooclusivos en esta enfermedad.

Capítulo 7. RECOMENDACIONES

1. Ampliar los estudios sobre los mecanismos involucrados en la regulación funcional diferente de los epitopes de la cadena α en las células NK en diferentes estados de activación y estudiar en otros sistemas de ensayos, en presencia de AcMos anti receptores inhibitorios de las células NK, la participación de la molécula VLA-4 en la actividad citolítica de las células LAK que nos permita correlacionar el papel de esta molécula con los mismos.
2. Realizar otros estudios que permitan correlacionar los niveles incrementados de E-selectina con otros marcadores séricos de conocido valor en el diagnóstico del SCA, como la proteína C reactiva y la troponina T, en el diagnóstico de la AI y su diagnóstico diferencial con el IAM para precisar el valor de este marcador sérico en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con enfermedad isquémica coronaria.
3. Profundizar en el estudio de la interrelación entre las células NK activadas y los eritrocitos en su adhesión al endotelio vascular mediante la interacción VLA-4/CAM-1 en las CVOD de la AD.
4. Desarrollar estudios longitudinales en los pacientes con AD en ambas formas clínicas y otras complicaciones que permitan confirmar la modulación de las moléculas de adhesión estudiadas controlando de este modo la influencia de la variabilidad individual característica de esta enfermedad.
5. Desarrollar modelos experimentales en animales caracterizados por inflamación y activación del endotelio vascular mediante isquemia y oclusión que permitan estudiar la asociación entre los hallazgos histopatológicos y la adhesión celular a nivel tisular.

Capítulo 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patarroyo M, Prieto J, Rincón J, Timonen T, Lunberg C, Lindbom L, et al. Leukocyte-cell adhesion: A molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev* 1990;114:67-108.
2. Larson RS, Springer TA. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 1990;114:181-217.
3. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34.
4. Dransfield I, Marie Buckle A, Hogg N. Early events of the immune response mediated by leukocyte integrins. *Immunol Rev* 1990;114:29-44.
5. Dedhar S. Integrins and tumor invasion. *Bioessays* 1990;12:583-90.
6. Hemler ME, Elices MJ, Parker C, Takada Y. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell- matrix adhesion functions. *Immunol Rev* 1990;114:45-65.
7. Humphries MJ. The molecular basis and specificities of integrins-ligand interactions. *J Cell Sci* 1990;97:585-92.
8. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Gunthert V. CD44 variant isoforms in non- Hodgkin lymphomas: a new independent prognostic factor. *Blood* .1995;85:2885-99.
9. Cavallo F, Martin-Fontecha A, Bellone M, Heltai S, Gatti E, Tornaghi P, Freschi M, Forni G, Dellabona P, Casorati G. Co-expression of B7-1 and ICAM-1 on tumors is required for rejection and the establishment of a memory response. *Eur. J. Immunol.* 1995;25:1154-62.
10. Pardi R, Inverardi L, Bender JR. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunology Today*. 1992;13:224-30.
11. González-Amaro R, Sánchez- Madrid F. Cell Adhesion Molecules: Selectins and Integrins. *Critical Reviews in Immunology* 1999;19:389-429.
12. Macias C. Capítulo 11. Moléculas de Adhesión. En. *Texto de Laboratorio Clínico. Parte V: Inmunología*. 1ra ed. Editorial Ciencias Médicas, La Habana (en prensa), 2003.
13. Mackay ChR, Imhof BA. Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today*. 1993;14:99-102.
14. Bevilacqua MP. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecules. *Ann Rev Immunol* 1993;11:767-804.
15. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-44.
16. Zimmerman GA, Prescott SM. Endothelial cells interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992;3:93-9.
17. Butcher EC. Leukocyte endothelial cells recognition. Three or more steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-37.
18. 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.

19. Verdecía FF. Sociedad y salud. Ciudad Habana: Pueblo y Educación 1986:22-84.
20. Dirección Nacional de Estadísticas. Informe Anual. Ministerio de Salud Pública. Ciudad Habana,2002.
21. Fuster V, Bediman L. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes ,N Engl J Med 1992;326:242-50.
22. Connor W. Prevention complication and treatment in heart disease. Philadelphia: W Saunders 1980: 1221-78.
23. Stein JH. Medicina Interna. Ciudad Habana: Científico Técnica 1984:546-52.
24. 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.
25. Moore CM, Ehlayel M, Leiva LE, Sorensen RU. New concepts in the immunology of sickle cell disease. Ann Allergy Asthma Immunol 1996;76:385-403.
26. Balias SK. Sickle cell anaemia: progress in pathogenesis and treatment. Drugs 2002; 62:1143-72.
27. Mankad VN. Exciting new treatment approaches for pathophysiologic mechanisms of sickle cell disease. Pediatr Pathol Mol Med 2001;20:1-13.
28. Okpala I, Daniel Y, Haynes R, Odoemene D, Goldman J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells.Eur J Haematol 2002;69:135-44.
29. Lard LR, Muí FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. J Leukoc Biol 1999;66:411-5.
30. 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.
31. Kunz Mathews 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
32. 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.
33. Zeromski J, Nyczak E, Dyszkiewicz W. Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. Folia Histochem Cytobiol 2001;39:63-7.
34. Parsons SF, Spring FA, Chasis JA, Anstee DJ. Erythroid cell adhesion molecules Lutheran and LW in health and disease. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 1999;12:729-45.
35. Berman ME, Xie Y, Muller WA. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1,CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. J Immunol 1996;156:1515- 24.

36. Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldson G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today* 1999;20:267-77.
37. Reyburn H, Mandelboim O, Valés-Gómez M, Sheu EG, Pazmany L, Davis DM, et al. Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol Rev* 1997;155:119-26.
38. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cells subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633-40.
39. Lima M, Teixeira MA, Queiros ML, Leite M, Santos AH, Justica B, et al. Immunophenotypic characterization of normal blood CD56^{lo} versus CD56^{hi} NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:73-143.
40. Carson WE, Fehniger TA, Caligiuri MA. CD56 bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the α CD56 ligand. *Eur J Immunol* 1997;27:354-60.
41. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghageri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97:3146-51.
42. Tanaka H, Kai S, Yamaguchi M, Misawa M, Fujimori Y, Yamamoto M, et al. Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur J Haematol* 2003;71:29-38.
43. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Pende D, Vitale M, Poggi A, et al. Major histocompatibility complex class-I specific receptors on human natural killer specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* 1997;155:105-18.
44. Ryan JC, Seaman WE. Divergent functions of lectin-like receptors of NK cells. *Immunol Rev* 1997;155:79-90.
45. Colonna M. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* 1997;155:127-34.
46. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S, et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity and function. *Immunol Rev* 1997;155:135-44.
47. López-Botet M, Pérez-Villar JJ, Carretero M, Rodríguez A, Melero I, Bellón T, et al. Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA-class I molecules. *Immunol Rev* 1997;155:165-74.
48. Renard V, Cambiaggi A, Vély F, Bléry M, Olcese L, Olivero S, et al. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activating and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 1997;155:205-21.
49. López-Botet M, Bellón T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 1999;11:301-7.

50. López-Botet M, Bellón T, Llano M, Navarro F, García P, de Miguel M. Paired inhibitory and triggering NK Cell Receptors for HLA Class I molecules. *Human Immunol* 2000; 61:7-17.
51. López-Botet M, Llano M, Ortega M. Human cytomegalovirus and natural killer cell-mediated surveillance of HLA class I expression: a paradigm of host-pathogen adaptation. *Immunol Rev* 2001;180:1-10.
52. López-Botet M, Llano M, Navarro F, Bellón T. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Immunology* 2000;12:109-19.
53. Ravetch JV, Lanier L. Immune Inhibitory Receptors. *Science* 2000;290:84-9.
54. Bakker AB, Wu J, Philipps JH, Lanier LL. NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol* 2000;61:18-27.
55. Helander TS, Carpén O, Turunen O, Kovanen PE, Vaheri A, Timonen T. ICAM-2 redistributed by EZRIN as a target for killer cells. *Nature* 1996;382:265-68.
56. Meneghetti A, Mariani E, Santi S, Riccio M, Cattini L, Paoletti S, et al. NK binding capacity and lytic activity depend on the expression of ICAM-1 on target bone tumours. *Int J Oncol* 1999;15:909-14.
57. Divya Jyothi M, Varalakshmi C, Khar A. Regulation of effector cell functions through the ligation of lymphocyte function-associated antigen-1 and intracellular adhesion molecule-1 leads to spontaneous regression of a rat histiocytoma. *Scand J Immunol* 1999; 50:378-86.
58. Matsumoto G, Nghiem MP, Nosaki N, Schmits R, Penninger JM. Cooperation between CD44 and LFA-1/CD11a adhesion receptors in lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J Immunol* 1998;160:5781-9.
59. Shibuya K, Lanier LL, Philips JH, Ochs HD, Shimizu K, Nakayama E, et al. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* 1999;11:615-23.
60. Takasaki S, Hayashida K, Morita C, Ishibashi H, Niho Y. CD56 directly interacts in the process of NCAM-positive target cell-killing by NK cells. *Cell Biol Int* 2000;24:101-8.
61. Montelli TC, Peracoli MT, Gabarra RC, Soares AM, Kurokawa CS. Familial cancer: depressed NK-cell cytotoxicity in healthy and cancer affected members. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59:6-10.
62. Irjala H, Salmi M, Alanen K, Grenman R, Jalkanen S. Vascular adhesion protein 1 mediates binding of immunotherapeutic effector cells to tumor endothelium. *J Immunol* 2001 ;166:6937-43.
63. 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.
64. Allavena P, Bianchi G, Paganin C, Giardina G, Mantovani A. Regulation of adhesion and transendothelial migration of natural killer cells. *Nat Immun* 1996;15:107-16.
65. Liang TW, Chiu HH, Gurney A, Sidle A, Turnas DB, Schow P, et al. Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM-2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3. *J Immunol* 2002;168:1618-26.

66. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *CircJ* 2002;66:529-33.
67. Rice GE, Gimbrone MA. Tumor cell-endothelial interactions. Increased adhesion of human melanoma cells to activated vascular endothelium. *Am J Pathol* 1988;133:204-10.
68. Rice GE, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (ICAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18 independent adhesion mechanism. *J Exp Med* 1990;171:1369-74.
69. Wellicome SM, Thornhill MH, Pitzalis C, Thomas DS. A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells is induced by tumor necrosis factor, IL-1 or lipopolysaccharide. *J Immunol* 1990;144:2558-65.
70. Thornhill MH, Haskard DO. IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN gamma. *J Immunol* 1990;145:865-72.
71. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Newman W. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. *J Immunol* 1992;148:1086-92.
72. Miyake K, Medina K, Ishisara K, Kimoto M, Auerbach R, Kincade PW. A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture. *J Cell Biol* 1991;114:557-65.
73. Ryan DH, Nuccie DL, Abboud CN, Winslow JM. Vascular cell adhesion molecule-1 and the integrin VLA-4 mediate adhesion of human B cell precursors to cultured bone marrow adherent cells. *J Clin Invest* 1991;88:995-1004.
74. Marlor CW, Webb DL, Bombara MP. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in fibroblast like synoviocytes after stimulation with tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1992;140:1055-60.
75. Simmons PJ, Masinovsky B, Berenson R, Allatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992;80:388-95.
76. Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993;14:506-12.
77. Banks RE, Gearing AJH. Circulating ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 in human malignancies. *Br J Cancer* 1993;68:122-24.
78. Wong KC. Circulating adhesion molecules in tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1995;94:522-26.
79. Hartung HP. Soluble ICAM-1 serum levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. *Neurology* 1993;43:2331-35.
80. Mrowka C. Detection of circulating adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in Wegener's granulomatosis, systemic lupus erythematosus and chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1995;43:288-96.
81. Lim AG. Soluble E-selectin and VCAM-1 in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1995;22:416-22.

82. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. N Engl J Med 1986;314:488-500.
83. Reiner Z, Tedeschi-Reiner E. New information on the pathophysiology of atherosclerosis. Lijec Vjesn 2001;123:26-31.
84. Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease ?. Immunol Today 1995;16:17-33.
85. Jerzak P. The role of adhesion molecules in the immunopathogenesis of atherosclerosis. Pol Tyg Leg 1994 ;49:357-9.
86. Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. Am J Cardiol 2001;18;88:10K-15K.
87. Link A, Bohm M, Nickenig G. Acute coronary syndrome-better risk stratification by determination of inflammatory parameters? Med Klin 2002;97:63-9.
88. Liuzzo G, Biasucci LM, Callimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. N Engl J Med 1994;331:417-24.
89. Fuster V, Bediman L. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. N Engl J Med 1992;326:242-50.
90. Sluiter W. Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: Their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanism underlying their expression. J Cardiovascular -Pharmacol 1993;22:537-44.
91. Wang-X. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. Atherosclerosis 1995;115:89-98.
92. Gimbrone MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. Am J Cardiol 1995;75:678-708.
93. Jerzak P. The role of adhesion molecules in the immunopathogenesis of atherosclerosis. Pol Tyg Leg 1994; 49:357-59.
94. Bazzino O. Valor pronóstico de la proteína C reactiva en la angina inestable. Rev Esp Cardiol 2001 ;54:1- 6.
95. Yi-Heng Li, Jeng-Kai T, Wei-Chun T, Liang-Miin T, Li-Jen L, Jyh-Hong Ch. Elevation of soluble adhesion molecules is associated with the severity of myocardial damage in acute myocardial infarction. Amer J Cardiol 1997;80:1218-21.
96. Shyu KG, Chang H, Lin CC, Kuan P. Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute coronary syndrome. Chest 1996;77:543-49.

97. Mulvihill N, Foley JB, Ghaisas N, Murphy R, Crean P, Walsh M. Early temporal expression of soluble cellular adhesion molecules in patients with unstable angina and subendocardial myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999;83:1265-67.
98. Xie Y, Zhou T, Shen W, Lu G, Yin T, Gong L. Soluble cell adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome *Chin Med J Engl* 2000;113:286-8.
99. Futterman LG, Lemberg L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. *Am J Crit Care* 2002;11:168-72.
100. Peng DQ, Zhao SP, Li YF, Li J, Zhou HN. Elevated soluble CD40 ligand is related to endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2002;319:19-26.
101. O' Malley T, Ludlam CA, Riemersma RA, Fox KA. Early increase in levels of soluble inter-cellular adhesion molecule-1 (sICAM-1); potential risk factor for the acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2001;22:1226-34.
102. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N. Increased soluble platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 in the early stages of acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2003;90:261-8.
103. Thompson MW, Willard HF, Mclines RR. *Genética en medicina*. 4 ed, Barcelona: Masson SA, 1996: 236-44.
104. Colombo B, Svarch E, Martínez G. *Genética y clínicas de las hemoglobinas humanas*. La Habana; Pueblo y Educación, 1993. p146-185.
105. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The hemoglobinopathies. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7ma ed., vol. III. New York: McGraw-Hill, 1995:3417-84.
106. Serjeant GR. Sickle cell disease. *Lancet* 1997;350:725-30.
107. Forget BG. Anemia de células falciformes y hemoglobinopatías relacionadas. En: La Fayette R, Wyngaarden JB, Smith LH, eds. *Tratado de medicina Interna*. 19th ed. Ciudad México, Interamericana; 1994:1033-9.
108. Bunn HF. Disorders of hemoglobin. En: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Marttin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds *Principles of Internal medicine*. 13 th ed. New York, Mcgraw-Hill; 1994:1734-43.
109. McKusick VA. Mendelian inheritance in man. A catalog of human genes and genetic disorders. 12th ed. Baltimore, The John Hopkins University Press; 1998:818-21.
110. Donaldson A, Thomas P, Serjeant GR. Foetal hemoglobin in homozygous sickle cell disease: a study of patients with low foetal hemoglobin levels. *Clin Lab Haematol* 2001 ;23:285-9.
111. Steinberg MH. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Hemoglobin* 2001 ;25:195-211.
112. Bunn HF. Induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Blood* 1999;93:1787-9.

113. Steinberg MH, Mitchell TE. Novel approaches to treatment of sickle cell anemia. *Expert Opin Drugs* 1999;8:1823-36.
114. Cohen AR. Sickle cell disease: new treatments, new questions. *N Engl J Med* 1998;339:42-4.
115. Reed W, Vichinsky EP. New considerations in the treatment of sickle cell disease. *Annu Rev Medicine* 1998;49:461-74.
116. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1999;340:1021-30.
117. Embury SH, Vichinsky EP. Sickle cell disease. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 3rded New York, NY: Churchill Livingstone; 2000:510-54.
118. Reed W, Walker P, Haddix T, Perkins HA. Acute anemic events in sickle cell disease. *Transfusion* 2000;40:267-73.
119. Nagel RL. The challenge of painful crisis in sickle cell disease. *JAMA* 2001 ;286:2152-3.
120. Cunningham JJ, Houlikan SM, Altay C. Colecystosonography in children with sickle cell disease. *J Clin Ultrasound* 1981;9:231-9.
121. Buchanan GR, Glader BE. Benign course of extreme hyperbilirrubinemia in sickle cell anemia: analysis of six cases. *J Pediatr* 1977;91:21-4.
122. Rosse WF. New views of sickle cell disease. *N C Med J* 1997;58:62-6.
123. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W, et al. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatrics* 1989;84:500-8.
124. Wright J, Thomas P, Serjeant GR. Septicemia caused by Salmonella infection: an overlooked complication of sickle cell disease. *J Pediatr* 1997;130:394-9.
125. Magnus SA, Hambleton IR, Moosdeen F, Serjeant GR. Recurrent infections in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1999;80:537-41.
126. Knight-Madden J, Serjeant GR. Invasive pneumococcal disease in homozygous sickle cell disease: Jamaican experience 1973-1997. *J Pediatr* 2001;138:65-70.
127. Wierenga KJ, Hambleton IR, Wilson RM, Alexander H, Serjeant BE, Serjeant GR. Significance of fever in jamaican patients with homozyogus sickle cell disease. *Arch Dis Child* 2001;84:156-9.
128. Pegelow DH, Wang W, Grange S, Hsu L, Vishinsky E, Moser F, et al. Silent infarts in children with sickle cell anemia and abnormal cerebral artery velocity. *Arch Neurol* 2001;58:2017-21.
129. Adams RJ, Ohene-Frempong K, Wang W. Sickle cell and the brain. *Hematology* 2001 ;302:31-46.
130. KinneyTR, Sleeper LA, Wang AC, Zimmermann RA, Pegelow CH, Ohene-Frmpong K, et al. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. *Pediatrics* 1999;103:640-5.
131. Sharpsteen JR, Powars D, Jhonson C, Rogers ZR, Williams WD, Posch RJ. Multisystem damage associated with tricorporal priapism in sickle cell disease. *Am J Med* 1993;94:289-95.

132. Mohan JS, Vigilance JE, Marshall JM, Hambleton IR, Reid HL, Serjeant GR. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. Clin Sci (London) 2000;98:667-72.
133. Avila P, Jay SJ, Dean D, Neumayr LD, Vishinsky EP. Acute chest syndrome in sickle cell disease. N Engl J Med 2000;343:1336-7.
134. Platt OS. The acute chest syndrome of sickle cell disease. N Engl J Med 2000;342:1904-7.
135. Minter KR, Gladwin MT. Pulmonary complications of sickle cell anemia. A need for increased recognition, treatment and research. Am J Resp Crit Care Med 2001;164:2016-9.
136. Milner PF, Kraus AP, Sebes JL. Sickle cell as a cause of osteonecrosis of the femoral head. N Engl J Med 1991;325:1476-81.
137. Cohen SB, Fletcher MF, Goldberg MF, Jednock N. Diagnosis and management of ocular complications of sickle hemoglobinopathies. Ophthalmic Surg Part 11986;17:357-74.
138. Kinney TR, Ware RE, Schultz WH. Long-term management of splenic sequestration in children with sickle cell disease. J Pediatr 1990;117:194-9.
139. Serjeant GR, Serjeant BE, Thomas PW, Anderson MJ, Patón G, Pattison JR. Human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. Lancet 1993;341:1237-40.
140. Wierenga KJ, Pattison JR, Brink N, Griffiths M, Miller M, Shah DJ, et al. Glomerulonephritis after human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. Lancet 1995;346:475-6.
141. Wierenga KJ, Serjeant BE, Serjeant GR. Cerebrovascular complications and parvovirus infections in homozygous sickle cell disease. J Pediatr 2001;139:438-42.
142. Serjeant BE, Hambleton IR, Kerr S, Kitty CG, Serjeant GR. Haematological response to parvovirus B19 infection in homozygous sickle cell disease. Lancet 2001;358:1779-80.
143. 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.
144. 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.
145. Hedo CC, Akenova YA, Okpala IE. Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. J Inter Med 1993;233:467-70.
146. 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.
147. Akinola NO, Stevens SME, Franklin IM. Subclinical ischaemic episodes during the steady state of sickle cell anaemia. J Clin Pathol 1992;45:902-6.

148. 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.
149. 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.
150. 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.
151. Richardson P, Steingart R. Acute-phase response and sickle crisis. *Lancet* 1993;341:1349.
152. Mohamed AO, Hashim MS, Nilsson UR, Venge P. Increased in vivo activation of neutrophils and complement in sickle cell disease. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:799-803.
153. Mann D, Shumacher HR. Pseudoseptic inflammatory knee effusion caused by phagocytosis of sickled erythrocytes after fracture into knee joint. *Arthritis Rheum* 1995;38:284-7.
154. Humbert JR, Winsor EL, Githens JM, Schmitz JB. Neutrophil dysfunctions in sickle cell disease. *Biomed Pharmacoterl* 1990;44:153-8.
155. Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Miresluis AR, Dumonde DC, Phillips J, et al. Blood polymorfonuclear 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.
156. Picker LJ, Siegelman MH. Lymphoid Tissues and Organs. En: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology* 3rd ed. New York. Raven Press 1993:145-97.
157. Test ST, Woolworth VS. Defective regulation of complement by sickle cell erythrocyte: evidence for a defect in control of membrane attack complex formation. *Blood* 1994;83:842-52.
158. Anyaegbu CC, Okpala IE, Akenova AY, Salimonu LS. Complement activity, circulating immune complexes and the morbidity of sickle cell anemia. *APMIS* 1999;107:699-702.
159. 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.
160. Rivero R, Macias C, del Valle L, Lorigados L, Inclán G, Aranda RE, et al. Alteraciones inmunológicas en la anemia drepanocítica. *Sangre* 1991;36:15-20.
161. Donadi EA, Falcao RP. Are the changes of lymphocytes subsets in sickle cell anemia due to the loss of splenic function? *Acta Haematol* 1988;80:91-4.
162. Rivero R, Macias C, del Valle L, Lorigados L, Inclán G, Espinosa E, et al. Inmunodeficiencia celular asociada a la anemia drepanocítica. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter* 1991;7:80-7.
163. Glassman AB. Lymphocyte blast transformation and peripheral lymphocyte percentages in patients with sickle cell disease. *Am Clin Lab Sci* 1980;10:9-17.

164. Kaplan J, Sarmaik SH, Levy J. Transfusion induce immunologic abnormalities not related to AIDS virus. *NenglJMed* 1985;313:1227.
165. Falcao RP, Donadi EA. Infection and immunity in sickle cell disease. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1989;35:70-4.
166. Fraker PJ, Gershur ME, Good RA, Prasad A. Interrrelationships between zinc and immune function. *Fed Proc* 1986;45:1474-9.
167. Mohapatra BN, Dash BP, Kar BC. Serum immunogloublins in sickle cell disease. *J Assoc Physicians India* 1993;41:418-9.
168. Hedo C, Akenova Y, Okpala I, Salimonu L. Serum immunoglobulin (G, A and M) classes and IgG subclasses in sickle cell anaemia. *APMIS* 1993;101:353-57.
169. Hernández P, Carnot J, Cruz C, Dorticós E, espinosa E, González A et al. Circulating immune complexes in sickle cell hepatic crisis. *Acta Haematol* 1981;65:15-20.
170. Villaescusa R, Santos MN, Espinosa E, hernández P. Circulating immune complexes in sickle cell anemia. *Haematol* 1986;19:185-91.
171. Serjeant GR. The Spleen. En: Serjeant GR, ed. *Sickle Cell Disease* 2nd ed. New York. Oxford University Press. 1992:135-52.
172. Kucuk O, Gilman-Sachs A, Beaman K, Lis LJ, Westerman MP. Antiphospholipid antibodies in sickle cell disease. *Am J Hematol* 1993;42:380-3.
173. De Ceulaer K, Khamashta MA, Harris EN, Serjeant GR, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies in homozygous sickle cell disease. *Ann Rheum Dis* 1992;51:671-2.
174. Westerman MP, Green D, Gilman-Sachs A, Beaman K, Freels S, Boggio L, et al. Antiphospholipid antibodies, protein C and S and coagulation changes in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1999;134:352-62.
175. Graido-Gonzalez E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, Mcmillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood* 1998;92:2551-55.
176. Chappey O, Wautier Pepin MP, Wautier JL. Adhesion of erythrocytes to endothelium in pathological situations: a review article. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994;36:281-88.
177. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997; 99:2561- 64.
178. Daniels G. Functional aspects of red cell antigens. *Transfusion Medicine* 1999;13:14-35.
179. 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.

180. Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood* 1996;10:29-44.
181. 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.
182. Balias SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North America* 1996;10:1221-38.
183. Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Hebbel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood* 2001;97:1937-41.
184. 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.
185. 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.
186. Duits AJ, Rojer RA, van Endt T, MacGillavry MR, ten Cate H, Brandjes DP, et al. Erythropoiesis and serum sVCAM-1 levels in adults with sickle cell disease. *Ann Hematol*, 2003;82:171-4.
187. Garraty G, Telen MJ, Petz LD. Red cell antigens as functional molecules and obstacles to transfusion. *Hematology* 2002;:445-62
188. Koch AE, Burrows JC, Haines GK, Carlos TM, Harlan JM, Leibovich SJ. Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest* 1991;64:313-20.
189. Kobayashi S, Hashino S, Tanaka J, Mori A, Kobayashi M, Asaka M, et al. Increased adhesion molecule expression during graft versus host disease. *Transplant Proc* 2000;7:2452-3
190. Buckley CD, Simmons DL. Cell adhesion: a new target for therapy. *Mol Med Today* 1997;:449-56.
191. Schror K. Anti-integrins-new platelet function inhibitors for therapy and prevention of acute coronary syndrome. *Wien Klin Wochenschr* 1999;111:90-7.
192. Schneider MK, Strasser M, Gilli UO, Kocher M, Moser R, Seebach JD. Rolling adhesion of human NK cells to porcine endothelial cells mainly relies on CD49d-CD106 interactions. *Transplantation* 2002; 73:789-96.
193. Rezaei Kalantari H. How I treat....sickle cell anemia: current therapies. *Rev Med Liege* 2001 ;56:671-5.
194. Saleh AW, Hillen HF. Pharmacological induction of foetal haemoglobin synthesis in sickle-cell disease. *NethJMed* 1997;51:619-78.
195. Rogers ZR. Hydroxyurea therapy for diverse pediatric populations with sickle cell disease. *Semin Hematol* 1997;34:42-7.

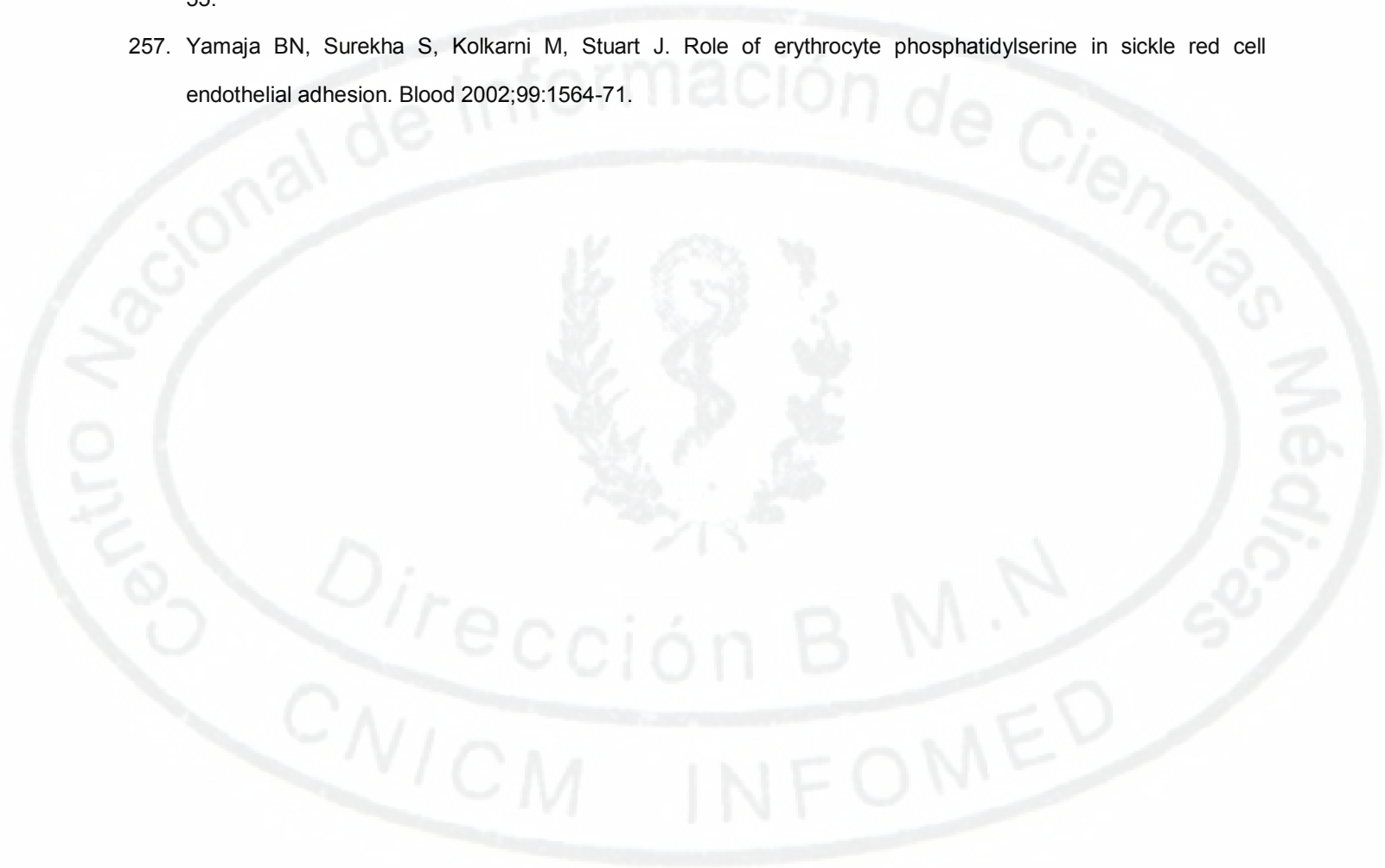
196. Saleh AW, Hillen HF, Duits AJ. Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol* 1999;102:31-7.
197. Styles LA, Lubin B, Vichinsky E, Lawrence S, Hua M, Test S, et al. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. *Blood* 1997;89:2554-9.
198. Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, Fay M, Vilmer E, Elion J, et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H(2)O(2) production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood* 2002;99:2297-303.
199. Schnog JJ, Lard LR, Rojer RA, Van der Dijs FP, Muskiet FA, Duits AJ. New concepts in assessing sickle cell disease severity. *Am J Haematol* 1998;58:61-6.
200. Vichinsky E. New therapies in sickle cell disease. *Lancet* 2002;360:629-31.
201. Matsui NM, Varki A, Embury SH. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. *Blood* 2002;100:3790-6.
202. Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Hebbel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood* 2001;97:1973-41.
203. Telen MJ. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Semin Hematol* 2000;37:130-42.
204. Sánchez Madrid F, de Landázuri MO, Morago G, Cebrián M, Acevedo A, Bernabeu C. VLA 3: a novel polypeptide association within the VLA 4 molecular complex: cell distribution and biochemical characterization. *Eur J Immunol* 1986;16:1343-9.
205. Sánchez Madrid F, Cebrián M, de Landázuri MO, Serra C, Engel P, Vives J, et al. Report of the IV International Workshop on Leukocyte Differentiation Antigens (Vienna, 1989). *Inmunología* 1989;8:35.
206. Perussia B, Ramoni C, Anegón I, Cuturi MC, Faust J, Trinchieri G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B Lymphoblastoid cells lines. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1987;6:171-88.
207. Aramburu J, Balboa MA, Ramirez A, Silva AA, Sanchez-Madrid F, de Landazuri MO, et al. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor γ 8 + T lymphocytes. *J Immunol* 1990;144:3238-47.
208. Campanero MR, Pulido R, Ursa M, Rodríguez M, de Landázuri MO, Sánchez- Madrid F. An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism LFA-1/ ICAM-1 independent, triggered through the human VLA-4 integrin. *J. Cell Biol.* 1990;110:2157-65.

209. Keizer GD, Visser W, Vliem M, Figdor CG. A monoclonal antibody (NKI L16) directed against a unique epitope on the α chain of human leukocyte function associated antigen I induces homotypic cell cell interactions. *J Immunol* 1988; 140(5): 1393-400.
210. Postigo AA, Pulido R, Campanero MR, Acevedo A, García-Pardo A, Corbi AL, et al. Differential expression of VLA-4 integrin by resident and peripheral blood human B lymphocytes. Acquisition of functional active $\alpha 4\beta 1$ -fibronectin receptors upon Bcell activation. *Eur J Immunol* 1991;21:2437-45.
211. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc Res* 1997;35:2-3.
212. Branch DR. 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- 58.
213. Tsudo M, Goldman CK, Bongiovanni KF, Chan WC, Winton EF, Yagita M, et al. The P75 peptide is the receptor for interleukin 2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin 2 activation of these cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5394-8.
214. Muñoz M, Serrador J, Sánchez-Madrid F, Teixidó J. A region of the integrin VLA $\alpha 4$ subunit involved in homotypic cell aggregation and in fibronectin but not vascular cell adhesion molecule-1 binding. *J Biol Chem* 1996;271:2696-702.
215. Chiu HH, Crowe DT, Renz ME, Presta LG, Jones S, Weissman IL, et al. Similar but nonidentical aminoacid residues on vascular cell adhesion molecule-1 are involved in the interaction with $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$ under different activity states. *J Immunol* 1995;155:5257-67.
216. Schiffer SG, Hemler ME, Lobb RR, Tizard R, Osborn L. Molecular mapping of functional antibody binding sites of $\alpha 4$ integrin. *J Biol Chem* 1995;270:14270-3.
217. Dustin M, Springer TA. T cell receptor cross linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989;341:619-24.
218. Lo SK, Van Seventer GA, Levin SM, Wright SD. Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J Immunol* 1989;143:3325-9.
219. Di Minno G, Thiagarajan P, Perussia B, Martínez J, Shapiro S, Trinchieri G, et al. Exposure of platelet fibrinogen-binding sites by collagen, arachidonic acid, and ADP: Inhibition by a monoclonal antibody to the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1983;61:140-8.
220. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin Signalling: The Platelet Paradigm. *Blood* 1998;91:2645-57.

221. Herzberg F, Schoning M, Schirner M, Toop M, Thiel E, Kreuser ED. IL-4 and TNF alpha induce changes in integrin expression and adhesive properties and decrease the lung-colonizing potential of HT-29 colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:165-75.
222. Pulido R, Campanero MR, Garcia Pardo A, Sánchez Madrid F. Structure-function analysis of the human integrin VLA-4 epitopes and sites of ligand interaction. *FEBS Lett* 1991 ;294:121-4.
223. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:549-99.
224. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways. The road taken. *Science* 1995;268:233-9.
225. Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:76- 85.
226. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: Roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996; 135:163342.
227. Diamond MS, Springer TA. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* 1994;4:506-17.
228. Matsumoto G, Omi Y, Lee U, Nishimura T, Shindo J, Penninger JM. Adhesion mediated by LFA-1 is required for efficient IL-12 induced NK and NKT cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2000;30:3723-31.
229. Kwiatkowski B, Artrip JH, Michler RE, Itescu S. Human NK cells demonstrate increased adherence and lysis of porcine endothelium following activation with IL-2. *Ann Transplant* 1997;2:21-5.
230. Lehmann C, Zeis M, Uharek L. Activation of natural killer cells with interleukin 2(IL-2) and IL-12 increase perforin binding and subsequent lysis of tumour cells. *Br J Haematol* 2001 ;114:660-5.
231. Komatsu F, Kajiwar M. Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells. *Oncol Res* 1998;10:483-9.
232. Wallen NH, Held C, Rehnquist N, Hjemdahl P. Elevated serum intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 among patients with stable angina pectoris who suffer cardiovascular death or non-fatal myocardial infarction. *Eur Heart J* 1999;20:990-1.
233. Ghaisas NK, Shahi CN, Foley B, Murphy R, Crean P, Walsh M. Elevated levels of circulating soluble adhesion molecules in peripheral blood of patients with unstable angina. *Am J Cardiol* 1997;80:617-9.
234. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Curtin R, Crean PA , Walsh M. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using adhesion molecules. *Heart* 2001;85:623-27.
235. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M. Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1210-16.

236. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84:2068-2101.
237. Kinlay S, Selwyn AP, Libby P, Ganz P. Inflammation, the endothelium, and the acute coronary syndromes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:S62-6.
238. Ikeda U, Takahashi M, Shimada K. Monocyte-endothelial cell interaction in atherogenesis and thrombosis. *Clin Cardiol* 1998;21:11-4.
239. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991;147:3788-93.
240. Koskinen PK, Lemstrom. Adhesion Molecule P-Selectin and Vascular Cell Adhesion molecule-1 in enhanced heart allograft arteriosclerosis in the rat. *Circulation* 1997;95:191-6.
241. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary Plaque Disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
242. Hakkert BC, Kuipers TW, Leeuwenberg JFM, Van Mourik JA, Ross D. Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1, VLA-4. *Blood* 1991;78:2721-26.
243. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;91:379-87.
244. Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Phillips ML, Rosenbloom CL, Cruz R, et al. E-selectin in focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:1126-36.
245. Lucchesi BR, Werns SW, Fantone JC. The role of the neutrophil and free radicals in ischemic myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21:1241-51.
246. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D et al. Clinical and Angiographic correlates leukocyte activation in Unstable Angina. *JACC* 1995; 26:1146-50.
247. Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets possible role in the development of cardiovascular injury. *Br Heart J* 1995;74:625-30.
248. Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin -ip in patients with coronary artery disease. *Heart* 1996;76:24 -28.
249. Pober JS, Gimbrone MA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J Immunol* 1986;243:1160-65.
250. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-78.
251. Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P et al. Evidence for time dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation* 1994;90:1662-68.
252. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Attamura S, Caliguri G, Monaco C et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94:874-77.

253. Dover GJ. SS disease is not a single gene disorder. *Blood* 2002;100:4255.
254. Taylor VIJG, 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.
255. 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.
256. Luty GA, Taomoto M, Cao J, McLeod DS, Vanderslice P, McIntyre BW, Fabry ME, Nagel RL. Inhibition of TNFa induced sickle RBC retention in retina by a VLA-4 antagonist. *Invest Ophthalmlo Vis Sci* 2001;42:1349-55.
257. Yamaja BN, Surekha S, Kolkarni M, Stuart J. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell endothelial adhesion. *Blood* 2002;99:1564-71.



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Moléculas de adhesión

VLA-4; antígeno 4 de activación tardía

LFA-1; antígeno 1 de función leucocitaria

Mac-1; molécula de citoadhesión celular 1 de monocitos y macrófagos ICAM-1; molécula de adhesión intercelular 1 VCAM-1; molécula de citoadhesión vascular 1 Lu; Lutheran NCAM-1; molécula de citoadhesión neural 1

PECAM-1; molécula de citoadhesión endotelial plaquetaria

MadCAM-1; molécula de citoadhesión adresina mucosal 1

ELAM-1; molécula de adhesión leucocitaria endotelial 1 (corresponde con L-selectina)

GlyCAM-1; molécula de citoadhesión celular glicoproteica 1

PSGL-1; ligando glicoproteico específico de P-selectina

ESL-1; ligando específico de E-selectina

VAP-1; proteína de adhesión vascular 1

CLA-1; antígeno linfocitario cutáneo 1

JAM; molécula de adhesión de unión humana

INCAM-110; molécula de adhesión celular inducible 110 (corresponde con VCAM-1)

IgSF; superfamilia de las inmunoglobulinas

Otros receptores y ligandos

IL2R; receptor de interleucina 2

CS1 y CS2; fragmentos peptídicos de la fibronectina

FN; fibronectina

VNR, receptor de la vitronectina

RCT; receptor de las células T

KIRs; receptores similares a las inmunoglobulinas de las células citotóxicas

LIRs; receptores leucocitarios similares a las inmunoglobulinas

ITIMs; motivos inhibitorios de tirosina en inmunorreceptores

ITAMs; motivos activadores de tirosina en inmunorreceptores

NCRs; receptores de citotoxicidad natural

Tipos celulares

NK; células citotóxicas naturales o espontáneas

LAK; células citotóxicas activadas por linfocinas

TIL; linfocitos infiltrantes de tumores

Mediadores solubles

IL; interleucina

IL2r; interleucina 2 recombinante

PAF; factor de activación plaquetario

MCP-1; proteína quimiotáctica del macrófago 1

EDRF; factor relajante derivado del endotelio

PDGF; factor de crecimiento derivado de plaquetas

MCSF; factor estimulador de colonias de macrófagos

TGF; factor de crecimiento transformante

GM-CSF; factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos

TNF; factor de necrosis tumoral

INF; interferón

Otras

AcMos; anticuerpos monoclonales

IAM; infarto agudo de miocardio

AI; angina inestable

SP; sangre periférica

CVOD; crisis vasooclusivas dolorosas

SCA; síndrome coronario agudo

AD; anemia drepanocítica

SPH; sistema principal de histocompatibilidad

TH; células T auxiliaadoras o cooperadoras

LDL; lipoproteínas de baja densidad

C3b_i; componente C3b del complemento inactivado

PKC; proteína quinasa C

VEH; vénulas endoteliales altas

HP; Hospital de la Princesa (Madrid, España)

SFB; suero fetal bovino

CMN; células mononucleares

CK; enzima creatin kinasa

CK-MB; isoenzima de la CK

TGO; enzima transaminasa glutámico-oxalacética



ANEXOS

ANEXO 1

CONSTANCIA DE PARTICIPACION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:

El que suscribe:

_____ está de
acuerdo con ser incluido en el estudio de ANEMIA DREPANOCITICA Y MOLECULAS DE ADHESION.

Así mismo estoy de acuerdo que se me practiquen las investigaciones clínicas, de laboratorio y la toma de
muestras que se requiera. Para dar este consentimiento he recibido una explicación amplia del
médico: _____ que me ha informado lo siguiente:

La anemia drepanocítica o sicklemlia, es una enfermedad, que se caracteriza por anemia hemolítica crónica que
evoluciona por crisis y por múltiples complicaciones sistémicas, siendo la oclusión vascular el factor esencial en la
enfermedad y la mortalidad de quienes la padecen. Se me explicó que si se diagnostica en un individuo y se le
pone tratamiento, éste puede mejorar sus síntomas pero sin llegar a curarse de esta enfermedad y que es de
interés profundizar en el estudio de la misma, lo cual pudiera determinar un nuevo rumbo en la evolución y
tratamiento habitual.

De igual forma se me explicó que para el estudio es necesario realizar una extracción de sangre en la consulta de
seguimiento de mi enfermedad o en el cuerpo de guardia del Instituto de Hematología e Inmunología si presento
una crisis vasooclusiva.

He conocido que de mi participación en este estudio no obtendré ventaja alguna, excepto la de un posible
diagnóstico de la presencia de la crisis y un tratamiento específico posterior a ello. Tengo además el derecho de
conocer los resultados que se obtengan en la investigación.

Es mi deber informar a los investigadores de este proyecto cualquier cambio en mi estado de salud por
insignificante que parezca o cualquier tratamiento que reciba.

Mi consentimiento es absolutamente voluntario y el hecho de no aceptar no tendrá consecuencia alguna en mis
relaciones con el hospital o con los médicos que me atienden, los que continuarán asistiéndome según las normas
de conducta habitual de esta instalación hospitalaria y de nuestra sociedad.

En cualquier momento puedo retirarme del estudio, sin que sea necesario explicar las causas y esto tampoco afectará mi relación con los médicos del hospital.

Y para que así conste y por mi libre voluntad, firmo el presente consentimiento a los -----días del mes de _____ del _____ .

Nombre del paciente: _____

Firma: _____



ANEXO 2

CONSTANCIA DE PARTICIPACION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:

El que suscribe:

_____ está de

acuerdo con ser incluido en el estudio de CARDIOPATIA ISQUEMICA Y MOLECULAS DE ADHESION.

Así mismo estoy de acuerdo que se me practiquen las investigaciones clínicas, de laboratorio y la toma de muestras que se requiera. Para dar este consentimiento he recibido una explicación amplia del

médico: _____ que me ha informado lo siguiente:

La cardiopatía isquémica, es una enfermedad que presenta diferentes formas de manifestación clínica como son la angina estable, inestable y en algunos casos puede llegar al infarto agudo de miocardio, por lo que el seguimiento del tratamiento indicado por el médico de asistencia es esencial en la evolución de la enfermedad y la mortalidad de quienes la padecen. Se me explicó que si se diagnostica en un individuo y se le pone tratamiento, éste puede mejorar sus síntomas pero sin llegar a curarse de esta enfermedad y que es de interés profundizar en el estudio de la misma, lo cual pudiera determinar un nuevo rumbo en la evolución y tratamiento habitual.

De igual forma se me explicó que para el estudio es necesario realizar una extracción de sangre de acudir al cuerpo de guardia del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular con angina inestable o infarto agudo de miocardio en el momento del diagnóstico y 10 días después.

He conocido que de mi participación en este estudio no obtendré ventaja alguna inmediata, excepto la del diagnóstico y un tratamiento específico posterior a ello. Tengo además el derecho de conocer los resultados que se obtengan en la investigación.

Es mi deber informar a los investigadores de este proyecto cualquier cambio en mi estado de salud por insignificante que parezca o cualquier tratamiento que reciba.

Mi consentimiento es absolutamente voluntario y el hecho de no aceptar no tendría consecuencia alguna en mis relaciones con el hospital o con los médicos que me atienden, los que continuarán asistiéndome según las normas de conducta habitual de esta instalación hospitalaria y de nuestra sociedad.

En cualquier momento puedo retirarme del estudio, sin que sea necesario explicar las causas y esto tampoco afectará mi relación con los médicos del hospital.

Y para que así conste y por mi libre voluntad, firmo el presente consentimiento a los----- días del mes de _____ del _____ .

Nombre del paciente: _____

Firma: _____



Expression and functional activity of the very late activation antigen-4 molecule on human natural killer cells in different states of activation

C. MACIAS, J. M. BALLESTER & P. HERNANDEZ *Immunology Department, Institute of Hematology and Immunology, Habana, Cuba*

SUMMARY

In the present study we describe the expression and functional activity of the $\alpha_4\beta_1$ heterodimer molecule on human natural killer (NK) cells. Flow cytometric analyses showed that fresh and activated NK cells expressed high levels of very late activation antigen-4 (VLA-4) molecules. These cells bound to fibronectin (FN) and to its 38 000-MW proteolytic fragment through the VLA-4 integrin that was blocked with HP2/1 anti- α_4 monoclonal antibodies (mAbs) and with the FN peptide fragment CS1. No inhibitory effects were observed in the presence of anti- α_5 mAb, FN peptide fragment CS2 or other irrelevant mAb. Fresh NK cells were unable to aggregate, despite their expression of VLA-4, and only activated (cultured and lymphocyte-activated killer cells) NK cells showed homotypic aggregation with HP 1/7 and HP2/4 anti- α_4 mAb related to cellular activation. These results underline new evidence of how NK cells in different states of activation maintain different constitutive levels of $\alpha_4\beta_1$ integrin activity, and highlight the possibility of a different functional regulation by the cells bearing VLA-4, in the expression of these epitopes and their ability to interact with their ligands.

INTRODUCTION

Discovery of several cell-surface receptors involved in cell-cell, cell-substrate, or cell-soluble ligand binding has been a key factor in understanding the mechanisms underlying inflammatory and immune phenomena.^{1,2}

The integrin family of adhesion receptors includes at least 16 different $\alpha\beta$ heterodimers divided into three subfamilies. In general, integrins in the β_1 subfamilies (very late activation antigen [VLA] proteins) and β_3 subfamilies have been found to mediate cell adhesion to extracellular matrix components such as fibronectin (FN), collagen and laminin. In contrast to other β_1 integrins, VLA-4 exhibits cell-cell adhesion function.^{3,4}

VLA-4 molecules exist in multiple structural forms that are not seen in other integrins.⁵ Hence, the VLA-4 structural variations and functional diversity are currently under investigation. In lymphocytes, VLA-4 has been shown to mediate cell-cell interactions, homotypic aggregation, heterotypic cellular interaction, and to be a homing receptor. Thus, VLA-4 has been shown previously to be involved in effector target cell association during cytolytic T-lymphocyte-mediated killing based on the inhibitory effect exerted by anti VLA-4

monoclonal antibody (mAb) on this activity. Similarly, anti VLA-4 mAb was also suggested to block heterotypic interaction between helper and suppressor cells.⁸⁻¹⁰ mAbs specific for the lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 α -subunit and VLA-4 α -epitopes have been shown to trigger homotypic leucocyte interactions.^{11,12}

Although VLA-4 is known to be expressed by activated human natural killer (NK) cells,¹³ as far as we know, data are not available that compare the expression and function of VLA-4 in resting and activated human NK cells. In this current study we present our results from investigation of these matters.

MATERIALS AND METHODS

Monoclonal antibodies

B73.1 (anti-CD 16) (kindly provided by Dr Perussia, Kimmel Cancer Institute, Philadelphia, PA); Leu-19 (anti-CD56) and B1 (anti-B) (from Becton Dickinson Corp., Mountain View, CA) were used. The following mAbs, culture supernatants and ascitic fluid were also used: 3B1 (anti-Kp43) (kindly provided by Prof. López-Botet, La Princesa Hospital, Madrid, Spain); SPV-T3b (anti-CD3), TS2/18 (anti-CD2); HP2/1, HP1/7 and HP2/4 (anti-CD49d); TS2/16 (anti-CD29); W6/32 (anti-human leucocyte antigen [anti-HLA] A,B); TS1/11 (anti-CD11a); TS1/18 (anti-CD 18); RR1/1 (anti-CD54); P1D6 (anti- α_5) (kindly provided by Prof. Sánchez-Madrid, Department of Immunology, La Princesa Hospital, Madrid, Spain); and P3-

Received 2 August 1999; revised 10 November 1999; accepted 1 December 1999.

Correspondence: C. Macias, Immunology Department, Institute of Hematology and Immunology, P.O. Box 8070, Ciudad de la Habana, CP 10800, Cuba.

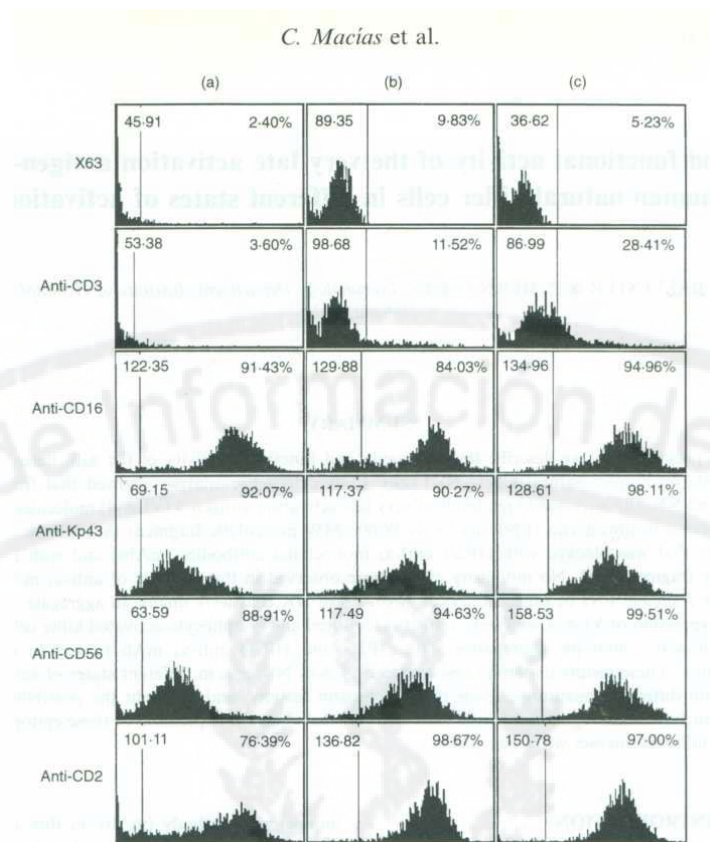


Figure 1. Flow cytometry histograms of purified human fresh natural killer (NK) (a) and cultured NK cells before (b) and after (c) incubation with interleukin-2 (IL-2) (20-50 U/ml) for 3 days (lymphocyte-activated killer [LAK] cells) labelled with P3-X63 immunoglobulin G1 (IgG1) myeloma culture (10 (ig/ml) as a negative control, anti-CD3 (SPV-T3b) (10 (ig/ml), anti-CD16 (B73.1) (10 (ig/ml), anti-Kp43 (3B1) (10 (ig/ml), anti-CD56 (Leu19) (10 ng/ml) and anti-CD2 (TS2/18) (10 (ig/ml). The mean fluorescence intensity of each histogram is shown in the upper left corner and the percentage of positive cells is shown in the upper right corner. The x-axis represents the log fluorescence intensity and the y-axis represents cell number.

X63 IgG1 myeloma culture supernatant, which was included as a negative control.

The anti-VLA-4 HP antibodies used in this study were originally reported to recognize distinct epitopes of a novel association within VLA-4.¹⁴ Further detailed comparative biochemical and cell distribution studies of HP mAb, with respect to other anti VLA-4 reagents of the *IV Leukocyte Differentiation Antigen Workshop*, have demonstrated their specificity for the VLA-4 (CD49d) integrin.¹⁵

Cell line

The Daudi B-lymphoblastoid cell line (LCL) was maintained in culture in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Flow Laboratories, Rockville, MD).

Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized venous blood of 10 normal volunteers by

density-gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden).

Fresh NK cell populations were obtained following removal of adherent cells on plastic flasks (Costar, Cambridge, UK) at 37° for 1 hr, depletion of B cells through a nylon-wool column and further depletion of CD3⁺ lymphocytes with anti-CD3 mAb plus rabbit complement (Behring, Marburg, Germany).

Activated NK cells were prepared as previously described by Perussia *et al.*⁶ Briefly, peripheral blood lymphocytes (PBL) were cultured with the irradiated (5 Gy) Daudi LCL for 7-10 days (3:1, PBL:Daudi; 7-5x10⁵ PBL/ml in RPMI-1640+10% FCS in a final volume of 2 ml) in 24-well tissue-culture plates (Costar, Cambridge, MA), in a 5% CO₂ humidified atmosphere, and further depleted of CD3⁺ lymphocytes with anti-CD3 mAb + rabbit complement (Behring). These cultured cells were maintained in culture for 3 days in RPMI-1640 containing recombinant interleukin-2 (rIL-2) (20-50 U/ml) (LAK cells) (activated NK cells). The purity of

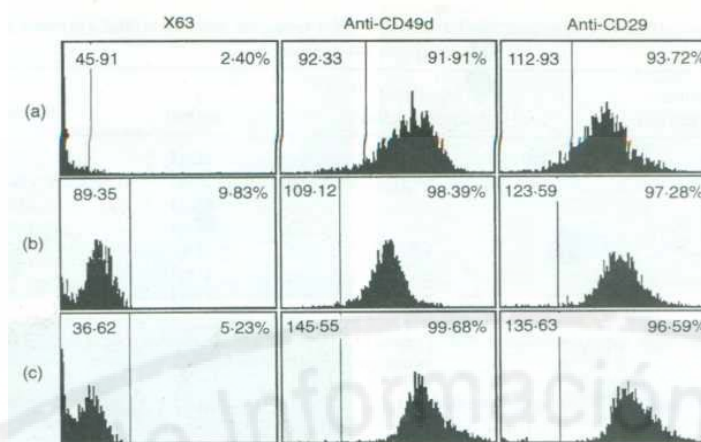


Figure 2. Flow cytometry histograms of purified human natural killer (NK) cells labelled with anti- α 14 HP2/1 (10 μ g/ml), anti- α 16 TS2/16 (10 μ g/ml) monoclonal antibodies (mAbs) and P3-X63 immunoglobulin G1 (IgG1) myeloma culture (10 ng/ml) as a negative control. Fresh (a) and cultured NK cells before (b) and after (c) incubation in the presence of interleukin-2 (IL-2) (20–50 U/ml) for 3 days (lymphocyte-activated killer [LAK] cells). The mean fluorescence intensity of each histogram is shown in the upper left corner and the percentage of positive cells is shown in the upper right corner. The x-axis corresponds the logarithmic fluorescence intensity and the y-axis represents to cell number.

each cell preparation (fresh, cultured and LAK cells) was checked separately by flow cytometric analyses.

Flow cytometry

Phenotyping of cell populations was performed using the following mAbs: B73.1 (anti-CD16), Leu 19 (anti-CD56), B1 (anti-B), 3B1 (anti-Kp43), TS2/18 (anti-CD2) and SPV-T3b (anti-CD3), and the expression of CD49d and CD29 chains was studied in purified fresh and activated NK cells using the following mAbs: HP2/1, HP1/7, HP2/4 and TS2/16, with indirect immunofluorescence determined by flow cytometric analyses on an EPICS-C cytofluorimeter (Coulter Scientific, Harpenden, UK) as described previously;¹⁷ and P3 x 63 immunoglobulin G1 (IgG1) myeloma culture supernatant, which was included as a negative control.

Fluorescence data were collected on a log scale and were converted to a linear scale for quantitative estimation. Specific relative fluorescence was obtained by subtracting background linear fluorescence produced by the negative control myeloma P3 x 63. The percentage of positive cells was taken as the value obtained following subtraction of the percentage of control X63 from the value obtained with every specific marker.

Aggregation assays

To examine the possible role of VLA-4 in homotypic NK interactions, we assayed an extensive panel of anti-VLA-4 mAb to evaluate their ability to induce homotypic cell aggregation. The induction of homotypic cell aggregation was assayed using a suspension of NK cells washed twice with RPMI-1640 + 10% FCS and resuspended to a concentration of 2×10^6 cells/ml. Fifty microlitres of cell suspension was added to each well of a flat-bottomed microtitre plate (Costar). Fresh NK and activated (cultured and LAK) cells were incubated in the presence of 500 U/ml and 10 U/ml of IL-2, respectively. Then, 10 μ l of appropriate mAb culture supernatant, purified mAb or its corresponding F(ab')₂ and Fab fragments were

added to give a final concentration of 10 μ g/ml. Finally, wells were filled with complete medium to a final volume of 100 μ l per well. Cells were incubated for 72 hr at 37° in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The aggregation was determined at 4, 24 and 48 hr by at least two independent observers using an inverted microscope, as previously described.¹² For quantitative measurement of cell aggregation, a modification of the method described by Keizer *et al.*¹ was used. Cells were seeded in flat-bottomed microtitre plates as described above. The number of free cells was counted by using a special mask, consisting of squares (0.5 mm) under the plate.¹² Within each well, at least five randomly chosen areas were counted, after which the mean and the total number of free cells in each well were calculated. Per cent aggregation was determined using the following equation:

% Aggregation = $100 \times [1 - (\text{no. of free cells}) / (\text{total number of cells})]$ The experiments were carried out in duplicate and the SD within each experiment was always < 10%. Cell homotypic aggregation on NK cells (fresh and activated NK cells) during culture was considered to have occurred when the cellular aggregation was > 20%, which represented an evident aggregation. To ascertain whether cell aggregation in the presence of rIL-2 was functionally related to the LFA-1/intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) molecular adhesion pathway, cross-blocking cell-adhesion experiments were carried out by using, as inhibitors, mAbs specific for the LFA-1 complex (TS1/11, anti-CD 11a; TS1/18, anti-CD18; and RR1/1, anti-ICAM-1) and to ascertain whether the VLA-4 molecule induced homotypic cell aggregation, VLA-4 HP antibodies, HP2/1, HP2/4 and HP1/7 (anti- α 4) were added to each well using, as inhibitors, mAbs specific for the LFA-1 complex. The mAb against Fc fragment IgG (10 μ g/ml) was included as an inhibitor for cross-linking mAbs.

Cell attachment assays

As VLA-4 has been previously reported to act as a receptor for

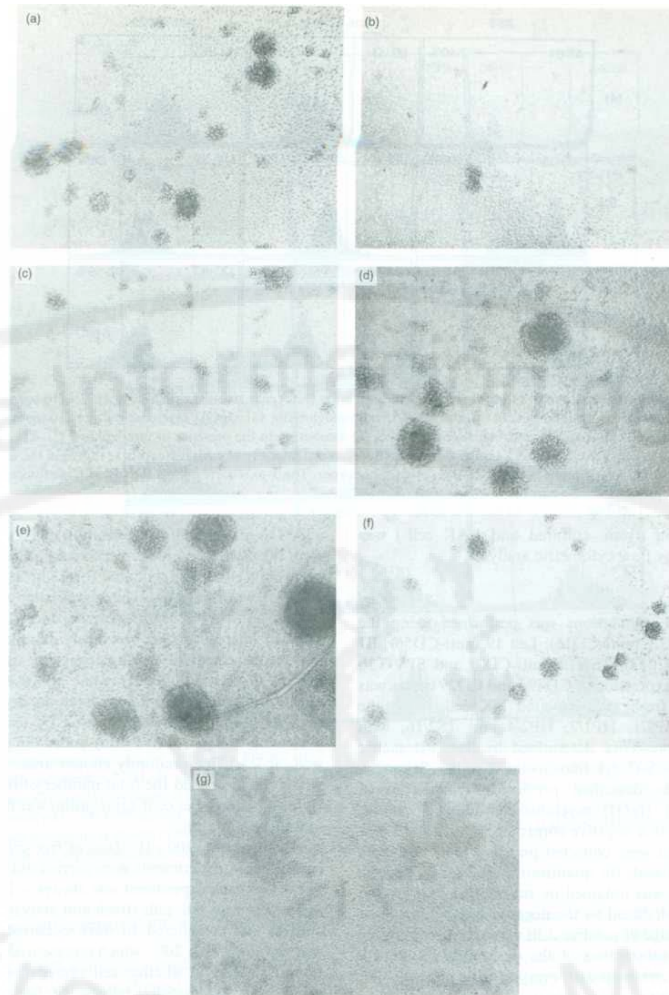


Figure 3. Lymphocyte-activated killer (LAK) cells (30% aggregation) in the presence of interleukin-2 (IL-2) (10 U/ml) after 4 hr (a). Non-aggregated LAK cells in the presence of monoclonal antibodies (mAbs) directed against the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) complex (CD11a + CD18) (10 μg/ml) and IL-2 (10 U/ml) after 4 hr (b). Non-aggregated fresh natural killer (NK) cells in the presence of anti-α_L mAb (HP 1/7) (10 μg/ml), inhibitor mAbs for the LFA-1 complex and IL-2 (500 U/ml) after 4 hr (c). Cell aggregation (60%) induced on LAK cells by anti-α_L mAb (HP1/7) (10 ng/ml) in the presence of mAbs directed against the LFA-1 complex (anti-CD11a + anti-CD18) and IL-2 (10 U/ml) after 4 hr (d). Cell aggregation (70%) induced on cultured cells by anti-α_L mAb (HP2/4) (10 ng/ml) in the presence of mAbs directed against the LFA-1 complex (anti-CD11a + anti-CD18) and IL-2 (10 U/ml) after 4 hr (e). Non-aggregated LAK cells (15% aggregation) in the presence of mAbs directed against the LFA-1 complex (anti-CD11a + anti-CD18), non-aggregating very late activation antigen-4 (VLA-4) mAb (HP2/1) (10 μg/ml) and IL-2 (10 U/ml) after 4 hr (f). Non-aggregated LAK cells in the presence of mAbs directed against the LFA-1 complex (CD11a + CD18) (10 μg/ml), non-binding isotype-control antibody and IL-2 (10 U/ml) after 4 hr (g). A mAb against Fc fragment IgG (10 ng/ml) was included as an inhibitor for cross-linking mAbs. Cell homotypic aggregation on NK cells (fresh and activated NK cells) during culture was considered to have occurred when the cellular aggregation was >20%, which represented an evident aggregation. Photomicrographs were taken 4 hr after the start of the assay. Bar, 250 μm

Table 1. Effect of different anti-very late activation antigen-4 (anti-VLA-4) (CD49d) monoclonal antibodies (mAbs) on natural killer (NK) homotypic aggregation

mAb	CD	Isotype	Inhibition of cell aggregation*	Induction of cell aggregation*	VLA-4 epitope†
HP1/7	CD49d	IgG1	—	+	A
HP2/1	CD49d	IgG1	—	—	B1
HP2/4	CD49d	IgG1	—	+	B2
TS2/16	CD29	IgG1	—	—	
TS1/11	CD11a	IgG1	+	—	
TS1/18	CD18	IgG1	+	—	
RRI/1	CD54	IgG1	+	—	

*Inhibition or induction of cell aggregation was estimated after 48 hr of culture at 37°, as described in the Materials and methods. †VLA-4-c<4 epitopes are as previously described,¹⁶ based on cross-blocking assays.

we studied the interaction of fresh and activated NK cells with 50 µg/ml of whole FN and a 38 000-MW purified proteolytic fragment (provided by Prof. F. Sánchez-Madrid), both containing the CS1 domain (VLA-4 molecule ligand). The plastic adhesion was used as positive control and the albumin was included as a negative control. In brief, 96-well flat-bottomed microtitre plates (Titertek; Flow Laboratories, Irvine, UK) were coated for 8 hr at 4° and 2 hr at 37° with 100 µl of different proteins dissolved in 0.1 M NaHCO₃. Thereafter, plates were washed gently with medium and 10⁵ cells/well were added and incubated for 20 min in an atmosphere of 5% CO₂. After incubation, plates were washed several times and examined in an inverted microscope by at least two different observers. Each condition was performed in duplicate. Within each well, cells from at least three different fields were counted.

To ascertain whether the binding of NK cells to FN was specifically mediated through the VLA-4 integrin, we assayed the effects of a panel of mAbs: P1D6, anti VLA-5 (a molecule with known FN-binding ability), HP2/1 (anti-CD49d), W6/32 (specific for a monomorphic determinant on HLA-A, B molecules) directed to non-adhesion molecules, and FN

peptide fragments CS1 and CS2 (provided by Prof. F. Sánchez-Madrid).

For inhibition assays, cells were previously incubated with 25 µl of hybridoma culture supernatant (10 µg/ml) using W6/32, P1D6 and HP2/1 mAbs, and 20 ng/ml of FN peptide fragments (CS1 and CS2), for 30 min at 4°.

RESULTS

The purity of each cell preparation (fresh, cultured and LAK cells) was demonstrated separately by flow cytometric analyses. All cell preparations showed the following phenotype: CD3⁺ CD16⁺ CD56⁺ Kp43⁺ CD2⁺ (Fig. 1). The majority of NK cells, both fresh and activated (cultured and LAK), expressed high levels of both chains of the VLA-4 heterodimer, and this expression was increased after being stimulated with rIL-2 (Fig. 2).

rIL-2 induced the formation of aggregates (30% of aggregation) on activated NK cells (cultured and LAK cells) after 4 hr (Fig. 3a). Anti- α_4 -integrin mAbs, anti-CD11a and anti-CD54, and anti-CD11a + anti-CD18 on activated NK cells, inhibited the cell aggregation induced by rIL-2 (Fig. 3b).

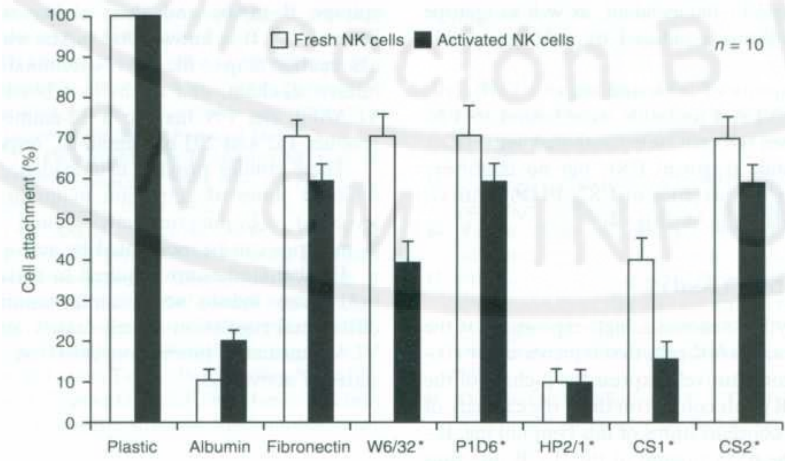


Figure 4. Percentages of attachment of fresh and lymphocyte-activated killer (LAK) cells to fibronectin (FN) (50 µg/ml). The plastic adhesion was used as positive control and the albumin was included as a negative control. *In inhibition assays, the cells were previously incubated with 25 µl of hybridoma culture supernatant using W6/32 (10 ng/ml), P1D6 (10 µg/ml) and HP2/1 (10 µg/ml) monoclonal antibodies (mAbs) and 20 µg/ml of FN peptide fragments CS1 and CS2, for 30 min at 4°. Binding was blocked when natural killer (NK) cells were incubated with HP2/1 (anti- α_4) mAb and FN peptide fragment CS1.

The homotypic cell aggregation on activated NK cells stimulated by rIL-2 was dependent on the LFA-1/ICAM-1 adhesion pathway.

To evaluate the possible role of the VLA-4 integrin in homotypic cell adhesion, we tested the functional effects of mAbs on the induction or blockade of NK cell aggregation. Anti- α_4 mAbs did not induce aggregates of fresh NK cells (10% of aggregation) after 4 hr of incubation in the presence of anti- α_4 mAb (HP1/7) (10 μ g/ml) inhibitor mAbs for the LFA-1 complex and IL-2 (500 U/ml) (Fig. 3c). However, after 4 hr, anti- α_4 HP 1/7 (recognizing epitope A) and HP2/4 (recognizing epitope B) mAbs induced the formation of aggregates on activated NK cells (which comprised 60–70% of aggregated cells) using inhibitor mAbs specific for the LFA-1/ICAM-1 adhesion pathway (Fig. 3d, 3e, respectively). VLA α_4 -epitopes are as previously described,¹⁹ based on cross-blocking cell-binding assays with anti-VLA α_4 mAb.

Anti- α_4 mAb HP2/1, directed against a non-inducing aggregation epitope B of VLA-4,¹² did not trigger homotypic adhesion on LAK cells (15% of aggregation) after 4 hr of incubation in the presence of mAbs directed against the LFA-1 complex (anti-CD11a + anti-CD18) and IL-2 (10 U/ml) (Fig. 3f) compared with the homotypic aggregation induced by HP1/7 and HP2/4 mAbs (60–70% of aggregation). Therefore, the homotypic cell aggregation can be triggered by mAb specific for two different epitopes on the VLA α_4 -chain (Table 1). Non-binding isotype-control antibody did not induce aggregation on LAK cells after 4 hr of incubation in the presence of mAbs directed against the LFA-1 complex (CD11a + CD18) (10 ng/ml), and IL-2 (10 U/ml) (Fig. 3g). A mAb against Fc fragment IgG (10 μ g/ml) was included as an inhibitor for cross-linking mAbs. Cell adhesion was rapidly induced in the presence of anti-VLA-4 mAb on activated cells and the intercellular aggregation was dependent on cellular activation. The study of the characteristics of this cell aggregation suggests that VLA-4 may constitute a NK cell-adhesion pathway that is independent of the LFA-1/ICAM-1 adhesion pathway. The effect of the anti-VLA-4 mAb on cell aggregation is isotype and Fc independent, as well as epitope specific, because it is selectively induced by mAb to specific antigen sites (Table 1).

As expected, the majority of fresh and activated NK cells with high levels of the VLA-4 molecule were bound to FN. Binding was blocked when NK cells were incubated with HP2/1 (anti- α^A) mAb and peptide fragment CS1, but no inhibitory effects were observed in the presence of CS2, P1D6 (anti- α_5) mAb and W6/32 (anti-HLA) mAb (Fig. 4).

DISCUSSION

The results of our study have shown a high expression of the VLA-4 heterodimer in human NK cells that is increased by rIL-2. As human NK cells constitutively express the β -chain of the IL-2 receptor (p75 IL-2R), this confers on them the capacity of *in vitro* response to high concentrations of this lymphokine. IL-2 induces synthesis of the p55 α subunit of the IL-2R and thus the high-affinity IL-2R.^{20,21} Hence, IL-2 activation of NK cells results in a major shift in their phenotypic and functional characteristics,²⁰ and there is an increased expression of the $\alpha_4\beta_1$ heterodimer.

Our results demonstrated that rIL-2 induced aggregation on

activated NK cells and that aggregation was mediated by LFA-1/ICAM-1 pathway adhesion. This fact is well known by phorbol myristate acetate (PMA)-induced aggregation on U937 cells and for other mAbs (anti-LFA-1 subunit and anti-sialophorin) that mediate homotypic leucocyte interaction.¹²

The failure of fresh NK cells to aggregate in the presence of some mAbs against the α_4 -chain suggests that fresh NK cells bear a non-functional form of VLA-4. Nevertheless, the HP1/7 and HP2/4 mAbs induce homotypic aggregation on activated NK cells, which is related to cellular activation. The aggregation on activated but not resting NK cells could be a result of increased levels of VLA-4 expression. The activation of NK cells could induce either a conformational or a transcriptional change in a region of VLA-4 involved in homotypic cell aggregation (the most N-terminal 100 amino acids of the human α_4 -chain) to alter these cells from a nonfunctional to a functional state.^{22,24} This fact is well known for other integrin molecules from the p_2 and p_3 families.^{25,28} These data suggest that the cytokine IL-2 can act as a direct regulator of adhesive mechanisms as well as the cytokines interleukin-4 (IL-4) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) act on other cell types.²⁹ However, the different adhesive capacities of the VLA-4 integrin were found not to be altered on cells upon mild trypsin treatment, but were altered on α_4 forms generated by high-dose pronase treatment of cells.³⁰ Alternatively, the activation process could induce the synthesis of a new functional VLA-4 molecule or other proteins associated with VLA-4. All these explanations might be possible.

Peripheral blood B lymphocytes, although inefficient at binding FN, are able to aggregate in the presence of some mAbs against the α_4 -chain.³¹ The present results demonstrate that fresh NK cells with a high expression of the α_4 -chain can bind FN and not aggregate in the presence of anti- α_4 mAbs, but the activated NK cells also bind FN and aggregate in the presence of HP1/7 and HP2/4 mAbs. These findings suggest the possibility of a different functional regulation by the cells bearing VLA-4 in different states of activation, in the expression of these epitopes recognized by epitope A and epitope B mAbs and their ability to interact with their ligands.^{32–36} It is known that mAbs which induce homotypic aggregation map to the most N-terminal 100 amino acids of the human α_4 -chain, and mAbs that block adhesion of $\alpha_4\beta_1$ to VCAM-1 and FN map to a 52-amino acid region between residues 152 and 203 of human α_4 , respectively.²⁴

These studies provide new evidence of how NK cells in different states of activation maintain different constitutive levels of $\alpha_4\beta_1$ -integrin activity, and how the activity of β_1 -integrins can be modulated by activators of cell adhesion.

Further studies are required to determine whether anti- α_4 mAbs can induce some conformational changes or if a differential regulation of cell-matrix and homotypic cell-cell VLA-4-mediated interaction exists on NK cells in different states of activation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Immunology Department from La Princesa Hospital, Madrid, Spain. The authors are very grateful to Prof. Ortiz de Landázuri, Prof. López-Botet and Prof. Sánchez-Madrid, who kindly provided the mAbs and gave valuable suggestions.

VLA-4 molecule on human NK cells

REFERENCES

1. Patarroyo M. & Makgoba M.W. (1989) Leucocyte adhesion to cells. *Scand J Immunol* **30**, 129.
2. PATARROYO M., PRIETO J., RINCÓN J. *et al.* (1990) Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev* **114**, 67.
3. LARSON R.S. & SPRINGER T. (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* **114**, 181.
4. DRANSFIELD I., MARIE BUCKLE A. & HOGG N. (1990) Early events of the immune response mediated by leukocyte integrins. *Immunol Rev* **114**, 29.
5. DEDHAR S.H. (1990) Integrins and tumor invasion. *Bioassays* **12**, 583.
6. HEMLER M.E., ELICES M.J., PARKER C. & TARADA Y. (1990) Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev* **114**, 45.
7. HUMPHRIES M.J. (1990) The molecular basis and specificities of integrin-ligand interactions. *J Cell Sci* **97**, 585.
8. SHIMIZU Y., VAN SEVENTER G.A., HORGAN K.J. & STEPHEN S. (1990) Roles of adhesion molecules in T cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation. *Immunol Rev* **114**, 109.
9. Takada Y., Elices M.J., Crouse C. & Hemler M.E. (1989) The primary structure of the $\alpha 4$ subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function. *EMBO J* **8**, 1361.
10. PULIDO R., ELICES M.J., CAMPANERO M.R. *et al.* (1991) Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4. *J Biol Chem* **266**, 10241.
11. Keizer G.D., Visser W., Vliem M. & Figdor C.G. (1988) A monoclonal antibody (NK1 L16) directed against a unique epitope on the α chain of human leukocyte function associated antigen 1 induces homotypic cell-cell interactions. *J Immunol* **140**, 1393.
12. Campanero M.R., Pulido R., Ursa M., Rodríguez M., De Landázuri M.O. & Sánchez-Madrid F. (1990) An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism LFA-1/ICAM-1 independent, triggered through the human VLA-4 integrin. *J Cell Biol* **110**, 2157.
13. MELDER R.J., WALKER E., HERBERMAN R.B. & WHITESIDE T.L. (1991) Adhesion characteristics of human interleukin 2 activated natural killer cells. *Cell Immunol* **132**, 177.
14. Sánchez-Madrid F., De Landázuri M.O., Morago G., Cebrián M., Acevedo A. & Bernabeu C. (1986) VLA 3: a novel polypeptide association within the VLA 4 molecular complex: cell distribution and biochemical characterisation. *Eur J Immunol* **16**, 1343.
15. SÁNCHEZ-MADRID F., DE CEBRIÁN M., DE LANDÁZURI M.O. *et al.* (1989) Report of the IV International Workshop on Leukocyte Differentiation Antigens (Vienna, 1989). *Inmunología* **8**, 35.
16. PERUSSIA B., RAMONI C., ANEGÓN I., CUTURI M.C., FAUST J. & TRINCHIERI G. (1987) Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cells lines. *Nat Immun Cell Growth Regul* **6**, 171.
17. RINCÓN M., TUGORES A., LÓPEZ-RIVAS A. *et al.* (1988) Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur J Immunol* **18**, 1791.
18. GIMONDI A., MORRONE S., TARONE G. *et al.* (1990) Human NK cells express on cell surface an integrin structure which mediate their adhesion to fibronectin. In: *Natural Killer Cells: Biology and Clinical Application 6th Int Natural Killer Cell Workshop, Goslar, 1989* (ed R. E. SCHMIDT), p. 37. Karger, Basel.
19. Holzmam B. & Weissman L. (1989) Integrin molecules involved in lymphocytes homing to Peyer's patches. *Immunol Rev* **108**, 45.
20. Tsudo M., Goldman C.K., Bongiovanni K.F. *et al.* (1987) The P75 peptide is the receptor for interleukin 2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin 2 activation of these cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 5394.
21. Trinchieri G. (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* **47**, 187.
22. Muñoz M., Serrador J., Sánchez-Madrid F. & Teixidó J. (1996) A region of the integrin VLA $\alpha 4$ subunit involved in homotypic cell aggregation and in fibronectin but not vascular cell adhesion molecule-1 binding. *J Biol Chem* **271**, 2696.
23. Chiu H.H., Crowe D.T., Renz M.E. *et al.* (1995) Similar but nonidentical aminoacid residues on vascular cell adhesion molecule-1 are involved in the interaction with $\alpha 4$ $\beta 7$ and $\alpha 4$ $\beta 1$ under different activity states. *J Immunol* **155**, 5257.
24. Schiffer S.G., Hemler M.E., Lobb R.R., Tizard R. & Osborn L. (1995) Molecular mapping of functional antibody binding sites of $\alpha 4$ integrin. *J Biol Chem* **270**, 14270.
25. Dustin M. & Springer T.A. (1989) T cell receptor cross linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619.
26. Lo S.K., Van Seventer G.A., Levin S.M. & Wright S.D. (1989) Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J Immunol* **143**, 3325.
27. Di MINNO G., THIAGARAJAN P., PERUSSIA B. *et al.* (1986) Exposure of platelet fibrinogen-binding sites by collagen, arachidonic acid, and ADP: inhibition by a monoclonal antibody to the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* **61**, 140.
28. Shattil S.J., Kashiwagi H. & Pampori N. (1998) Integrin signalling: the platelet paradigm. *Blood* **91**, 2645.
29. Herzberg F., Schoning M., Schirmer M., Toop M., Thiel E. & Kreuser E.D. (1996) IL-4 and TNF α induce changes in integrin expression and adhesive properties and decrease the lung-colonising potential of HT-29 colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* **14**, 165.
30. Pulido R., Campanero M.R., García Pardo A. & Sánchez-Madrid F. (1991) Structure-function analysis of the human integrin VLA-4 epitopes and sites of ligand interaction. *FEBS Lett* **294**, 121.
31. Postigo A.A., Pulido R., Campanero M.R. *et al.* (1991) Differential expression of VLA-4 integrin by resident and peripheral blood human B lymphocytes. Acquisition of functional active $\alpha 4 \beta 1$ -fibronectin receptors upon B cell activation. *Eur J Immunol* **21**, 2437.
32. SCHWARTZ M.A., SCHALLER M.D. & GINSBERG M.H. (1995) Emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Biol* **11**, 549.
33. Clark E.A. & Brugge J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways. The road taken. *Science* **268**, 233.
34. Yamada K.M. & Geiger B. (1997) Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 76.
35. Miyamoto S., Teramoto H., Gutkind J.S. & Yamada K.M. (1996) Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* **135**, 1633.
36. DIAMOND M.S. & SPRINGER T.A. (1994) The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* **4**, 506.

Moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con síndrome coronario agudo

Consuelo Macías³, Rinaldo Villaescusa³, Lázaro del Valle³, Víctor Boffil^b, Girelda Cordero³, Alberto Hernández^b, Porfirio Hernández³ y José Manuel Ballesteé

^aDepartamento de Inmunología. Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana. Cuba. ^bInstituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. La Habana. Cuba.

Introducción y objetivos. La respuesta inflamatoria aguda es un importante fenómeno en la patogenia del daño miocárdico durante el síndrome coronario agudo, y se ha demostrado la existencia de disfunción endotelial con resultados controvertidos. El propósito de este estudio fue determinar los valores de las moléculas de adhesión endoteliales solubles ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con angina inestable e infarto, comparar los resultados en ambos grupos y analizar su relación con el grado de daño miocárdico.

Método. Las concentraciones séricas de estas moléculas se estudiaron en 37 controles sanos y 43 pacientes, 32 con infarto de miocardio y 11 con angina inestable, en el momento del diagnóstico y 10 días más tarde, utilizando enzoinmunoanálisis (ELISA) mediante estuches comerciales (R&D Systems, Reino Unido).

Resultados. Se observó un incremento significativo de la E-selectina ($p < 0,05$) en los pacientes con angina inestable en el momento del diagnóstico y 10 días más tarde. Sin embargo, en los pacientes con infarto de miocardio no se observaron diferencias significativas de las concentraciones de E-selectina en el momento de la admisión y 10 días después, al compararlos con el grupo control. Se demostró un incremento significativo de los valores de VCAM-1 en ambos grupos de pacientes y de los de ICAM-1 en el infarto de miocardio en relación con el grupo control, pero las concentraciones de VCAM-1 e ICAM-1 entre ambos grupos de pacientes en el momento de la admisión y 10 días más tarde no reveló diferencias significativas. No hubo correlación entre los valores de las moléculas de adhesión endoteliales solubles y la severidad del daño miocárdico, estimado por enzimas cardíacas y cambios electrocardiográficos.

Conclusión. Este estudio indica que los valores séricos de la E-selectina, medidos en el momento de la admisión y 10 días más tarde, podrían ser un marcador para la angina inestable y en el diagnóstico diferencial con el infarto agudo de miocardio.

Palabras clave: Angina inestable. Infarto de miocardio. Isquemia. Endotelio.

Correspondencia: Dra. C. Macías.
Departamento de Inmunología. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070. Ciudad de La Habana 10800. Cuba.
Correo electrónico: ihidir@hemato.sld.cu
Recibido el 11 de octubre de 2001.
Aceptado para su publicación el 6 de septiembre de 2002

Endothelial Adhesion Molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-Selectin in Patients with Acute Coronary Syndrome

Introduction and objectives. The acute inflammatory response is an important phenomenon in the pathogenesis of myocardial damage during acute coronary syndrome. Endothelial dysfunction has been found in unstable angina and acute myocardial infarction, although the results are controversial. The purpose of this study was to determine the levels of the soluble endothelial adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin, in patients with unstable angina and acute myocardial infarction, compare the results in both groups, and analyze their relation with the degree of myocardial injury.

Method. Serum concentrations of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin were measured in 37 control subjects and 43 patients (32 with acute myocardial infarction and 11 with unstable angina). Measurements were made at the time of admission and ten days later using commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, UK).

Results. There was a significant increase in E-selectin ($p < 0.05$) in patients with unstable angina at admission and ten days later. In contrast, patients with acute myocardial infarction showed no significant differences in E-selectin compared with the control group at admission or ten days later. A significant increase in VCAM-1 levels was demonstrated in both groups of patients and ICAM-1 levels in acute myocardial infarction, but the concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 in both groups of patients at admission and ten days later did not differ significantly. There was no relation between soluble endothelial adhesion molecule levels and the severity of myocardial damage estimated by cardiac enzymes or electrocardiographic changes.

Conclusion. This study indicates that serum levels of E-selectin, measured at time of admission and ten days later, could be a marker for unstable angina and might be useful in the differential diagnosis with myocardial infarction.

Key words: Unstable angina. Myocardial infarction. Ischemia. Endothelium.

Full English text available at: www.revespcardiol.org

INTRODUCCION

En 1985, Bevilacqua et al¹ demostraron que las citocinas estimulaban el endotelio, que se hacía más adhesivo para los leucocitos. Esta observación desarrolló una revolución en el entendimiento de la patogenia de la inflamación², y estudios posteriores corroboraron que el endotelio es el centro de los acontecimientos que permiten el desarrollo de la lesión inflamatoria^{2,3}.

La adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular es el paso fundamental para su extravasación durante la inflamación. Este proceso está mediado por la molécula de adhesión E-selectina. La unión firme y la migración transendotelial dependen de la interacción entre la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de citoadhesión vascular-1 (VCAM-1) y las integrinas antígeno de función linfocitaria-1 (LFA-1, CD11a/ CD 18) y antígeno de activación tardía-4 (VLA-4, CD49/ CD29) sobre los leucocitos^{4,5}. Las moléculas de adhesión endoteliales pueden desprenderse de la superficie celular a la circulación y sus valores solubles pueden reflejar su expresión sobre la superficie endotelial⁶. La respuesta inflamatoria aguda es un importante componente en la patogenia del daño miocárdico durante el síndrome coronario agudo^{7,10} y la disfunción endotelial está especialmente relacionada con el reclutamiento de los leucocitos durante la formación de la lesión aterosclerótica^{11,13}. En la práctica clínica se ha demostrado la utilidad de la detección sérica de diferentes marcadores de la inflamación, como la proteína C reactiva, el amiloide A, la troponina T y las citocinas, como las interleucinas (IL) 1 y 6 asociadas a la patogenia del síndrome coronario agudo y su diagnóstico diferencial, por lo que algunos de ellos se han utilizado como marcadores diagnósticos y pronósticos^{8,14}. En este síndrome también se han evaluado los valores de las moléculas de adhesión endoteliales solubles, como marcadores séricos característicos de la disfunción endotelial e inflamación, con resultados controvertidos^{15,17}. Por todo lo anterior, el propósito de este estudio fue determinar los valores de las moléculas de adhesión endoteliales ICAM- 1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con angina inestable (AI) e infarto agudo de miocardio (IAM) en el momento del diagnóstico (admisión) y 10 días más tarde. También se han comparado los resultados obtenidos en ambas enfermedades y se ha analizado su relación con el daño miocárdico. Asimismo, se ha determinado la participación de estos marcadores séricos y los posibles mecanismos inmunológicos asociados en la respuesta inflamatoria del síndrome coronario agudo, así como su probable papel en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad en sus diferentes formas clínicas.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes y grupos de estudios

Fueron incluidos en el estudio 43 pacientes diagnosticados y tratados en el Instituto de Cardiología y

Cirugía Cardiovascular de La Habana, 31 varones y 12 mujeres (edad media, 66,4 años), 32 con IAM típico, 11 con AI y 37 sujetos sanos. Los pacientes con IAM fueron diagnosticados por historia de dolor torácico debido a isquemia prolongada (más de 30 min), cambios característicos en el electrocardiograma (alteraciones características de los segmentos T y ST y presencia de onda Q patológica [anchura 0,04 s]) y elevación de las enzimas: creatinina (CK total > 130 U), isoenzima MB de la CK (CK-MB) (6% de la actividad total) y transaminasa glutámico oxalacética (TGO > 29 U). El diagnóstico de AI se basó en historia de dolor torácico prolongado con alteración de la onda T o depresión del segmento ST y elevación de CK, CK-MB y TGO.

Criterios de exclusión

No se incluyó en el estudio a aquellos pacientes con historia anterior de hipertensión arterial, diabetes mellitus, dolor precordial u otro signo de isquemia cardíaca, alteraciones electrocardiográficas o diagnóstico de cardiopatía isquémica, pacientes con enfermedades asociadas que pudieran provocar alteraciones del sistema inmunológico, pacientes que en un período de 3 meses anterior al estudio hubieran recibido tratamiento con medicamentos antiinflamatorios o inmunomoduladores, así como aquellos que en el momento del diagnóstico presentaran signos y síntomas de infección u otra posible enfermedad aguda asociada.

Los individuos supuestamente sanos (donantes de sangre), sin historia de infección reciente ni tratamientos con inmunomoduladores u otros con efecto sobre el sistema inmunológico, fueron seleccionados con características similares a la muestra de pacientes, en el Banco de Sangre del Instituto de Hematología e Inmunología.

Características de la muestra

Todos los enfermos incluidos en el estudio se encontraban en un rango de edad y distribución por sexo similar al del grupo control, y los factores de riesgo comunes fueron el hábito tabáquico y la hiperlipidemia. El tratamiento médico de ambas formas clínicas del síndrome coronario agudo se basó en la administración de bloqueadores beta, bloqueadores de los canales del calcio, nitritos y aspirina. No se llevaron a cabo técnicas invasivas, como angioplastia e implantación de *stent*, ni se administró a los pacientes tratamiento fibrinolítico o antitrombótico con IAM.

Medición de las moléculas de adhesión solubles y enzimas

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena anticubital en el momento de la ad-

TABLA 1. Valores de las moléculas de adhesión endoteliales solubles en la angina inestable y el infarto agudo de miocardio en el momento del diagnóstico y 10 días después

Moléculas de adhesión	Angina inestable			Infarto agudo de miocardio	
	Sujetos control	Admisión	10 días después	Admisión	10 días después
VCAM-1	15,3 ±6,1	34,6 ± 19,8 ^{uu}	24,4 ± 13,2 [»]	24,3 ± 14,1 ^u	25,3 ± 14,4 ^u
E-selectina	3,2 ±1,4	5,9 ± 2,4 ^{uu}	5,0 ± 2,4 ^{uu}	3,8 ± 1,6 ^u	3,2 ± 1,1 ^u
ICAM-1	18,5 ±6,9	26,6 ±21,1	24,9 ± 10,6	27,7 ± 12,4 ^u	29,4 ± 8,8 ^u

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml).
*p < 0,05, ^up < 0,01. ^{uu}p < 0,001, cuando ambos grupos de pacientes se compararon con los controles. [»]p < 0,05, cuando los pacientes con angina se compararon en el momento de la admisión y 10 días después. ^up < 0,05, cuando ambos grupos de pacientes se compararon en el momento de la admisión y 10 días después.

misión, antes del inicio del tratamiento y 10 días después, y depositadas en tubos de cristal sin anticoagulantes. El estudio longitudinal se realizó a los 10 días teniendo en cuenta que las citocinas plasmáticas tienen una vida media corta, que los valores de expresión de las moléculas de adhesión endoteliales solubles dependen del grado de activación del endotelio por acción de las mismas, y que la evolución de la AI es generalmente rápida y satisfactoria. Este período de tiempo permitió evaluar los valores de las moléculas de adhesión endoteliales solubles en el momento del diagnóstico y después de 10 días en caso de que existiera recuperación del flujo sanguíneo coronario.

La evolución rápida y satisfactoria de los enfermos con AI que requerían las mediciones de estas moléculas a los 10 días de evolución, así como los criterios de exclusión necesarios para este estudio, determinaron que sólo 11 enfermos con diagnóstico de AI fueran incluidos en el estudio.

Esta investigación fue aprobada por los comités de ética de ambas instituciones participantes, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki¹⁸.

El suero fue separado por centrifugación y almacenado a -80 °C. No se utilizaron muestras lipémicas, hemolizadas o turbias ni previamente descongeladas. Las concentraciones séricas de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina se midieron mediante estuches comerciales de enzimoimmunoanálisis (ELISA, R&D Systems, Reino Unido) y se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra. Los 6 estándares y el suero control se midieron por duplicado. La sensibilidad fue 2 ng/ml (10 ng/ml) a una dilución de 1/50;

0. 35 ng/ml (7 ng/ml) y 0,1 ng/ml (2 ng/ml) a una dilución de 1/20 para VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina, respectivamente. La precisión intraensayo tuvo un coeficiente de variación de 4,6, 4,9 y 4,7% para ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, respectivamente. La precisión interensayo tuvo un coeficiente de variación de 7,4, 8,9 y 7,4% para ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, respectivamente.

Las concentraciones séricas de CK, CK-MB y TGO se midieron mediante estuches comerciales (Laboratory Biomedical S.A. de C.V. LABISA,

Tecnodiagnostics) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Análisis estadístico

Todos los valores fueron expresados en media ± desviación estándar (X ± DE). La evaluación estadística de las diferencias entre ambos grupos de pacientes y entre cada uno de los grupos con los controles se realizó mediante el test de la t de Student para datos no apareados. El estudio longitudinal (concentraciones en el momento de la admisión y 10 días después) en ambos grupos de pacientes se analizaron mediante el test de la t de Student para datos apareados.

Las comparaciones de los valores de las moléculas de adhesión endoteliales de los pacientes con concentraciones normales y elevadas de las enzimas cardíacas, y de los valores de las moléculas con los cambios electrocardiográficos en pacientes con IAM sin y con alteraciones de la onda Q, se efectuaron también mediante el test de la t de Student para datos no apareados. Las correlaciones entre las concentraciones de CK- MB y de TGO y las moléculas de adhesión fueron analizadas mediante un análisis de regresión lineal por el método de coeficientes de correlación de Pearson y Spearman para los pacientes con IAM y pacientes con AI, respectivamente.

RESULTADOS

En el IAM se observó un significativo incremento de ICAM-1 y VCAM-1 en el momento de la admisión y 10 días después, comparado con los controles normales. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de E-selectina respecto a los sujetos sanos. Por otro lado, los pacientes con AI presentaron un incremento significativo de las concentraciones solubles de E-selectina y VCAM-1 en el momento de la admisión y 10 días después. También se observaron valores elevados de la concentración de ICAM-1, pero los valores no revelaron diferencias significativas en relación con los sujetos control (tabla 1; figs. 1-3).

El estudio longitudinal de los pacientes con IAM no puso de manifiesto diferencias significativas. En los

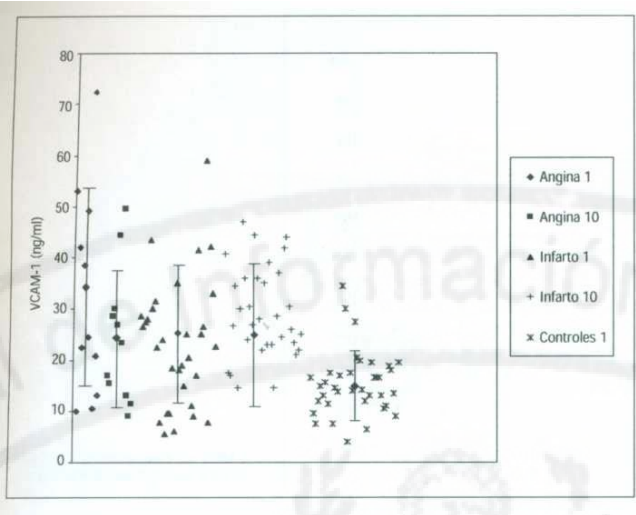


Fig. 1. Concentraciones de VCAM-1 en el momento del ingreso y a los 10 días.

pacientes con AI se apreció una disminución significativa en la concentración de VCAM-1 después de los 10 días de admisión, pero no se encontraron modificaciones significativas en las concentraciones de E-selectina e ICAM-1 (tabla 1). La comparación entre ambos grupos de pacientes reveló que las concentraciones de VCAM-1 e ICAM-1, tanto en el momento de la admisión como 10 días

después, no presentaban diferencias significativas, pero sí existió un significativo incremento en la concentración de la molécula de E-selectina en los pacientes con AI en el momento de la admisión y 10 días después respecto a los pacientes con IAM (tabla 1).

No se apreció ninguna relación entre los valores de las moléculas de adhesión endoteliales, las alteracio-



Fig. 2. Concentraciones de E-selectina en el momento del ingreso y a los 10 días.

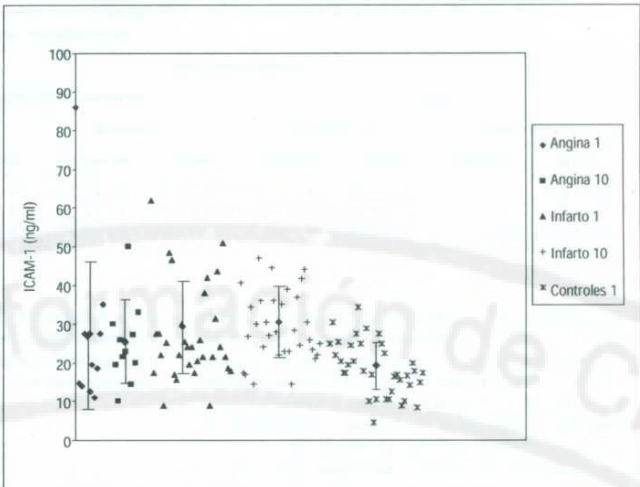


Fig. 3. Concentraciones de ICAM-1 en el momento del ingreso y a los 10 días.

TABLA 2. Comparación de los valores de moléculas de adhesión endoteliales y el estado electrocardiográfico de la onda Q en el infarto agudo de miocardio

Moléculas de adhesión	Infarto agudo de miocardio			
	Con alteración de la onda Q (n = 22)		Sin alteración de la onda Q (n = 10)	
	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días
VCAM-1	22,5 ± 13,3	24,7 ± 15,2	30,8 ± 16,2	27,7 ± 10,9
E-selectina	3,8 ± 1,6	3,2 ± 1,1	3,5 ± 1,5	3,3 ± 1,3
ICAM-1	27,0 ± 12,5	29,6 ± 9,2	30,2 ± 12,5	28,5 ± 8,1

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml).

nes de las enzimas cardíacas (CK-MB y TGO) y los cambios electrocardiográficos (tablas 2-4).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de valores elevados de ICAM-1 y VCAM-1 soluble en pacientes con IAM, tanto en el momento de la admisión como 10 días después. Se observó un patrón característico de liberación de estas moléculas de adhesión: inicialmente estas moléculas se elevaron en la fase aguda del daño isquémico miocárdico, momento en que el flujo sanguíneo coronario está disminuido. Sin embargo, el patrón de E-selectina durante el seguimiento longitudinal difirió del patrón anteriormente descrito para las moléculas ICAM-1 y VCAM-1, ya que no reveló diferencias significativas comparado con los valores normales en el momento de la admisión y 10 días después, a pesar de la persistencia de los valores incrementados de ICAM-1 y VCAM-1. En los pacientes con AI se obtuvieron valores elevados de

TABLA 3. Comparación entre los valores de las moléculas de adhesión endoteliales y los resultados de las enzimas cardíacas en la angina inestable

Moléculas de adhesión	Angina inestable							
	Transaminasa glutamicooxalacética				CK-MB			
	Elevadas (n = 2)		Normales (n = 9)		Elevadas (n = 2)		Normales (n = 9)	
	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días
VCAM-1	36,7 ± 13,4	33,8 ± 9,3	34,6 ± 19,8	24,4 ± 13,2	36,7 ± 13,4	33,8 ± 9,3	34,6 ± 19,8	24,4 ± 13,2
E-selectina	4,4 ± 0,7	3,9 ± 0,3	5,9 ± 2,4	5,0 ± 2,4	4,4 ± 0,7	3,9 ± 0,3	5,9 ± 2,4	5,0 ± 2,4
ICAM-1	22,2 ± 8,4	23,5 ± 2,2	26,6 ± 3,4	24,9 ± 10,6	22,2 ± 8,4	23,5 ± 2,2	26,6 ± 21,1	24,9 ± 10,6

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml).

TABLA 4. Comparación entre los valores de moléculas de adhesión endoteliales solubles y los resultados de las enzimas cardíacas en el infarto agudo de miocardio

Moléculas de adhesión	Infarto agudo de miocardio							
	Transaminasa glutamicooxalacética				CK-MB			
	Elevadas (n = 20)		Normales (n = 12)		Elevadas (n = 24)		Normales (n = 8)	
	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días	Diagnóstico	10 días
VCAM-1	24,0 ± 14,3	25,6 ± 4,7	21,3 ± 13,6	23,7 ± 13,2	23,4 ± 14,4	25,0 ± 14,7	23,7 ± 13,5	24,9 ± 12,8
E-selectina	3,9 ± 1,6	3,2 ± 1,1	3,6 ± 1,4	3,2 ± 1,2	3,8 ± 1,6	3,1 ± 1,1	3,4 ± 1,1	3,2 ± 1,2
ICAM-1	27,5 ± 12,3	30,0 ± 9,1	26,8 ± 9,2	30,6 ± 8,7	27,4 ± 12,1	29,8 ± 9,0	27,1 ± 10,6	29,0 ± 8,0

Los valores expresan la media ± DE (ng/ml).

VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en el momento de la admisión y 10 días después, pero los valores obtenidos de ICAM-1 no demostraron diferencias significativas respecto a los controles normales y a los pacientes con IM.

ICAM-1

Con anterioridad se ha comunicado la existencia de valores elevados de ICAM-1 en el IAM¹⁵¹⁶¹⁹ y en la Aji^{7,20-22} En un estudio reciente se comunicó que pacientes con IAM presentaron concentraciones elevadas de ICAM-1 y E-selectina en la circulación periférica, pero los valores de E-selectina alcanzaron sus valores máximos entre las 4 y las 6 h posteriores a la admisión, retomando a sus valores basales a las 24 h¹⁵. Los estudios *in vitro* también han demostrado diferencias en la cinética de la expresión endotelial de la E-selectina e ICAM-1²³. Sin embargo, otros estudios no han encontrado un incremento de la E-selectina en el IAM^{16,17}.

La activación de la microcirculación es el principal componente de la respuesta inflamatoria. El endotelio vascular desarrolla y expresa moléculas que inician la inmigración local de leucocitos^{24,25}. La molécula ICAM-1 puede ser liberada (específica e inespecífica- mente) por el tejido dañado o inflamado, como consecuencia de una proteólisis inespecífica²⁶. Esta observación podría explicar los valores elevados de ICAM-1 en pacientes con síndrome coronario agudo y sus concentraciones más elevadas en el IAM.

VCAM-1

VCAM-1 es expresada por el endotelio arterial en las lesiones ateroscleróticas tempranas en un modelo experimental de aterosclerosis en conejo (conejo Watanabe), y podría ser responsable de la atracción de las células mononucleares que desarrollan la lesión aterosclerótica¹². Otros autores han demostrado con anterioridad que VCAM-1 es expresada ampliamente sobre células endoteliales de arterias ocluidas durante la aterosclerosis acelerada²⁷. La aterosclerosis coronaria es la causa más frecuente de enfermedad cardíaca

por isquemia y la rotura de las placas por trombosis es la principal causa de los síndromes coronarios agudos, como AI, IAM y muerte súbita²⁸. Estas observaciones podrían explicar la elevada concentración de VCAM-1 en los síndromes coronarios agudos y la existencia de una significativa disminución en las concentraciones séricas de esta molécula 10 días después en la AI, cuando el flujo sanguíneo coronario ha mejorado.

E-selectina

Nuestros resultados demuestran un significativo incremento de la concentración de E-selectina en el grupo de pacientes con AI en el momento de la admisión y 10 días después. La E-selectina es particularmente interesante debido a que se encuentra sólo en el endotelio activado, en contraste con otras moléculas de adhesión, que tienen una distribución tisular más amplia. La demostración de E-selectina soluble en la sangre se puede considerar, por tanto, una evidencia concluyente de activación endotelial. Esta molécula de adhesión es biológicamente activa mediando la adhesión de neutrófilos a la superficie endotelial, así como de monocitos, eosinófilos, basófilos y células *natural-killer*³⁻²⁹. La E-selectina facilita la fase temprana de adhesión de los polimorfonucleares a la célula endotelial, constituyendo un marcador sérico temprano de la respuesta inflamatoria y promoviendo el daño celular por isquemia^{30,31}. Episodios de isquemia breve durante la angio- plastia coronaria permiten el estímulo soluble capaz de inducir la expresión de integrinas en el neutrófilo³²³³, y también se ha observado en estudios realizados en pacientes con AI que la aparición del dolor torácico después de las 48 h de la angiografía coronaria está relacionada con valores significativamente más altos de activación del neutrófilo, sugiriendo que el grado de activación está relacionado con próximos episodios de angina en reposo³².

Por otra parte, las concentraciones de interleucina-1 beta (IL-1β) se han encontrado elevadas en los pacientes con enfermedad cardíaca isquémica, en particular en aquellos con enfermedad arterial coronaria mínima y angina³⁴. La función precisa de la IL-1β en la enfer-

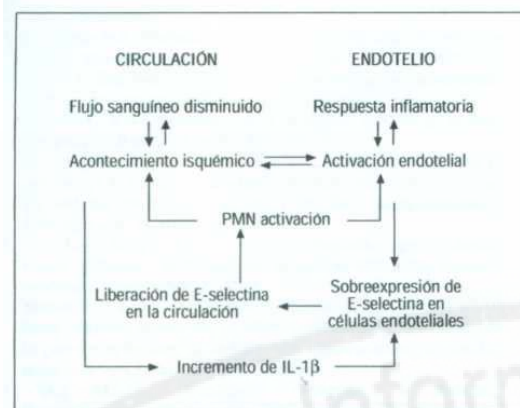


Fig. 4. Mecanismo secuencial en el que se observa cómo una reacción de activación endotelial podría prolongar los elevados valores de E-selectina soluble en la sangre.

medad arterial coronaria permanece indeterminada, pero durante la respuesta inflamatoria, las células endoteliales expresan E-selectina en respuesta a la IL-1^{34,35}. Teniendo en cuenta estas evidencias, los episodios isquémicos podrían actuar como desencadenantes de un mecanismo secuencial representado por la activación endotelial con expresión de E-selectina y su liberación a la sangre, valores incrementados de IL-1 p que promueven la expresión de E-selectina por las células endoteliales y activación de los neutrófilos por la E-selectina soluble, provocando daño celular isquémico y, en consecuencia, una mayor liberación de E-selectina por la célula endotelial activada (fig. 4). Probablemente, estas reacciones integradas podrían explicar por qué la E-selectina se comporta de una manera diferente a la descrita por algunos autores¹⁵ para el IAM.

Diferentes hallazgos encontrados por otros autores facilitan la comprensión de nuestros resultados si consideramos que el IAM conlleva una respuesta inflamatoria mayor que la AI^{14,16,17,36,38} y que ésta se asocia a un mecanismo inflamatorio no relacionado con la presencia de necrosis ni con la extensión de las lesiones coronarias⁸.

Relación con el grado de daño miocárdico

En nuestro estudio no se pudo demostrar la existencia de ninguna relación entre los valores incrementados de las moléculas de adhesión y los resultados de las enzimas cardíacas y los cambios electrocardiográficos. Esto sugiere que la presencia de concentraciones elevadas de las moléculas de adhesión no está asociada a la severidad del daño miocárdico, medido al menos por estos parámetros en el síndrome coronario agudo, lo que concuerda con lo señalado por diversos

autores para otros marcadores séricos relacionados con el diagnóstico y pronóstico del mismo^{8,38} y con la evidencia de que elevaciones específicas de los valores de E-selectina podrían indicar activación o daño del endotelio como componente particular de un proceso patológico determinado²⁹.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio sugiere que los valores elevados de la molécula de adhesión endotelial E-selectina medida en el momento de la admisión y días más tarde podría ser un marcador para la AI y ser útil en el diagnóstico diferencial con el IAM para complementar la información de las pruebas convencionales. No obstante, se requieren otros estudios que proporcionen una mayor claridad sobre el valor real de las concentraciones incrementadas de E-selectina en el diagnóstico de la AI y su diagnóstico diferencial con el IAM, así como su correlación con otros marcadores séricos de conocido valor en el diagnóstico del síndrome coronario agudo, como la PCR y la troponina T, lo que podría proporcionar de un instrumento de valor en el pronóstico de los pacientes con enfermedades coronarias.

BIBLIOGRAFIA

1. Bevilacqua MP. Endothelial leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* 1993; 11:767-804.
2. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-44.
3. Hakkert BC, Kuipers TW, Leeuwenberg JFM, Van Mourik JA, Ross D. Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1, VLA-4. *Blood* 1991;78:2721-6.
4. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
5. Hogg N, Berlin C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunology Today* 1995;16:327-9.
6. Mrowka C. Detection of circulating adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-Selectin in Wegener's granulomatosis, systemic lupus erythematosus and chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1995;43:288-96.
7. Entman ML, Ballantyne CM. Inflammation in acute coronary syndromes. *Circulation* 1993;22:800-3.
8. Liuzzo G, Biasucci LM, Calabrese JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
9. Fuster V, Badimon L. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326: 242-50.
10. Sluiter W. Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanism underlying their expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(Suppl 4):537-44.
11. Wang X. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*

- 1995;115:89-98.
12. Gimbrone MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;75:678-708.
13. Jerzak P. The role of adhesion molecules in the immunopathogenesis of atherosclerosis. *Pol Tyg Lek* 1994;49:357-9.
14. Bazzino O. Valor pronóstico de la proteína C reactiva en la angina inestable. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:1-6.
15. Yi-Heng Li, Jeng-Kai T, Wei-Chun T, Liang-Miin T, Li-Jen L, Jyh-Hong Ch. Elevation of soluble adhesion molecules is associated with the severity of myocardial damage in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997;80:1218-21.
16. Shyu KG, Chang H, Lin CC, Kuan P. Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute coronary syndrome. *Chest* 1996;77:543-9.
17. Mulvihill N, Foley JB, Ghaisas N, Murphy R, Crean P, Walsh M. Early temporal expression of soluble cellular adhesion molecules in patients with unstable angina and subendocardial myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999;83:1265-7.
18. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc Res* 1997;35:2-3.
19. Wallen NH, Held C, Rehnquist N, Hjemdahl P. Elevated serum intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 among patients with stable angina pectoris who suffer cardiovascular death or non-fatal myocardial infarction. *Eur Heart J* 1999;20:990-1.
20. Ghaisas NK, Shahi CN, Foley B, Murphy R, Crean P, Walsh M. Elevated levels of circulating soluble adhesion molecules in peripheral blood of patients with Unstable Angina. *Am J Cardiol* 1997;80:617-9.
21. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Curtin R, Crean PA, Walsh M. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using adhesion molecules. *Heart* 2001;85:623-7.
22. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M. Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1210-6.
23. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-101.
24. Kinlay S, Selwyn AP, Libby P, Ganz P. Inflammation, the endothelium, and the acute coronary syndromes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32(Suppl 3):S62-6.
25. Ikeda U, Takahashi M, Shimada K. Monocyte-endothelial cell interaction in atherogenesis and thrombosis. *Clin Cardiol* 1998;21: 11-4.
26. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991;147:3788-93.
27. Koskinen PK, Lemstrom KB. Adhesion molecule P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in enhanced heart allograft arteriosclerosis in the rat. *Circulation* 1997;95:191-6.
28. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
29. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;91: 379-87.
30. Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Phillips ML, Rosenbloom CL, Cruz R, et al. E-selectin in focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:1126-36.
31. Lucchesia BR, Werns SW, Fantone JC. The role of the neutrophil and free radicals in ischemic myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:1241-51.
32. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D, et al. Clinical and angiographic correlates leukocyte activation in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1146-50.
33. Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets possible role in the development of cardiovascular injury. *Br Heart J* 1995;74:625-30.
34. Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin-1 p in patients with coronary artery disease. *Heart* 1996;76:24-8.
35. Pober JS, Gimbrone MA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J Immunol* 1986;243:1160-5.
36. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-8.
37. Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P, et al. Evidence for time dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation* 1994;90:1662-8.
38. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Attamura S, Caligiuri G, Monaco C, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94:874-7.