

03062

17
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL CCH

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

"PATRONES DE ADHERENCIA LINFOCITARIA A ENDOTELIO
VASCULAR HUMANO EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA

BÁSICA CON ESPECIALIZACIÓN EN EL

ÁREA DE INMUNOLOGÍA

P R E S E N T A:

CATARINA SACRISTAN ROCK

ASESOR DE TESIS: DR. JORGE ALCOCER VARELA

CO-ASESOR DE TESIS Y DIRECTOR DEL PROYECTO:

DR. ALBERTO PALACIOS BOIX

MEXICO, D.F.

JUNIO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

"PATRONES DE ADHERENCIA LINFOCITARIA A ENDOTELIO VASCULAR HUMANO
EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
CON ESPECIALIZACIÓN EN EL ÁREA DE INMUNOLOGÍA,

PRESENTA LA: BIÓLOGA CATARINA SACRISTÁN ROCK

ASESOR DE TESIS: DR. JORGE ALCOCER VARELA

CO-ASESOR DE TESIS Y DIRECTOR DEL PROYECTO:
DR. ALBERTO PALACIOS BOIX

MÉXICO D.F. JUNIO DE 1995

A mis padres: Emillo y Catarina

I. INDICE

I. Índice	p 1
II. Agradecimientos	p 2
III. Resumen	p 3
IV. Introducción	pp 4-41
A) Antecedentes		
1) El endotelio vascular		
a) Generalidades, homeostasis y función vascular		
b) Reactividad inmune e inflamación		
c) Daño vascular		
2) El papel de las moléculas de adhesión celular en procesos inflamatorios		
a) Moléculas de adhesión celular (MAC)		
b) Participación de las MAC en inflamación e inmunidad: adhesión, rodamiento, extravasación		
c) Interacciones entre linfocitos T y endotelio		
3) Enfermedades autoinmunes con daño vascular		
B) Hipótesis		
C) Objetivos		
V. Materiales y métodos	pp 43-49
VI. Resultados	pp 50-55
VII. Discusión	pp 56-68
VIII. Apéndice	pp 69-70
IX. Bibliografía	pp 71-86

II. AGRADECIMIENTOS

Agradezco la valiosa asesoría, la colaboración, las sugerencias, y el apoyo del Dr. Alberto Palacios Boix, del Dr. Jorge Alcocer Varela, del Dr. Luis Llorente Peters, del Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez, del Dr. Alejandro García Carrancá, del Dr. Raúl Mancilla Jiménez, del Dr. Mario Cardiel Ríos, de la Dra. Cristina Drenkard Rivero, del Dr. Héctor Orozco Estévez, de la M. en C. Gilda Villarreal Molina, de la M. en C. Claudia Alvarado de la Barrera, del M. en C. Javier Cabiedes C, de la Q.F.B. Susana Bahena Amescua, del Dr. Camilo Zurita Salinas, de la Q. Yvonne Richaud Patín, de la Q. Araceli Martínez Castillo, de la Arq. Isabel García Sacristán.

Principalmente, le agradezco a David, a quién le debo TODO...el pilar detrás de mi perseverancia y motivación.

Agradezco especialmente el cariño y el apoyo de mis padres, Emilio y Catarina, y de mis hermanos, Ana Isabel y Emilio.

A Alberto, muchísimas gracias; por la oportunidad que me ha dado, por su motivación e inspiración (¡son contagiosas!), por su visión y su brillantez, pero sobretodo, por su inmensa paciencia, su apoyo, y por creer en mí...

Gracias a todos los que han estado más cerca de mí en los últimos dos años y medio de este proyecto, Isabel, Teresa, Corina, Carlos, Gilda, Claudia, Patty, Gaby, Vicky, Mia, Marina C., Christa, Thouraya, Sonja, Nicole, Kara, Jacqueline, Mónica, Ana Paula, Maite, César, Sergio V, Miguel, Toño, Sergio PH, Laurent, Rafael M, Pedro, William, Rafael L, Luis, Rodolfo, Eric, Armando, Patrick, Blanca, Janette, y Marina R.

Jorge Armando y Eduardo, gracias.

Por tu presencia Manuel, gracias.

III. RESUMEN

El endotelio es un tejido metabólicamente activo que interviene en diversos procesos inflamatorios e inmunológicos. La esclerodermia generalizada y progresiva y las vasculitis son enfermedades autoinmunes reumáticas que se caracterizan por un alto infiltrado celular, el depósito de proteínas de matriz extracelular y una importante autoreactividad anti-endotelio. El objetivo de este trabajo fue identificar vías de adhesión específicas de células mononucleares y linfocitos T purificados a células endoteliales en pacientes con esclerodermia generalizada y vasculitis, comparados con individuos sanos.

Se obtuvieron células endoteliales (CE) a partir de vena umbilical humana y se cultivaron en medio Iscove suplementado. Después de dos pasajes, las CE se sembraron en placas de microcultivo de 24 pozos, hasta su confluencia. Se purificaron células mononucleares humanas (CMN) (depletadas de macrófagos) y linfocitos T a partir de sangre periférica por centrifugación en gradientes de densidad y se utilizaron las células en ensayos de adhesión por duplicado en una proporción de 1:10 (CE:T). Las monocapas de CE se incubaron con o sin estímulo de linfocitos T (PHA) antes de añadir las células. El porcentaje de adherencia se calculó al cabo de dos horas mediante exclusión con azul tripano y por análisis de citofluorometría de flujo, tras haber eliminado la población celular no adherente en lavados subsecuentes. Además se añadieron anticuerpos monoclonales dirigidos contra la integrina p150,95, la selectina ELAM-1, y las moléculas $\beta 2$ glicoproteína y $\beta 2$ microglobulina en los ensayos, para evaluar la especificidad de la adhesión.

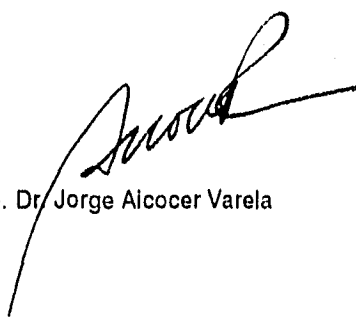
En ensayos de adherencia por microscopía, la adhesión de CMN y de linfocitos T fue significativamente mayor en pacientes con vasculitis y esclerodermia que en individuos sanos ($p < 0.05$), tanto en estado basal como en condiciones de estímulo. Dicha adherencia se incrementó en condiciones de estímulo.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la adherencia linfocitaria entre los dos grupos de pacientes. Al añadir los anticuerpos monoclonales a los cultivos, anti-p150,95 y anti-ELAM-1 se redujo significativamente la adhesión linfocitaria en todos los sujetos, de manera dosis-dependiente.

Es posible que existan diferencias en la inhibición de la adherencia con estos dos anticuerpos dependiendo de la naturaleza del padecimiento. La respuesta de adherencia de CMN fue mayor que aquella observada con linfocitos T. Los resultados de los ensayos de adherencia por citofluorometría de flujo fueron inconsistentes y no corroboraron los resultados obtenidos por microscopía.

Sin embargo, este trabajo demuestra que la adhesión de células mononucleares y linfocitos T a endotelio vascular humano en pacientes con esclerodermia y vasculitis, sigue vías específicas, que promueven la activación por lo menos de la integrina p150,95 y de la selectina ELAM-1, entre una gama importante de moléculas de adhesión.

Estos resultados tienen implicaciones importantes en la consideración de estrategias terapéuticas para tratar estos padecimientos, y promueven un mejor entendimiento de la participación de moléculas de adhesión en el desarrollo inflamatorio autoinmunitario.



Vo Bo. Dr. Jorge Alcocer Varela

IV. INTRODUCCIÓN

A) Antecedentes

1) El endotelio vascular

a) Generalidades, homeostasis y función vascular

- Generalidades -

El endotelio vascular está constituido por una monocapa de células endoteliales individuales unidas entre sí. En un adulto de 70 kg, el área cubierta por las células endoteliales representa más de 6300 m², con un peso total de 100 g (36). Dichas células son de origen epitelial (epitelio simple monoestratificado o pavimentoso) (231). Las células endoteliales son reemplazadas por nuevas cada 1000 días aproximadamente (36). Existen tres tipos de endotelio: **endotelio continuo** (la gran mayoría de los vasos sanguíneos: arterias, arteriolas, venas, vénulas, capilares, músculo estriado común, miocardio, piel, cerebro y tejido conjuntivo), **endotelio "fenestrado"** (con aperturas: víceras, páncreas, glándula adrenal, mucosa intestinal, riñones, órganos endócrinos), **endotelio discontinuo** (higado, bazo, médula ósea) (36). Los diferentes tipos de endotelio tienen distintas características de permeabilidad de acuerdo a sus funciones.

Morfológicamente, la célula endotelial tiene una apariencia poligonal, con un núcleo central y un citoplasma extenso (36). Posee mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas, y aparato de Golgi. Pero en particular se distinguen tres estructuras especiales: las **vesículas pinocíticas** (capilares, miocardio, y músculo estriado común), **uniones intercelulares** (uniones cerradas, y uniones por brecha), y **cuerpos de Weibel-Palade** (marcadores estándar de endotelio) (36).

El endotelio se encuentra más cerca del lumen de los vasos sanguíneos, y frecuentemente está acompañado de una capa delgada llamada subendotelio, que consiste de pequeñas cantidades de tejido conjuntivo, y a veces, algunas células de músculo liso (Dennis Smith, comunicación personal, 1990). El subendotelio más las células endoteliales constituyen la *tunica intima*. Después le siguen la *tunica media* (músculo liso más matriz extracelular) y la *adventitia* (fibroblastos, tejido conjuntivo colagenoso, matriz

extracelular) (99). La superficie del endotelio vascular se encuentra cubierta por una glucocálix (constituída por sialoglicoproteínas y proteoglicanos) con sitios aniónicos abundantes que mantienen una función de pinocitosis, de absorción de proteínas sobre la superficie endotelial, y de incorporación de LDL (lipoproteína de baja densidad) (36). El endotelio yace sobre una membrana basal, cuyo grueso aumenta conforme aumenta la edad del individuo (36). En la figura 1, se observan las distintas capas del endotelio en un vaso sanguíneo (231). La membrana basal contiene las siguientes proteínas: colágena (combinaciones de tipos III, IV, V, VIII, y a veces tipo I), laminina, elastina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, factor de von Willebrand, y proteoglicanos (o mucopolisacáridos: sulfato de heparano, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina) (36,99). El sulfato de heparano - cuya liberación es mediada por las proteínas de complemento C5a, C6, C7, C8, ó C9 (134) - inicia la adhesión celular y tiene una actividad anti-coagulante al inducir la activación de la antitrombina III (99). La colágena tipo IV promueve la adhesión de células endoteliales, y la colágena tipo V inhibe la proliferación de células endoteliales (99). El complejo gpl/IIa, es un receptor de colágena en plaquetas, presente en la superficie de células endoteliales (99). Las células endoteliales no sintetizan fibrinógeno/fibrina, pero estas sustancias se encuentran en el subendotelio e inducen la adhesión y el esparcimiento de las células endoteliales (99). La vitronectina también media la adhesión y el esparcimiento de fibroblastos y células endoteliales (que poseen el receptor de vitronectina) al substrato en cuestión (99). La vitronectina es liberada por plaquetas y se adhiere a plaquetas a través del complejo gpIIb/IIIa (99). Por lo tanto, la vitronectina funciona como otro factor de adhesión subendotelial tanto para plaquetas como para células endoteliales. Las células endoteliales poseen dos receptores que se adhieren al factor de von Willebrand: el receptor de vitronectina, y gpIb (99). El factor de von Willebrand es portador del factor VIII y tiene funciones procoagulantes y protrombóticas (161). La trombospondina y la fibronectina juegan un papel en la adhesión de las células endoteliales a la matriz extracelular; la síntesis de estas sustancias se incrementa con el estrés y la inflamación, en los sitios de lesión, y ambas interactúan con colágena V, fibrinógeno y sulfato de heparano para mediar los mecanismos de adhesión endotelial (99). La elastina y la laminina, secretadas por las células endoteliales, participan también en la adhesión de las células endoteliales a

Figura 1. Endotelio simple estratificado
al interior de un vaso sanguíneo (231).
E = endotelio



la matriz extracelular.

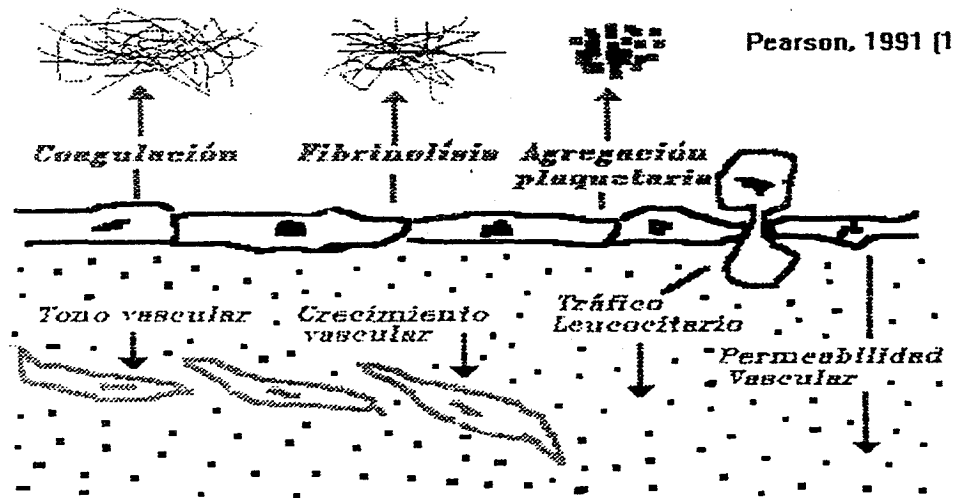
- Homeostasis y función vascular -

Antes se sostenía que el endotelio era un tejido completamente pasivo, pero ahora se sabe que el endotelio vascular es un tejido metabólicamente activo, cuyas células endoteliales poseen funciones altamente especializadas. El endotelio, al recubrir el interior de los vasos sanguíneos, forma una interfase entre la circulación sanguínea y los tejidos (99). Su papel dentro del mantenimiento de la homeostasis vascular es crucial, y es un sitio donde se llevan a cabo numerosos procesos de actividad inmunológica (161).

Los vasos sanguíneos forman un circuito cerrado que mantiene el flujo de sangre. Cuando hay una fuga, las plaquetas y el sistema de coagulación cierran temporalmente la lesión hasta que la pared vascular lo pueda reparar. Si están bloqueados por trombosis, los vasos sanguíneos pueden recuperar el flujo sanguíneo lisando el trombo (99). Este es un ejemplo del tipo de actividad en la cual participan enfáticamente las células endoteliales. Pero, ¿cuáles son específicamente las manifestaciones y las funciones de las células endoteliales recubriendo los vasos sanguíneos? Las funciones más importantes del endotelio vascular son las siguientes: **el mantenimiento de una barrera de permeabilidad selectiva, el mantenimiento de una superficie anti-trombogénica, el control y la regulación del tono y la reactividad vascular, la regulación de reacciones inmunitarias, el control del crecimiento de células vasculares, la regulación del crecimiento de células hematopoyéticas, la síntesis de componentes de la matriz extracelular, y la síntesis, secreción y regulación metabólica de otras sustancias biológicamente activas** (36). En la figura 2 se ejemplifican algunas de estas funciones.

Permeabilidad vascular. El endotelio es permeable a H_2O , moléculas solubles y algunas macromoléculas. El mantenimiento de una barrera de permeabilidad normal es controlado por toda una serie de factores estructurales y bioquímicos. Las estructuras involucradas incluyen a las vesículas pinocíticas que transportan macromoléculas a través del endotelio, y también pudieran representar un pequeño sistema

Figura 2. Endotelio y control de la homeostasis vascular



Pearson, 1991 (161)

ENDOTELIO Y CONTROL DE LA HOMEOSTASIS VASCULAR

de poros; las uniones intercelulares, aparentemente impermeables en vasos arteriales y la mayoría de los capilares, pero esencialmente abiertas en vénulas; y la membrana basal que restringe temporalmente la entrada al espacio extravascular de partículas grandes (36). Los componentes bioquímicos incluyen a las moléculas aniónicas sobre la superficie endotelial, y sobre la membrana basal (36).

Propiedades anti-trombogénicas, anti-coagulantes, anti-plaquetarias, y control del tono vascular. La superficie anti-trombogénica del endotelio se mantiene por un equilibrio entre propiedades anticoagulantes y procoagulantes. Una trombosis venosa suele ocurrir en áreas de bajo flujo sanguíneo, y las células endoteliales poseen muchas enzimas que influyen el flujo, la presión, y el tono vascular. Entre las sustancias que participan en la función anti-trombótica del endotelio, se encuentran la prostaciclina (PGI_2), el factor de relajación derivado de endotelio (EDRF) u óxido nítrico (NO), endotelina, inhibidores de agregación y adhesión plaquetaria, capaces de inducir vasoconstricción, activando la secreción de renina, que actúa sobre el angiotensinógeno, a su vez convertido en angiotensinas I y II, desactivando así el vasodilatador bradiquinina (121,161,171). Por otra parte, sustancias como la prostaciclina y el EDRF también, ciertos leucotrienos (LTC_4), las angiotensinas A y C, y la adenosina pueden inducir una vasodilatación al inactivar sustancias como la norepinefrina, la serotonina, y la histamina, interfiriendo así con la activación plaquetaria (161). También la activación de la proteína C/S por la acción de trombomodulina, la unión de la antitrombina III a moléculas tipo-heparina, el activador de plasminógeno de tejido (tPA), son potentes agentes anti-trombóticos (36). Entre las sustancias que poseen una función protrombótica, se encuentran el factor de tejido (TF), el factor V, el inhibidor de tPA, el factor de activación plaquetaria (PAF), el factor de von Willebrand, y la unión de los factores IXa, Xa, XII (inductor del factor de Hageman) (36,117,161). Las células endoteliales *in vivo* son esencialmente no-trombogénicas, y las plaquetas no estimuladas no se adhieren a la superficie de las células endoteliales. *In vitro*, las plaquetas se adhieren al subendotelio. Entre las actividades anti-plaquetarias también se encuentran las sustancias 6-keto-PGE₁, 13-HODE (ácido hidroxiocetadecadienóico), y la cGMP (aumento inducido por EDRF) (161). Entre las actividades anti-coagulantes se encuentra la antitrombina III, las

de poros; las uniones intercelulares, aparentemente impermeables en vasos arteriales y la mayoría de los capilares, pero esencialmente abiertas en vénulas; y la membrana basal que restringe temporalmente la entrada al espacio extravascular de partículas grandes (36). Los componentes bioquímicos incluyen a las moléculas aniónicas sobre la superficie endotelial, y sobre la membrana basal (36).

Propiedades anti-trombogénicas, anti-coagulantes, anti-plaquetarias, y control del tono vascular. La superficie anti-trombogénica del endotelio se mantiene por un equilibrio entre propiedades anticoagulantes y procoagulantes. Una trombosis venosa suele ocurrir en áreas de bajo flujo sanguíneo, y las células endoteliales poseen muchas enzimas que influyen en el flujo, la presión, y el tono vascular. Entre las sustancias que participan en la función anti-trombótica del endotelio, se encuentran la prostaciclina (PGI_2), el factor de relajación derivado de endotelio (EDRF) u óxido nítrico (NO), endotelina, inhibidores de agregación y adhesión plaquetaria, capaces de inducir vasoconstricción, activando la secreción de renina, que actúa sobre el angiotensinógeno, a su vez convertido en angiotensinas I y II, desactivando así el vasodilatador bradiquinina (121,161,171). Por otra parte, sustancias como la prostaciclina y el EDRF también, ciertos leucotrienos (LTC_4), las angiotensinas A y C, y la adenosina pueden inducir una vasodilatación al inactivar sustancias como la norepinefrina, la serotonina, y la histamina, interfiriendo así con la activación plaquetaria (161). También la activación de la proteína C/S por la acción de trombomodulina, la unión de la antitrombina III a moléculas tipo-heparina, el activador de plasminógeno de tejido (tPA), son potentes agentes anti-trombóticos (36). Entre las sustancias que poseen una función protrombótica, se encuentran el factor de tejido (TF), el factor V, el inhibidor de tPA, el factor de activación plaquetaria (PAF), el factor de von Willebrand, y la unión de los factores IXa, Xa, XII (inductor del factor de Hageman) (36,117,161). Las células endoteliales *in vivo* son esencialmente no-trombogénicas, y las plaquetas no estimuladas no se adhieren a la superficie de las células endoteliales. *In vitro*, las plaquetas se adhieren al subendotelio. Entre las actividades anti-plaquetarias también se encuentran las sustancias 6-keto-PGE₁, 13-HODE (ácido hidroxióctadecadienóico), y la cGMP (aumento inducido por EDRF) (161). Entre las actividades anti-coagulantes se encuentra la antitrombina III, las

proteínas C y S (inactivan a la trombina), el inhibidor de coagulación lípido-asociado (inhibidor del factor tisular TF), y la proteasa nexina que inactiva a la trombina (36, 99, 161). Así pues, el tono vascular del endotelio está regulado en forma equilibrada por la secreción de vasodilatadores y vasoconstrictores. En la tabla I se mencionan las sustancias que contribuyen a la homeostásis del endotelio vascular (161).

Crecimiento vascular y angiogénesis. Las células endoteliales sintetizan y liberan diversos factores que modulan la proliferación de células mesenquimales y hematopoyéticas, que pueden ser importantes en las respuestas al daño tisular. Entre los factores de crecimiento que afectan a las células endoteliales, se encuentra el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), IL-1, el factor estimulador de colonias granulocíticas-monocíticas (CSF-GM), y otros factores derivados del endotelio como EDGF. Entre los inhibidores de crecimiento se encuentran moléculas tipo-heparina, y por otra parte, los Interferones α y β (36). Tanto las células endoteliales como las células de músculo liso proliferan bajo una variedad de estímulos, liberando factores que a su vez, pueden inhibir el crecimiento de células mesenquimales y hematopoyéticas, desarrollando un gradiente en la respuesta de células vasculares ante estímulos mitogénicos. El fenómeno de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), requiere tanto la migración y proliferación de células endoteliales, como la degradación de matriz extracelular por medio de proteasas. Existe una variedad de factores angiogénicos, siendo los factores de crecimiento fibroblástico los más conocidos (FGF ácidos y básicos). El FGF induce angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* (36).

b) Reactividad Inmune e Inflamación

Una de las funciones de mayor interés y que conciernen a este trabajo, es la **función del endotelio vascular como regulador de procesos inflamatorios y mediador de reacciones Inmunes.** El endotelio participa en reacciones inmunes de distintos modos; modula el tráfico de linfocitos a órganos linfoides, sirve como una célula presentadora de antígeno accesoria durante respuestas inmunes

Tabla I. Sustancias de células endoteliales involucradas en la homeostasis vascular.

**Sustancias de células endoteliales
y homeostasis vascular** (Pearson JD, 1991). (161)

PRODUCTO	FUNCIÓN
Moléculas secretadas	
<u>Bajo peso molecular (lábilis)</u>	
Prostaciclina, óxido nítrico	Función plaquetaria, tono vascular
Factor activador de plaquetas (PAF)	Activación plaquetaria y leucocitaria
<u>Alto peso molecular</u>	
Factor de von Willebrand (vWF)	Adhesión plaquetaria, coagulación
Activador de plasminógeno de tejido (tPA), Inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1)	Fibrinólisis
Interleucina-1, Interleucina-6, factores estimuladores de colonias	Función leucocitaria
Factores de crecimiento, enzimas degradadoras de matriz, proteoglicanos de matriz	Crecimiento vascular y angiogénesis
Moléculas expresadas en superficie	
Moléculas de adhesión leucocitaria (ELAM-1, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1)	Adhesión leucocitaria y migración
Complejo principal de histocompatibilidad clase II	Sistema inmune, activación linfocitaria
Trombomodulina	Coagulación
Factor tisular (TF)	Coagulación
Sitios de unión de factores Va, Xa, XIa	Coagulación
Ectonucleotidasa, enzima convertidora de angiotensina	Tono vascular, función plaquetaria
<p>ELAM-1 = molécula de adhesión leucocitaria endotelial-1 ICAM-1, -2 = molécula de adhesión intercelular -1, -2 VCAM-1 = molécula de adhesión celular vascular-1</p>	

primarias y secundarias, y actúa como un blanco en respuestas inmunes alogénicas, y en algunas formas de autoinmunidad (36).

La inflamación se define como una acumulación local de leucocitos, proteínas de plasma, y fluido, usualmente en el sitio extravascular de un daño tisular, infección, o estimulación antigénica (171). En circunstancias normales, la inflamación es parte de la reacción de defensa del hospedero e involucra la erradicación de agentes infecciosos, o la reparación, pero puede ser intrínsecamente destructiva en tejidos adyacentes. La respuesta inflamatoria puede ser inmediata (5-30 min), temprana (2-6 horas), o tardía (12-48 horas) (171). Como veremos más adelante, el proceso inflamatorio, en sus respuestas extremas, puede llegar a ser fuertemente nocivo, y convertirse en un fenómeno crónico.

La célula endotelial como célula presentadora de antígeno. El reconocimiento antigénico se lleva a cabo gracias a la participación de linfocitos T_H cooperadores, y exige tanto el procesamiento del antígeno como la formación de un complejo entre el antígeno y el complejo principal de histocompatibilidad MHC clase II (173). Entonces se lleva a cabo la proliferación de linfocitos T específica de antígeno. Existe evidencia considerable de que las células endoteliales son capaces de actuar como células presentadoras de antígeno *in vitro* (36). Pober y Gimbrone han establecido que los determinantes de clase II son inducibles por incubación con el mitógeno PHA en cultivos de células endoteliales bajo presencia de linfocitos T (36). La inducción de determinantes clase I y II, y la expresión de IL-1 de membrana, también se ha determinado por medio de la acción de interferón gamma (IFN- γ) (36). Otros estudios han demostrado que linfocitos T CD8+ pueden ser activados alogénicamente, en ausencia de la ayuda de linfocitos T CD4+, al coestimularlos con células endoteliales en presencia de IL-2, con lo cual pudiera existir una respuesta de memoria por parte de las células CD8+ (57,204).

Activación endotelial. Las células endoteliales estimuladas pueden alterar su estado funcional de forma específica, y a menudo, de manera reversible, sin perder su integridad estructural. Pueden presentar funciones efectoras nuevas o aumentadas, que se caracterizan por una mayor síntesis y secreción de

sobre su superficie celular (36). Diversos estímulos alteran la función y estructura endotelial, ocasionando incrementos en mecanismos como la pinocitosis y la replicación celular, la secreción de PGI_2 , adhesión leucocitaria, acumulación intravascular de fibrina, hipertrofia endotelial, y reorganización tanto citoesquelética, como de unión intercelular (36, 171). Dichas alteraciones incluyen también un incremento en la permeabilidad de fluido, y en cambios morfológicos de la célula en cuestión; las células endoteliales sufren una contracción rápida (aparentemente mediada por la acción de moléculas como calmodulina y la cinasa de la cadena ligera de miosina) (171). En la tabla II se muestran algunos de los efectos de la activación de células endoteliales durante procesos inflamatorios. En el momento del daño endotelial, las células sufren una retracción, despojamiento de proteínas de superficie, y algunas veces lisis (171). Por ello, las alteraciones del endotelio durante su activación en procesos inflamatorios, son conocidos como **disfunción endotelial** (36). Este tipo de alteraciones se llevan a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* (36).

Al exponerse a señales ambientales, como citocinas, las células endoteliales exhiben cambios profundos en expresión génica y en función. Las respuestas son rápidas (segundos a minutos), y de acción prolongada. Es menester aclarar que las células endoteliales son, tanto blanco, como sintetizadoras de citocinas, cuyas funciones llegan a ser diversas, específicas, y distintas (140). Las citocinas mejor caracterizadas por su efecto sobre células endoteliales son lo que se conoce como "el trío inflamatorio": la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF), y el lipopolisacárido bacteriano (LPS) (76,78,199). Bajo dichos estímulos, las células endoteliales producen citocinas como IL-1 (regulación autócrina), interferón- γ (IFN- γ), IL-4, IL-6, IL-8, factor de crecimiento tumoral (TGF- β), y otros factores como la proteína Gro α , la proteína quimiotáctica monocítica (MCP), el factor de permeabilidad vascular (VPF), los factores estimuladores de colonias (CSFs), y la lipoproteína de baja densidad-mínimamente modificada (MM-LDL), tienen efectos profundos sobre las funciones vasculares del endotelio (140,181). En la tabla III, se describen en forma resumida los efectos de dichas citocinas producidas por el endotelio. La tabla IV y la figura 3 también describen más en detalle qué tipo de

Tabla II. Respuestas endoteliales de inflamación

Algunas respuestas endoteliales de inflamación

(Cotran, RS, 1989) (161)

Formación de aperturas interendoteliales

Mediadores químicos (la mayoría)

Dano directo-prolongado

Necrosis endotelial y "despavimentación"

Dano directo por agentes exógenos

Agentes exógenos (? radicales derivados de oxígeno)

Alteraciones de funciones endoteliales (constitutivas o inducibles)

Pinocitosis incrementada

Replicación celular alterada

Adhesión leucocitaria incrementada

Trombogenicidad incrementada

Producción de mediadores incrementada (PGI₂, PAF, IL-1)

Expresión de determinantes de MHC clase I y clase II incrementada

Inducción de nuevas proteínas de superficie (ELAM-1, etc.)

Proliferación endotelial y angiogénesis

PGI₂ = Prostaciclina

PAF = factor activador de plaquetas

IL-1 = interleucina 1

MHC = complejo principal de histocompatibilidad

ELAM-1 = molécula de adhesión leucocitaria endotelial - 1

funciones ejercen las citocinas IL-1, TNF, y LPS sobre las células endoteliales.

Recientemente, Brizzi y colaboradores (23), mostraron que la IL-3 también es capaz de estimular la proliferación de células endoteliales humanas, y de inducir la expresión del gen que codifica a ELAM-1. El LPS y la IL-6 son capaces de inducir la expresión de ELAM-1 sobre células endoteliales humanas *in vitro* (223). Claramente, el factor TNF- α induce la adhesión de células mononucleares de sangre periférica en células endoteliales humanas *in vitro* (97).

Recientemente también se ha establecido que la IL-2 es capaz de inducir la adhesión de células citotóxicas naturales (NK) a células endoteliales humanas *in vitro*, lo cual pudiera llegar a ser un mecanismo de daño endotelial (6). También se ha identificado a una proteína denominada proteína de adhesión linfocítica-vascular-2 (LVAP-2) de 70 kD, expresada constitutivamente en células endoteliales humanas de vena umbilical, y cuya función principal es la adhesión de linfocitos al endotelio (2). La IL-4 y el factor TNF- α son también capaces de inducir adhesión linfocitaria (sangre periférica) a endotelio humano por vías distintas de adherencia (69). Así pues, existe un número importante de factores de activación de células endoteliales, que demuestra la facilidad con la que el endotelio responde ante una serie de estímulos para generar respuestas de defensa rápidas y efectivas. En la figura 4, se ejemplifica el efecto de algunas citocinas sobre el endotelio vascular, y cómo los efectos de éstas se relacionan dentro de la vasta gama de funciones del endotelio (140).

Expresión génica. Las células endoteliales de distintos orígenes exhiben cierta heterogeneidad con respecto a sus respuestas de reparación de daño tisular. Las respuestas endoteliales de daño agudo, o de estímulo inflamatorio ocurren durante los primeros 15 minutos, y son independientes de una síntesis de RNA mensajero, o de proteínas sintetizadas *de novo* (78). Pero, ¿cómo sabe una célula endotelial cuándo ha sido dañada? El daño depende de la acción de factores que afectan la presión del flujo sanguíneo, así como del estrés de torsura ("shear stress"). En ese momento se lleva a cabo una activación de canales iónicos, así como la generación de péptidos vasoactivos (78). A partir de entonces, comienzan a expresarse toda una serie de genes, que controlan la activación del endotelio, y sus

Tabla III. Citocinas quimiotácticas y activadoras de leucocitos, producidas por células endoteliales

Tabla IV. Actividades de células endoteliales inducidas por citocinas

Citocinas quimiotácticas y activadoras de leucocitos, producidas por células endoteliales. (Mantovani, A. 1992). (140)

CITOCINA	ESTÍMULO	BLANCO CELULAR	EFFECTO
IL-1	IL-1, TNF, LPS	Diversos, L, MO	Inflamación; respuesta de fase aguda, hematopoyésis
IL-6	IL-1, TNF, LPS IL-4	Diversos, L	Respuesta de fase aguda, hematopoyésis
IL-8	IL-1, TNF, LPS	N, B, L, Mel.	Reclutamiento leucocitario
Gro- α	IL-1, TNF	N, Mel.	Reclutamiento leucocitario
MCP	IL-1, TNF, LPS MM-LDL, IL-4	MO	Reclutamiento leucocitario
G, GM, M-CSF	IL-1, TNF	N, E, MO	Hematopoyésis, reclutamiento leucocitario y activación

L = linfocitos MO = monocitos N = neutrófilos B = basófilos E = eosinófilos Mel. = melanoma
MCP = proteína quimiotáctica monocítica G = granulocitos GM = granulocitos/monocitos
M-CSF = factor estimulador de colonias de monocitos
MM-LDL = lipoproteína de baja densidad mínimamente modificada

Actividades de células endoteliales inducidas por citocinas (Cotran, RS. 1989). (161).

CATEGORÍA	FUNCIÓN	CITOCINAS
<u>Coagulación</u>	Incremento en la expresión del TF	IL-1, TNF, LT
	Decremento en la expresión de la proteína C activada por trombosodulina	IL-1, TNF, LT
	Decremento en la expresión de PA	IL-1, TNF, LT
	Incremento en la expresión de PAI	IL-1, TNF, LT
<u>Inflamación</u>	Incremento en la expresión de PAF, PGI ₂	IL-1, TNF, LT
	Expresión de ELAM-1	IL-1, TNF, LT
	Incremento en la secreción de IL-1	IL-1, TNF, LT
	Incremento en la secreción de CSF	IL-1, TNF, LT
<u>Inmunidad</u>	Morfología "HEV"	IL-1, TNF, LT, IFN- γ
	Expresión de ICAM-1	IL-1, TNF, LT, IFN- γ
	Incremento en la expresión de MHC clase I	TNF, LT, IFN- α , β , γ
	Incremento en la expresión de MHC clase II	IFN- γ
	Incremento en la expresión de IL-1 de membrana	TNF, LT

TF = factor tisular
PA = activador de plasminógeno
PAI = inhibidor del factor de plasminógeno
PGI₂ = Prostaciclina
ELAM-1 = molécula de adhesión leucocitaria endotelial-1
IL-1 = interleucina-1
ICAM-1 = molécula de adhesión intercelular-1
CSF = factor estimulador de colonias
HEV = vénulas de endotelio alto
MHC = complejo principal de histocompatibilidad
LT = linfoxina, e.g. LPS (lipopolisacárido bacteriano)

Figura 3. Funciones endoteliales involucradas en la homeostasis
e inflamación moduladas por IL-1 y TNF
APC = células presentadora de antígeno;
PAF = factor activador de plasminógeno; TM = trombomodulina;
PAI = Inhibidor del activador de plasminógeno;
PGI2 = prostaciclina; NO = óxido nítrico

FUNCIONES ENDOTELIALES INVOLUCRADAS EN LA HOMEOSTASIS E INFLAMACIÓN MODULADAS POR IL-1 Y TNF

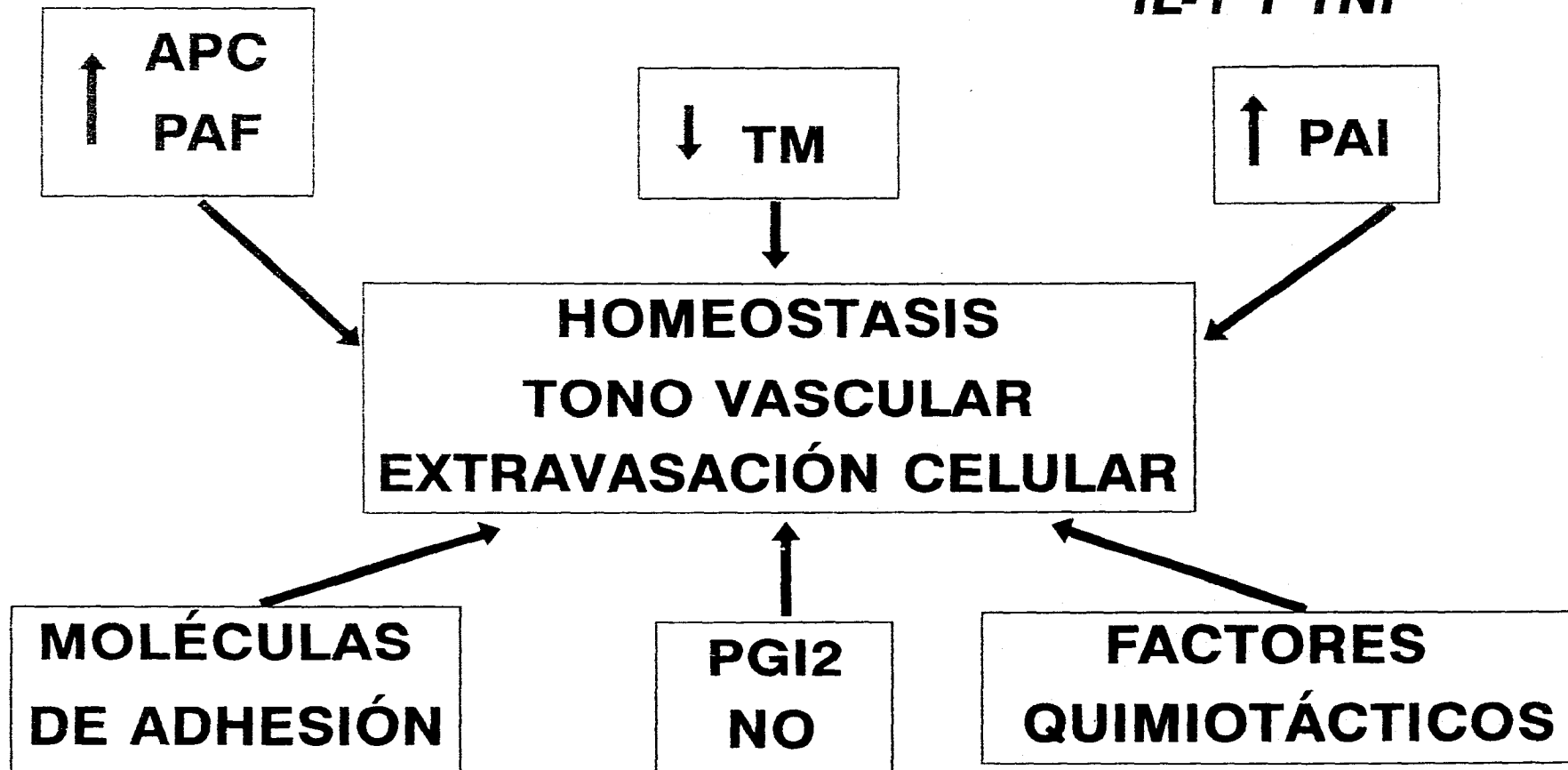
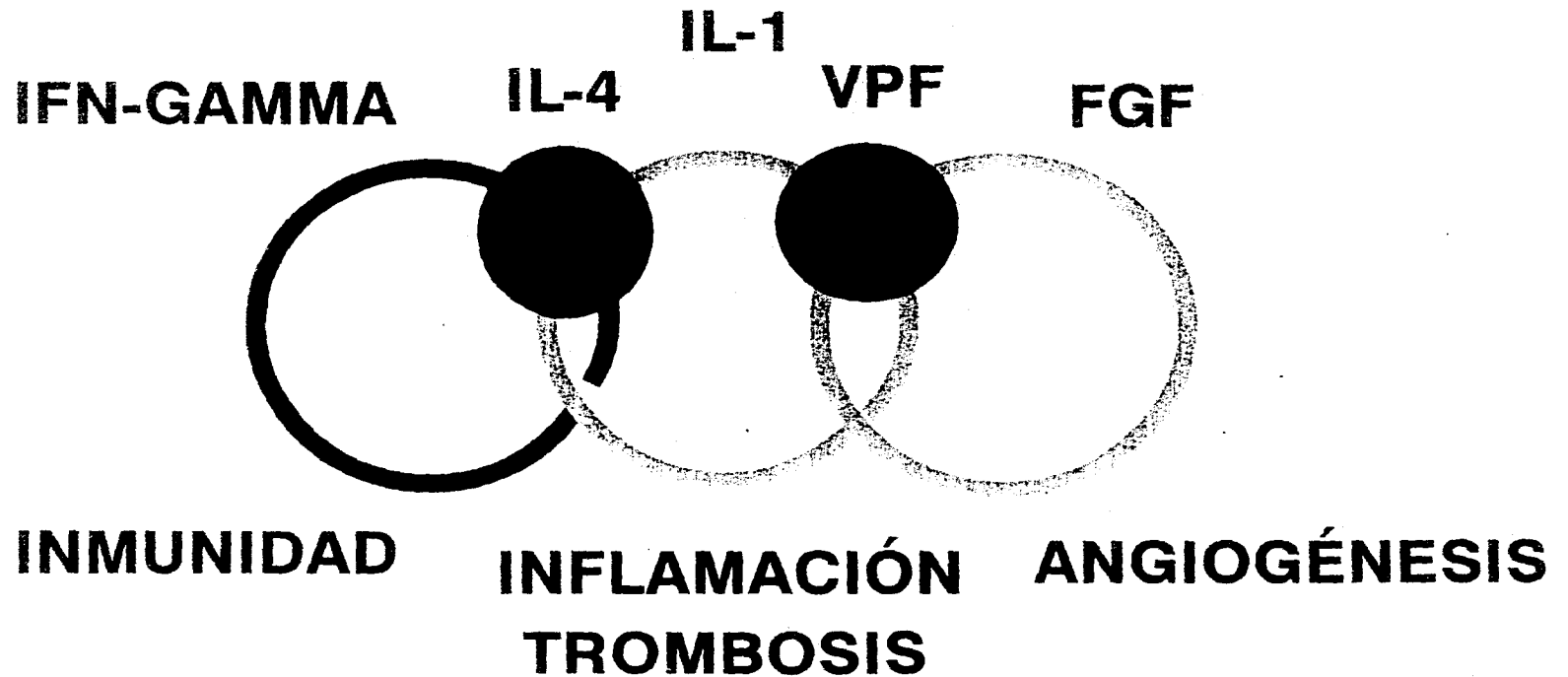


Figura 4. Espectro de acción de citocinas prototípicas
sobre células endoteliales

VPF = factor peptídico vasoactivo;
FGF = factor de crecimiento fibroblástico

ESPECTRO DE ACCIÓN DE CITOCINAS PROTOTÍPICAS SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES



Mantovani et al.
1992 (140)

funciones subsecuentes. En la tabla V figuran varios genes expresados sobre todo en las etapas iniciales del proceso inflamatorio (78).

También se lleva a cabo durante una etapa temprana la activación en células endoteliales de los genes c-fos y c-jun por medio de la acción de FGF, TNF- α , y ésteres de forbol (78). El PMA (acetato de miristato de forbol) induce la expresión de los genes edg-1 y edg-2 que codifican para ciertos receptores de proteínas G. El TNF induce la expresión de los genes B12 y A20, cuya función es similar a aquella de fos (proliferación, división celular) (78). Ciertos glucocorticoides y PMA inducen la expresión de los genes GRE (genes de respuesta a glucocorticoides), cuya función es esencial en la inhibición de respuestas inflamatorias por medio del endotelio (78). La expresión del gen NF- κ B también es sumamente importante, pues es un regulador que acompaña los transcritos de diversas moléculas de MHC, GM-CSF, IL-6, urokinasa, ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, y es inducida por TNF- α,β , IL-1, LPS, ésteres de forbol, luz UV, y ciertos virus (78). La expresión génica está sujeta a una regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional, y esto es de suma importancia, pues ciertos defectos en la estabilización del RNA mensajero pudieran reflejar anomalías, conllevando al desarrollo de una inflamación crónica (13,78).

Tráfico leucocitario y extravasación. En el organismo existe una recirculación continua de linfocitos, entre el flujo sanguíneo, y el sistema linfático a través de los órganos linfoides, lo que se conoce como "vigilancia inmunitaria" tejido-específica (105). Los neutrófilos y los monocitos también viajan a órganos linfoides y no-linfoides, pero la cinética de su entrada a éstos es distinta; mientras que los neutrófilos penetran en etapas tempranas de la fase aguda inflamatoria, los monocitos y linfocitos penetran en una fase crónica más tardía (105). Los linfocitos se adhieren a células endoteliales a través de receptores especializados en vasos sanguíneos, en ganglios linfáticos, y placas de Peyer, de donde migran particularmente a la circulación sanguínea, y luego entre las células de la pared endotelial (99). La adhesión al endotelio vascular precede, o es un requisito para la migración leucocitaria hacia el tejido subyacente (105). Ésta se lleva a cabo en regiones del endotelio vascular que poseen células

Tabla V. Genes regulados en células endoteliales durante una respuesta a un daño o estímulo inflamatorio

Genes regulados en células endoteliales durante una respuesta a un daño o estímulo inflamatorio (Gerritsen, ME. 1993) (78)

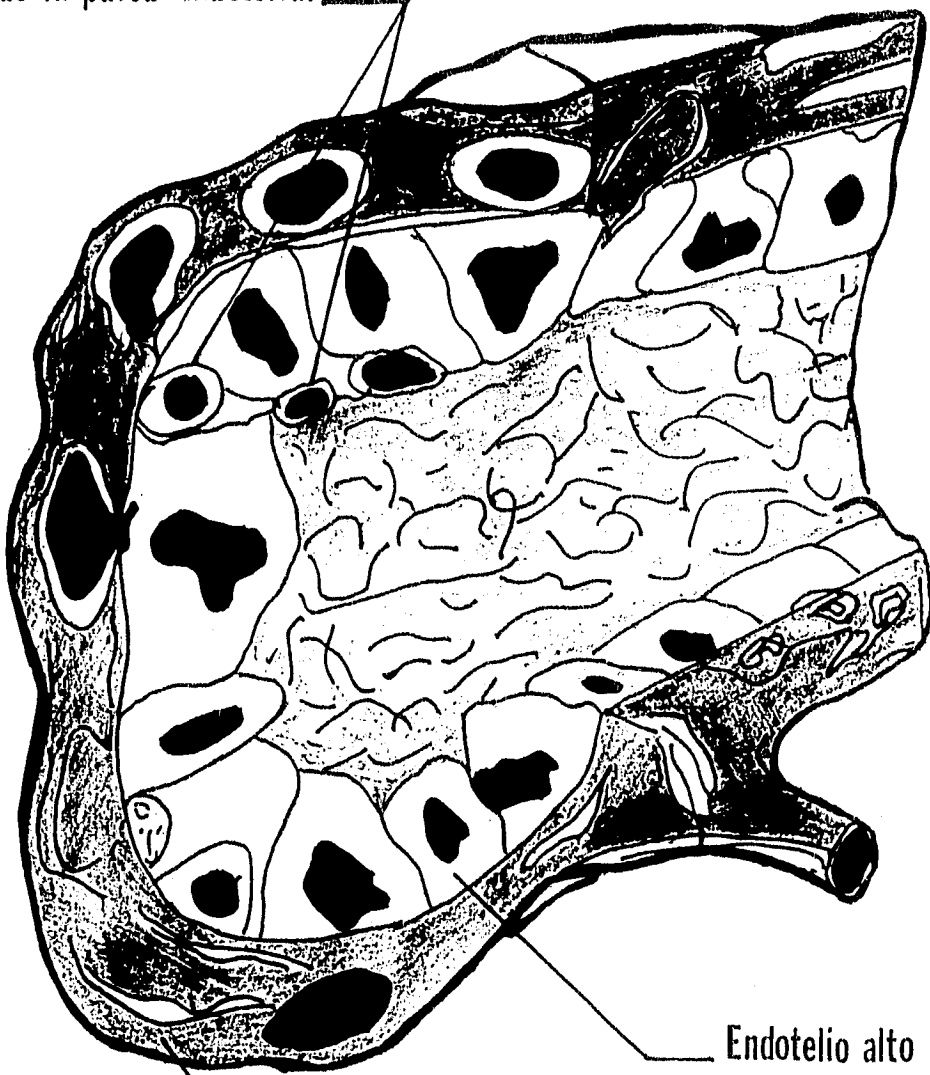
PRODUCTO GÉNICO	FUNCIÓN	
Remodelación de matriz/trombosis/coagulación		
PAI-1	Inhibidor de uPA (urokinasa) y tPA	
uPA, tPA	Activación de plasminógeno y plasmina Degradación de matriz, fibrinólisis Activación de TGF- β	
Colagenasa	Degradación de matriz, remodelación	
Factor tisular	Cofactor de activación de la vía de coagulación	
Vitronectina	Integrina, se une al receptor de vitronectina	
Interacciones leucocitarias/endoteliales		
ELAM-1	Selectina, se une a ligandos sobre PMNs, L, MO	
PECAM-1	Selectina, se une a ligandos sobre PMNs.	
ICAM-1	Superfamilia de las inmunoglobulinas, se une a ligandos sobre PMNs, MO, L, macrófagos	
VCAM-1	Superfamilia de las inmunoglobulinas. Se une a VLA4 sobre L, MO.	
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad, presenta una estructura específica blanco a células T citotóxicas	
MHC-II	Presentación de antígeno soluble a células T citotóxicas	
IL-6	Factor de crecimiento células B	
IL-8	Factor quimiotáctico de neutrófilos	
MCP	Factor quimiotáctico de monocitos	
IL-1 β	Citocina de inflamación	
Tono vascular e interacciones plaquetarias		
COX	Síntesis de PGI $_2$ y PGE $_2$	
NO-sintetasa	Síntesis de NO (EDRF)	
Endotelina	Vasoconstrictor, mitógeno	
Factores de crecimiento		
M-CSF, GM-CSF	Inducen la formación de colonias monocíticas y macrofágicas a partir de células precursoras	
PDGF	Mitógeno para células de músculo liso	
TGF- β	Promotor e inhibidor de crecimiento	
bFGF	Mitógeno de diversos tipos celulares	
PMN = neutrófilos	VLA4 = very late antigen 4	TGF = factor de crecimiento tumoral
bFGF = factor de crecimiento fibroblástico básico	L = linfocitos	M = monocitos

especializadas cuboides y "altas"; estas regiones se conocen como "vénulas de endotelio alto" (HEV = high endothelial venules). En la figura 5, se esquematiza la migración de linfocitos a través de la pared endotelial en regiones HEV. Todos los órganos linfoides secundarios con la excepción del bazo poseen HEVs (105, 106). La mayoría de los linfocitos maduros en reposo son capaces de reconocer HEVs en todos los tejidos linfoides, y los linfocitos, en etapas subsecuentes (posiblemente linfocitos de memoria) expresan sistemas de reconocimiento de HEVs únicos y completamente específicos. El reconocimiento de HEVs se debe a receptores sobre la superficie linfocitaria, llamados **receptores de "reclutamiento"**, o **homing receptors**. Estos receptores reconocen a unas moléculas de adhesión llamadas **adresinas** sobre la superficie de los HEVs. El antígeno Hermes, CD44 = H-CAM, se encuentra fuertemente involucrado en la mediación de dichas interacciones entre linfocitos y HEVs (105,215).

Así pues, el endotelio es una barrera permeable, que durante la iniciación de procesos inflamatorios, y en presencia de un daño tisular, inicia la migración de las células inmunes a través de sus paredes, para liberarlas al torrente sanguíneo y a espacios intercelulares tisulares, llegando así hasta el sitio del daño. Las células que se adhieren y migran a través de la monocapa endotelial en los sitios de inflamación son células polimorfonucleares (neutrófilos), monocitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, linfocitos T y B, y células NK no T/no B (6,99,156). Las células se adhieren a las células endoteliales por medio de sus receptores, a receptores constitutivos e inducibles sobre las células endoteliales. La migración que se lleva a cabo a través de la barrera endotelial a los espacios extravasculares se llama **extravasación**. La expresión de moléculas sobre la superficie endotelial cambia a medida que la adhesión procede en función del tiempo, mientras que la expresión de moléculas en la superficie leucocitaria cambia durante la transmigración o extravasación (171).

**Figura 5. Corte transversal de un vaso sanguíneo.
Esquema de la migración de linfocitos a través
de la pared endotelial en regiones HEV (115)**

Linfocitos migrando a través
de la pared endotelial



Endotelio alto
(HEV)

Membrana basal

c) Daño vascular

Hemos visto que las células endoteliales pueden sufrir daños profundos a consecuencia de los procesos normales o supra-normales de inflamación. Existen dos tipos de daño endotelial; en el primer tipo, **daño Inmunogénico**, el daño se lleva a cabo virtualmente a corto plazo, donde surgen aperturas entre las células endoteliales como resultado de la contracción de éstas por agentes vasoactivos (histamina, serotonina, bradiquinina, C3a, C5a, PAF, y algunos leucotrienos (36). El segundo tipo de daño se conoce como **daño vascular**, y se caracteriza por una necrosis endotelial, que induce una permeabilidad incrementada, y frecuentemente, la aparición de un trombo local. Este tipo de daño es el resultado del efecto directo de quemaduras, agentes químicos, sustancias locales, o radicales libres derivados de oxígeno (36).

Sin embargo, es relevante hacerse la pregunta de por qué algunos de estos cambios endoteliales pueden ser tan prolongados, y por qué son específicos de ciertas regiones vasculares...

Podría deberse, entre algunas posibilidades, a la presencia crónica de niveles elevados de citocinas; a cambios en la composición de la matriz extracelular; a alteraciones en las funciones de tejidos circundantes; a diferenciaciones celulares irreversibles (78).

Existe evidencia para sugerir que las células endoteliales pueden ser dañadas por reacciones mediadas humoralmente en algunos tipo de enfermedad autoinmune, como es el caso de Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) - donde se ha reportado la existencia de anticuerpos antiendotelio - y en algunos casos de vasculitis (36,155). De hecho, la existencia de anticuerpos humanos contra endotelio vascular se conoce desde hace dos décadas, y con el advenimiento del cultivo de células endoteliales de cordones umbilicales, se han mejorado las técnicas de detección (155). Actualmente, el área más amplia de estudio comprende las enfermedades reumáticas generalizadas, donde se estima que un daño patogénico puede ser el principio de un daño vascular autoinmune (28,155). Sin embargo, la prevalencia, interacciones y especificidad antigénica de los anticuerpos contra endotelio vascular aún no se ha definido. Dentro de esta búsqueda se ha incluido la correlación de anticuerpos en síndromes vasculíticos - no siempre consistente - con otros anticuerpos, tales como antineutrófilo o antifosfolípido (155).

Así pues, el endotelio representa un tejido con grande potencial de intervención terapéutica, donde se contempla la posibilidad de interferir con procesos inflamatorios excesivos, como por ejemplo, al bloquear la acumulación de complejos antígeno/anticuerpo, o al bloquear la interacción de anticuerpos contra endotelio que iniciasen un daño vascular.

2) Participación de las moléculas de adhesión celular en procesos inflamatorios

a) Moléculas de adhesión celular (MAC)

Las moléculas de adhesión celular (MAC) son células esenciales en los procesos de adhesión y migración leucocitaria a través de vasos sanguíneos durante un fenómeno inflamatorio. Algunas de ellas median activamente los procesos de adhesión y extravasación. Las MAC se definen a partir de las siguientes familias: las **selectinas**, las **Integrinas**, la **superfamilia de las Inmunoglobulinas**, y de otras moléculas como las **adhesinas** y las **caderinas**. Las MAC tienen funciones importantísimas en **respuestas Inmunes** (inducción, regulación, fase efectora), en la **localización preferente de células Inmunes ("Homing")**, en **Inflamación**, en **metástasis**, y en otros procesos como **clatrización**, **reabsorción ósea**, etc. (Roberto González-Amaro, comunicación personal, 1993).

Las MAC tienen características específicas que las agrupan, por ejemplo: su **expresión es variable** (en distintos tipos celulares, y en un mismo tipo dependiendo de la maduración, estado de activación, etc. celular), **se activan**, y **generan señales de activación bidireccionales** (80,81). Las MAC se liberan a la circulación sanguínea (niveles basales), y las MAC solubles poseen propiedades anti-inflamatorias (169).

- Selectinas -

Las selectinas son MAC que tienen una estructura molecular común, caracterizada por un dominio de **lectina N-terminal** (que es homólogo a una variedad de lectinas tipo-C calcio-dependientes); por lo tanto son **lectinas**; un dominio de **factor de crecimiento epidérmico (EGF)**; una serie de dominios **regulatorios de complemento (CRP)**; un dominio **transmembranal**; y una **cola citoplásmica corta** (232). El dominio de lectina es esencial para la adhesión celular, aunque la región EGF parece tener un

papel de regulación muy importante (168). En la figuras 6 (17) y 7a (125), se esquematiza la estructura de los miembros de esta familia. Los tres miembros de esta familia **L-selectina**, **E-selectina (ELAM-1)**, y **P-selectina**, se encuentran involucrados en la adhesión leucocitaria al endotelio. En la tabla VI se muestra la distribución (expresión) de estas moléculas, así como los contra-receptores o ligandos que se conocen (17,39,53,73,74,125,145,160,183,212,232). Las selectinas reconocen proteínas sialiladas, e interaccionan con adresinas (L-selectina). Pero lo más importante que se sabe de las selectinas, es que intervienen en la fase inicial de la interacción leucocito-endotelio.

Mientras que la L-selectina es una molécula constitutiva, la P-selectina y la E-selectina no lo son, y para su expresión el endotelio tiene que estar activado. Se ha propuesto que la P-selectina y la E-selectina intervienen en procesos de inflamación leucocitaria y que la L-selectina participa activamente en la recirculación linfocitaria a través de ganglios linfáticos periféricos, así como en procesos de inflamación mediada por neutrófilos (129). La P-selectina y la E-selectina son más parecidas estructuralmente (125). Las tres selectinas se expresan activamente en HEVs (146). Más específicamente, la L-selectina reconoce tetrasacáridos sobre sus ligandos, la P-selectina, ligandos fucosialilados, y la E-selectina ligandos sialilados (183). La expresión de las selectinas vasculares suele ser transitoria salvo en tejidos crónicamente inflamados (73).

La **L-selectina**, expresada en leucocitos, es rápidamente secretada después de la activación celular (18). El dominio citoplásmico de la L-selectina regula la adhesión leucocitaria calcio dependiente (73, 110). Se ha identificado un determinante glucoproteico adicional, denominado Sialil Le^a en células cancerígenas (algunas leucemias) (109, 95, 67). La L-selectina, contrariamente a las P y E selectinas, disminuye su expresión al activarse el endotelio. De acuerdo con ciertos autores, es probable que la L-selectina intervenga en interacciones muy tempranas de leucocitos con las células endoteliales, seguida después de una unión más estable mediada por integrinas (73). Estudios recientes sugieren que la L-selectina puede ser reconocida por la P-selectina (73). Un grupo ha identificado al epítipo EL-246 sobre L-selectina y E-selectina *in vivo*, que funciona como un dominio crucial en la mediación de la adhesión leucocitaria (10).

Tabla VI. Moléculas de adhesión - Selectinas

SELECTINAS

CD	MOLÉCULA	C-RECEPTOR EN	EXPRESADA
CD62L	L-selectina (LECAM-1)	Adresinas vasculares sgp50	Leucocitos Monocitos
CD62E	E-selectina (ELAM-1)	Antígeno Sialil-Lewis X HECA-452	Endotelio
CD62P	P-selectina (PADGEM, Mel-14, GMP-140)	L-selectina (también otras glicoproteínas) Sialil-Lewis X	Plaquetas Endotelio

Figura 6. Estructura de las selectinas
EGF = dominio del factor de crecimiento epitelial

SELECTINAS

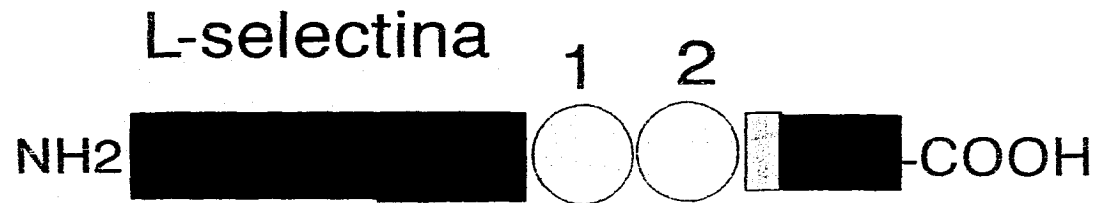
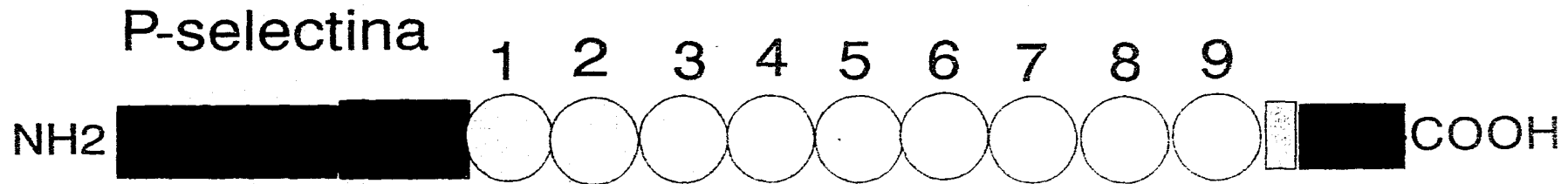
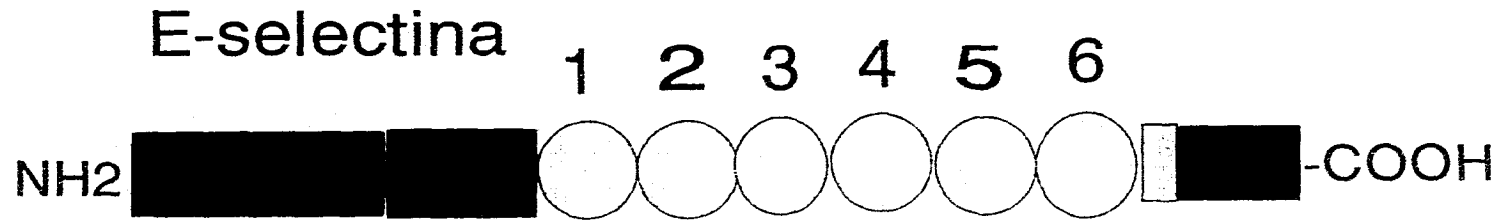
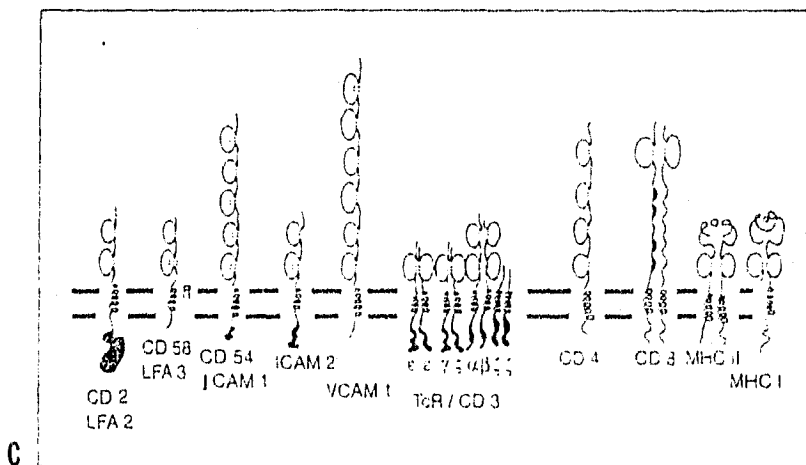
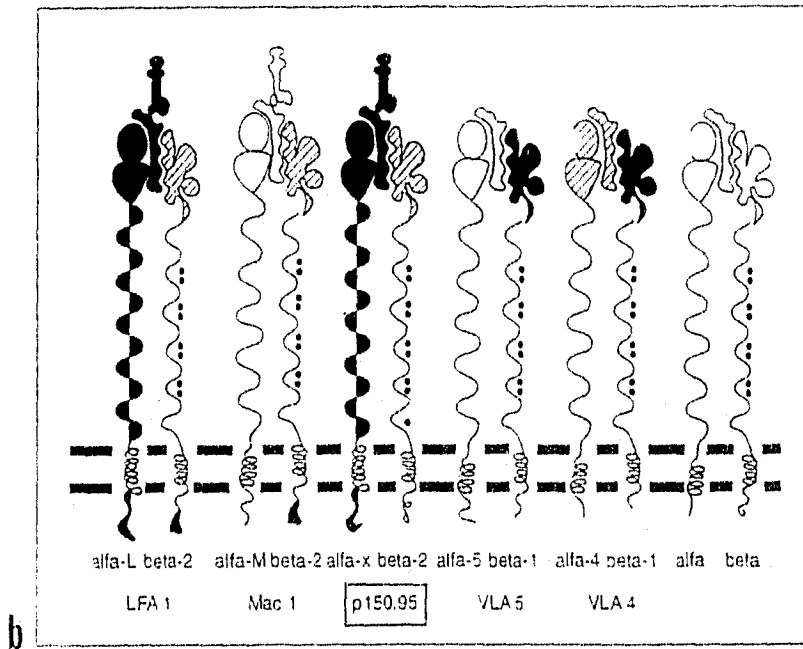
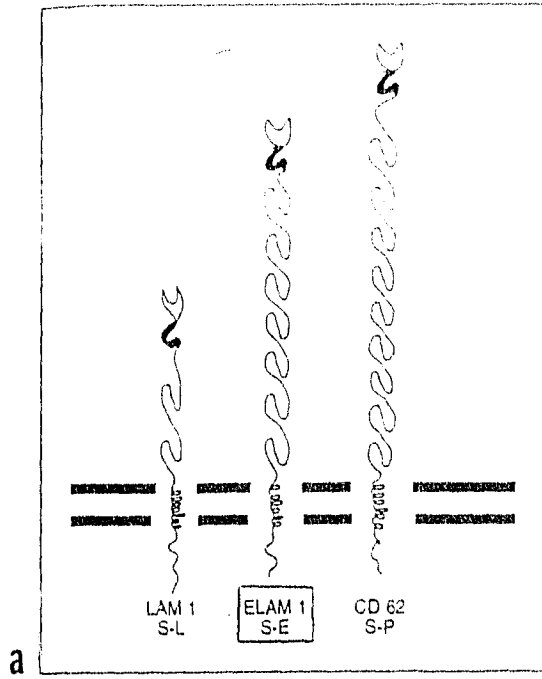


Figura 7. Estructura de ciertas moléculas de adhesión
a. Selectinas; b. Integrinas; c. Superfamilia de las Inmunoglobulinas



La E-selectina (ELAM-1) fue identificada por primera vez en 1987 por Bevilacqua y colaboradores (15,16). Es una molécula expresada exclusivamente en endotelio (células que se le adhieren: monocitos, neutrófilos, y subpoblaciones de células T y media la adhesión celular adhiriéndose al ligando Sialil-Le^x, que es un carbohidrato sobre la superficie celular de neutrófilos, células mieloides y algunas líneas tumorales (163). También reconoce a L-selectina sobre eosinófilos (15). La expresión de ELAM-1, (activada por citocinas como IL-1, TNF, y LPS), es óptima al cabo de 4-6 horas, y dura un lapso aproximado de 24 horas (68).

La ELAM-1 requiere la síntesis de un mayor número de proteínas que las demás selectinas. Las células endoteliales humanas de vena umbilical activadas por TNF internalizan a ELAM-1 por endocitosis constitutivamente; sin embargo, el significado de esta endocitosis y de la regulación de ELAM-1 sobre la membrana celular, aún no es claro (224). Los linfocitos T se adhieren a células endoteliales (HUVEC) estimuladas por IL-1 β , por medio de ELAM-1 *in vivo* e *in vitro* (82). Se ha descrito una proteína sérica denominada SDI (serum-derived inhibitor), normalmente presente en la fracción de α -globulina, que es capaz de inhibir la expresión tanto de ELAM-1, como de VCAM-1 e ICAM-1, en células endoteliales (207).

Picker y Butcher han demostrado que ELAM-1 funciona como una adhesina vascular de piel en sitios de inflamación crónica, es tejido-selectiva, y se expresa en endotelio, reclutando a linfocitos T de memoria, sobre la piel (164). Estos estudios fueron confirmados por el trabajo experimental de Shimizu y colaboradores quienes demostraron que la unión de linfocitos T a endotelio, vía ELAM-1, ocurría independientemente de la activación del endotelio, y que por ende, los linfocitos T eran de memoria. Se sabe ahora que ELAM-1 es crucial en la etapa de adhesión inicial al endotelio inflamado, así como en la migración preferencial de los linfocitos T hacia tejidos o sitios de inflamación (198). CLA (antígeno linfocítico cutáneo) es un antígeno (HECA-252) sobre la superficie de linfocitos T también reconocido por ELAM-1, especialmente en individuos sensibilizados, con altas concentraciones de CLA en la piel (187). *In vitro*, ELAM-1 media la adhesión de PMNs, monocitos, eosinófilos y células de ciertos carcinomas a células endoteliales (HUVEC). Y con respecto a linfocitos, solamente media la adhesión de linfocitos T de memoria a HUVEC (73).

La ELAM-1 se expresa en endotelio sinovial durante la evolución de artritis inducida, y puede ser detectada de forma no invasiva utilizando anticuerpos monoclonales marcados radioactivamente. Esta técnica de imagenología sobre ELAM-1 tiene un gran potencial para el estudio no invasivo de la activación endotelial en artritis y en otras enfermedades reumáticas (30). Se han encontrado, por medio de ELISA, niveles elevados de E-selectina sérica en pacientes con esclerodermia, vasculitis (PAN), y lupus eritematoso generalizado (29).

La **P-selectina** (células que se le adhieren: monocitos, neutrófilos, y subpoblaciones de células T) se encuentra almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade (endotelio), y en gránulos α (plaquetas), y su expresión es rápida (minutos) (75,201). Bajo estimulación por medio de trombina, histamina, substancia P, o peróxido, la P-selectina se expresa en la superficie celular (plaquetas y endotelio) (129). En cambio, la IL-1 y el TNF no inducen la expresión de P-selectina (232). La P-selectina captura a neutrófilos (131,137,191); los neutrófilos que expresan la P-selectina demuestran una capacidad calcio-dependiente de inducir la expresión de integrinas beta2, y se degranularizan, al ser estimulados por factores quimiotácticos. Otros estudios recientes han demostrado que la P-selectina se une a linfocitos T crónicamente estimulados (de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide), pero no se une a linfocitos T CD4+ en reposo (40).

- Integrinas -

Las integrinas son glucoproteínas formadas por heterodímeros polipeptídicos asociados de forma no covalente, constituidos por una **cadena alfa** y una **cadena beta**. Son glucoproteínas transmembranales con una **región extracelular** y una **porción citoplásmica**. Y la subunidad beta (CD29), es una proteína transmembranal con una **porción extracelular** y una **porción citoplásmica** que interviene en las señales de transducción (125).

En la figura 7b se esquematizan estructuralmente a algunas integrinas (125). La función principal de las integrinas es mediar interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Las integrinas tienen la

capacidad de unirse rápida y reversiblemente.

Las **Integrinas beta 1**, corresponden a la familia de **VLA (very late antigens)**, y se expresan en un gran número de células de diferente estirpe. En la tabla VII se muestran a las integrina beta 1, su expresión, y sus ligandos correspondientes (17,39,53,73,74,89,92,93,125,127,145, 160,180,183,189,193,194,202,206,232). La VLA-1 se expresa en la superficie de células T activadas y de forma moderada en monocitos. La VLA-2 tiene una distribución celular similar aunque también puede detectarse moderadamente en células B en reposo. Las VLA-3, VLA-4, y VLA-5 son integrinas de amplia distribución celular. La VLA-4 es de específica importancia pues además de tener como ligando la fibronectina tiene a la molécula VCAM-1 de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La vía de adherencia VLA-4/VCAM-1 tiene implicaciones importantes en fenómenos de inflamación y metástasis (180). Estudios realizados por Elices y colaboradores demuestran que VLA-4 media el reclutamiento de linfocitos T a regiones de inflamación cutánea *in vivo* (56). La VLA-5 al unirse a la fibronectina media interacciones leucocito/matriz extracelular. La VLA-6 se expresa en una gran variedad de células pero está ausente en la superficie de células B. Se ha demostrado la presencia de VLA-7 sobre células de melanoma. La VLA-8 se expresa en células epiteliales y células del tejido nervioso, y su ligando se desconoce (89). Conocemos hoy en día la asociación de CD29 con alfaV, proteína presente en fibroblastos, células de neuroblastoma y embrionarias de riñón (125). Llama la atención en esta familia, el reconocimiento de proteínas de matriz extracelular.

Las **Integrinas leucocitarias (beta 2)** poseen una cadena alfa y una cadena beta. Existen tres tipos de cadenas alfa que corresponden a las tres integrinas leucocitarias; **alfa L (CD11a, LFA-1)**, **alfa M (CD11b, Mac-1)**, **alfa X (CD11c, p150,95)**. Aunque estas cadenas son diferentes, presentan bastante homología. Las subunidades alfa son glucoproteínas transmembranales, y están constituidas estructuralmente por un **gran dominio extracelular**, (con un dominio I, y un dominio de "unión de cationes divalentes"), una **zona transmembranal**, y una **región citoplásmica corta**. Aparentemente, el

Tabla VII. Moléculas de adhesión - Integrinas beta 1
C = contra; CO = colágena; LM = laminina; FN = fibronectina;
VCAM-1 = molécula de adhesión celular vascular-1;
VN = vitronectina; VLA = very late antigen; L = linfocitos;
M = monocitos; N= neutrófilos; B = basófilos; Mel = melanoma;
P = plaquetas; G = granulocitos; CM = células musculares;
TN = tejido neural; CEP = células epiteliales; NB = neuroblastoma; F = fibroblastos;
RE = riñón embrionario; LC = líneas celulares

INTEGRINAS BETA 1

CD	MOLÉCULA	C-RECEPTOR	EXPRESIÓN
CD49a/CD29	VLA-1 (Alfa1)	CO, LM	Amplia
CD49b/CD29	VLA-2 (Alfa2)	CO, LM	Amplia
CD49c/CD29	VLA-3 (Alfa3)	FN, CO, LM	Amplia
CD49d/CD29	VLA-4 (Alfa4)	FN (V25), VCAM-1	L,M,N,B,Mel.
CD49e/CD29	VLA-5 (Alfa5)	LM	Amplia
CD49f/CD29	VLA-6 (Alfa6)	LM	P, G
CD49g/CD29	VLA-7 (Alfa7)	LM	Mel. CM
CD49h/CD29	VLA-8 (Alfa8)	?	TN,CEP,Mel.
? /CD29	AlfaV	VN, FN	NB,F,RE,LC

Tabla VIII. Moléculas de adhesión - Integrinas leucocitarias beta2
ICAM-1,2,2 = Molécula de adhesión intercelular 1,2,3;
LPS = lipopolisacárido; COL = colágena; Fibr = fibronectina;
LFA-1 = leucocyte functional antigen-1; G = granulocitos;
MO = monocitos; NK = células asesinas; C = contra
CTL = linfocitos T citotóxicos

INTEGRINAS LEUCOCITARIAS (BETA 2)

CD Alfa / Beta	MOLECULA	C-RECEPTOR EN	EXPRESADA
CD11a/CD18 AlfaL/Beta2	LFA-1	ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3	Células T y B, G, MO. macrófagos. NK
CD11b/CD18 AlfaM/Beta2	Mac-1 (CR3)	ICAM-1 iC3b Factor X LPS. COL? Fibr.	Células mieloides G, MO NK CTL y ciertas leucemias linfoc.
CD11c/CD18 AlfaX/Beta2	p150,95 (CR4)	iC3b Fibr.	G, MO, NK Expresión inducida "de novo" (Cél B)

dominio I es un sitio de reconocimiento principal de adherencia sobre la integrina leucocitaria Mac-1 (50). Se sabe también que Mac-1 es el receptor principal de colágena tipo I sobre neutrófilos (138). Las cadenas de estas integrinas están codificadas en un grupo ("cluster") de genes del cromosoma 16 11p 13.1. La cadena beta 2 (CD18), es una proteína transmembranal, que está constituida por una zona extracelular larga; es en ésta zona que existe una gran identidad de la cadena beta2 con las cadenas beta de las demás integrinas. En la tabla VIII se describen a las integrinas de esta familia, así como sus ligandos (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, iC3b (216) y otros) (17,35,39,53,73,74,86,92,93,125,127,145,160,180,183, 189,193,194,202,206,232). Se ha visto que la adhesión de células mononucleares dependiendo de la expresión incrementada de ICAM-1, aumenta proporcionalmente con los niveles de integrinas beta 2 (214). La LFA-1 se expresa en células T y B, granulocitos, monocitos, macrófagos, y células NK (205,128). La Mac-1 se expresa en células mieloides (granulocitos y monocitos), así como en algunas clonas de ciertas leucemias linfocitarias. La p150,95 se expresa en granulocitos, monocitos, células NK, células B, y existe controversia acerca de su expresión en células T. La expresión de las integrinas leucocitarias depende del estado de activación y diferenciación celular, y se encuentra modulada por citocinas como GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-4, y otras. La expresión de estas integrinas no es suficiente para que sean funcionales. La afinidad por sus ligandos se ve aumentada por la activación celular. Las interacciones LFA-1/ICAM-2 son un ejemplo de adhesiones leucocito-endotelio. Las integrinas leucocitarias intervienen activamente en diversas funciones entre las cuales se encuentran, la citotoxicidad mediada por células CTL y NK, y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la función de cooperación ("helper") de linfocitos T, la unión de leucocitos a endotelio, la presentación de antígeno, la agregación leucocitaria, la migración leucocitaria y la quimiotaxis, la opsonización y la fagocitosis, y la interacción leucocitaria con proteínas séricas.

Corbí, Larson y Springer identificaron por primera vez a la glucoproteína p150,95 en 1987 (34). La cadena beta 2 (CD18) de dicha integrina también fue clonada en 1987 por Kishimoto y Springer, definiendo de ese modo a la familia de las integrinas leucocitarias (116). Una enfermedad muy rara es la del síndrome de deficiencia leucocitaria (LAD, leucocyte adhesion deficiency), en donde se ha visto que

la del síndrome de deficiencia leucocitaria (LAD, leucocyte adhesion deficiency), en donde se ha visto que el gen que codifica a la subunidad beta 2 tiene una expresión defectuosa o deficiente. Estos individuos sufren de una deficiencia inmunitaria profunda, con múltiples infecciones bacterianas, así como rechazo de trasplantes. Se ha demostrado *in vivo*, que inyecciones con anticuerpos anti-LFA-1, y el tratamiento simultáneo con anti-CD2 reducen significativamente las respuestas de rechazo (61).

La proteína básica principal eosinofílica EMBP (eosinophilic major basic protein) incrementa la expresión de p150,95 sobre neutrófilos, lo cual pudiera implicar a neutrófilos dentro de fases tardías de un desarrollo inflamatorio (150). Se ha demostrado que p150,95 sí interviene en la activación de células T; Meunier y colaboradores han visto que existe un incremento en la expresión de HLA-DR y p150,95 en la presentación de antígeno en células de Langerhans humanas estimuladas con ácido retinóico (147). Dicha estimulación, además de inducir la expresión de estas moléculas indujo la proliferación de linfocitos T CD4+ (147). Bellón y colaboradores han mostrado que durante la diferenciación mieloide de las líneas celulares HL60 y U937, los niveles de expresión del RNA mensajero de las integrinas p150,95 y VLA-4 se encuentra diferencialmente regulado, y que mientras la expresión de p150,95 es regulada a un nivel transcripcional, la de VLA-4 es controlada por mecanismos post-transcripcionales (11). También han mostrado que mientras que la activación de linfocitos T CD4+ conlleva a la disminución en la expresión de VLA-4 (y un incremento en la expresión de VLA-5), la activación de linfocitos B induce una disminución en la expresión de VLA-4, y un incremento en la expresión de p150,95 (11). La similitud de estos cambios y aquellos detectados durante la diferenciación mieloide subrayan la importancia de las alteraciones en la expresión de dichas integrinas en relación a las funciones efectoras que puedan ejercer (11).

Las **Integrinas beta3, o aloadhesinas** son integrinas plaquetarias. Poseen un dominio UCD ("unión de cationes divalentes"). Se caracterizan especialmente por la presencia de la **secuencia RGD** (Arg-Gly-Asp), que es un sitio de unión imperativo en el reconocimiento de ligando (presente en muchas integrinas), sobre la cadena beta. La presencia de la secuencia RGD determina qué tipo de proteínas RGD o ligandos RGD van a interactuar con la integrina en cuestión. En la tabla IX, se muestran las

Tabla IX. Moléculas de adhesión - Integrinas beta 3 (citoadhesinas)
vWF = factor von Willebrand; TN = tenascina; TSP = trombospondina;
OSP = osteospondina; FN = fibronectina; C = contra

INTEGRINAS BETA 3 - CITOADHESINAS

CD Alfa / Beta	MOLECULA	C-RECEPTOR EN	EXPRESADA
CD41/CD61 AlfaIIb/Beta3	GpIIb/IIIa	Fibrinógeno Factor VIII Fibronectina Vitronectina Trombospondina vWF, TN	Megacariocitos Plaquetas Endotelio
CD51/CD61 AlfaV/Beta3	VNR	Vitronectina Factor VIII Fibrinógeno TSP, OSP, FN Colágeno. TN vWF	Plaquetas Endotelio Leucocitos (Subpoblación T)

integrinas de la familia beta 3, y su distribución celular (17,39,53,73,74,92,93,125,127,145, 160,183,189,193,194,202,206,232).

El locus para los genes de las Integrinas VNR y gpIIb/IIIa ha sido identificado como un grupo ("cluster") en el brazo largo del cromosoma 2 humano. Entre las funciones de la integrina VNR (receptor de vitronectina), destacan la mediación de la agregación plaquetaria y la adhesión al subendotelio. La VNR también modula las Interacciones célula-matriz extracelular y célula-célula. A diferencia de la integrina gpIIa/IIIb, esta integrina se expresa no sólo en plaquetas sino también en leucocitos. La VNR tiene una gran importancia en el desarrollo de metástasis, en glomerulonefritis, y en trombosis. La integrina gpIIb/gpIIIa, tiene las siguientes funciones: a) es la Integrina principal en plaquetas; b) promueve la adhesión plaquetaria (plaqueta-plaqueta) a través de mediadores solubles como fibrinógeno y el factor de von Willebrand, y la adhesión al subendotelio a través de ligandos como la fibronectina y la vitronectina (189). c) Esta integrina requiere ser activada para unirse a sus ligandos. d) Participa activamente en la transducción de señales bidireccionales (por medio de fosforilación en residuos de tirosina (189). Resulta un modelo terapéutico atractivo para la manipulación de la agregación plaquetaria.

Se ha visto que también los condrocitos se adhieren a proteínas de cartílago y hueso a través de algunas integrinas beta 1 y beta 3 (136). Se ha determinado que los dominios citoplásmicos de las integrinas beta 3 son necesarias para la iniciación del esparcimiento celular y la formación de centros focales de adherencia (235).

La tabla X describe otras moléculas que pertenecen a la familia de las integrinas, así como su expresión (93,125). Entre las integrinas beta 7, se encuentra la molécula alfa4beta7 que se une a MadCAM-1, fibronectina, y VCAM-1 en linfocitos (interacciones linfocito-plaqueta), así como la molécula alfaELbeta7 que se une a adhesinas en linfoma y leucemias (Roberto González-Amaro, comunicación personal, 1993).

Tabla X. Moléculas de adhesión - Integrinas 4,5,6,7,8
C = contra; VCAM-1 = molécula de adhesión celular vascular-1;
NB = neuroblastoma; CEM = células embrionarias; R = riñón

INTEGRINAS 4,5,6,7,8

SUBUNIDAD	C-RECEPTOR	EXPRESIÓN
Beta4 Alfa6	Laminina	Hemidesmosomas
Beta5 AlfaV	Vitronectina	Células epiteliales
Beta6 AlfaV	Fibronectina	Células epiteliales
Beta7 Alfa4 (=Bp?) AlfaIEL	FN (V25), VCAM-1 ?	Células epiteliales NB, CEM, R
Beta8 AlfaV	?	?

- Superfamilia de las Inmunoglobulinas -

Esta es una familia extensa de moléculas estructuralmente muy similares a las inmunoglobulinas. En interacciones leucocitarias/endotelio, los miembros más importantes de esta familia son las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y las moléculas de adhesión celular vascular (VCAM). La familia está formada básicamente por moléculas como el receptor de la célula T, el receptor de la célula B, las moléculas del MHC clase I y II, CD4, CD8, LFA-2 (CD2), LFA-3 (CD58), ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 y CD31. En la tabla XI se muestran la mayoría de los miembros de esta familia junto con sus ligandos, y su distribución celular (5,17,39,53,73,74,125,153,160,183,232). En la figura 7c se presentan las estructuras de diversas moléculas de esta familia (125).

ICAM-1 e **ICAM-2** han sido identificadas y clonadas. La ICAM-1 sólo posee 2 de los 5 dominios Ig de inmunoglobulinas que se encuentran en ICAM-1 (125). Los ligandos de estas moléculas son miembros de la familia de las integrinas leucocitarias, LFA-1 y Mac-1. A diferencia de LFA-1 que se encuentra restringido a leucocitos, ICAM-1 se expresa en un gran número de células, y su inducción en procesos de inflamación es muy importante, a través de interacciones LFA-1/ICAM-1. En ausencia de respuestas inflamatorias, ICAM-1 se expresa sólo en algunos tipos celulares (125), (células dendríticas foliculares, y en células B de centros germinales). Mediadores de inflamación como IFN- γ , TNF, IL-1 y LPS, inducen fuertemente la expresión de ICAM-1 en diversos tejidos (206). Entre las funciones de ICAM-1 se encuentran también la presentación de antígeno a células T, la citotoxicidad mediada por células, y la participación en el rechazo de injertos (70,229). Las ICAM-1 e ICAM-2 son mucho más similares entre sí que con otros miembros de la superfamilia (206). La ICAM-2 también juega un papel importante en las interacciones intercelulares; sin embargo, su inducción por medio de citocinas, y en algunos casos, su distribución, son más restringidas que en ICAM-1 (43). Esto sugiere que ICAM-1 sea un ligando preferencialmente utilizado por LFA-1, y que ICAM-2 sea de importancia más relativa (43). La molécula **ICAM-3** fue identificada posteriormente, por Fawcett, de Fourgerolles y Springer (43,44,45,46,59). La ICAM-3, estructuralmente relacionada a ICAM-1 e ICAM-2, consiste de 5 dominios

Tabla XI. Moléculas de adhesión -
Superfamilia de las Inmunoglobulinas
C = contra; CE = células endoteliales; LEU = leucocitos;
CPA = células presentadoras de antígeno; linfocitos;
M = monocitos; B = basófilos; E = eosinófilos

SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

CD	MOLÉCULA	C-RECEPTOR	EXPRESADA
CD54	ICAM-1	LFA-1, Mac-1, CD43	CE, LEU (Amplia)
CD102	ICAM-2	LFA-1	CE, LEU (Amplia)
CD50	ICAM-3	LFA-1	LEU, CPA
	VCAM-1	VLA-4	CE, L, M, B, E
CD2	T11/LFA-2	LFA-3	Linfocitos T, NK
CD58	LFA-3	CD2	Amplia
CD56	NCAM	NCAM, SH	NK
CD31	PECAM-1/gp11a	PECAM-1	CE, LEU, M, P
-	MAdCAM-1	Alfa4Beta7, L-selectina	CE mucosa
-	TCR	Antígeno MHC	Linfocitos T
CD32	BCR (mIg)	Antígenos	Linfocitos B
CD4	CD4	MHCII	Subpoblación T
CD8	CD8	MHCI	Subpoblación T

de inmunoglobulina y se une a LFA-1 (con menor afinidad que las otras ICAM) por medio de 2 dominios NH2 (46,59). Ciertos autores especulan que pudiera ser el ligando más importante de LFA-1 en la iniciación de respuestas inmunes puesto que la expresión de ICAM-1 en leucocitos de reposo es muy baja, mientras que la de ICAM-3 no (59). ICAM-3 se expresa en leucocitos y en células presentadoras de antígeno, pero a diferencia de las otras ICAM, no se expresa en endotelio.

Un hallazgo interesante ha sido la demostración de que las citocinas proinflamatorias como IL-1- β , TNF- α , IFN- γ , PDGF e IL-6 (éstas dos últimas con menores efectos), son capaces de inducir la adhesión de células mononucleares de sangre periférica a sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide, vía la expresión aumentada de ICAM-1 (135). También se ha visto que existen niveles elevados solubles de ICAM-1, junto con los anticuerpos anti-endotelio (AECA), anti-cardiolipina (ACL), anti-neutrófilo (ANCA) en pacientes con esclerodermia y vasculitis (197,225).

La VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular) es otra molécula de adhesión importante dentro de este grupo; se expresa en endotelio y leucocitos, y en células dendríticas foliculares, y es el ligando principal de la integrina VLA-4. Está constituida por dos formas alternativas, una con 6 dominios de inmunoglobulina y la otra con 7 dominios (232). El VCAM soluble es liberado por células endoteliales activadas en cultivo, pero aún no se ha determinado cuales son los niveles circulantes exactos de esta molécula (74). El VCAM-1 se induce en la superficie de células endoteliales al cabo de 2-4 horas tras estímulo con IL-1 y TNF- α (73). También se ha visto que IL-4 es capaz de inducir la expresión de VCAM-1 o aumentarla en conjunto con IL-1 (73). La expresión basal de VCAM-1 sobre el endotelio es considerablemente más baja que ICAM-1, pero puede ser estimulada por los mismos mediadores como se ha visto, incluyendo también a LPS e IFN- γ (232). La expresión pico de VCAM-1 se da al cabo de 6 a 10 horas, y puede sostenerse hasta las 72 horas (232).

Se ha demostrado que los ligandos ICAM-1 y VCAM-1 coestimulan (junto con IL-2 e IL-4) la proliferación de linfocitos T en reposo pero no de linfocitos T antígeno-específicos; y que además son capaces de aumentar la muerte inducida por activación, de linfocitos T CD4+ antígeno-específicos (41).

La molécula CD31 (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule) es una glucoproteína de membrana que posee 6 dominios estructurales y se expresa en células endoteliales, plaquetas, células mieloides y una subpoblación de células T (4,73, 153). La expresión de CD31 aumenta en monocitos y linfocitos T cuando estas poblaciones son estimuladas por activadores de la proteína cinasa C (PKC) (4,73). Por sus características funcionales y estructurales se le ha implicado en procesos de adhesión celular. El CD31 puede adherirse homófilicamente a CD31, y es capaz de mantener interacciones heterofílicas con proteoglucanos (4,73). Células "vírgenes" expresan grandes cantidades de CD31, mientras que las células de memoria no (Roberto González Amaro, comunicación personal, 1993). Recientemente se ha demostrado que CD31 es capaz de inducir señales en la subpoblación de células T que lo expresan (como las CD4+), mediante interacciones homofílicas con el endotelio (73). Como consecuencia de esta interacción se induce la función adhesiva de integrinas como VLA-4 y LFA-1 (73).

- Otras moléculas de adhesión celular -

Otras moléculas importantes involucradas en las interacciones endotelio-leucocitos, son las **adresinas** que se adhieren a **receptores de localización** (homing). En la tabla XII se muestran a las adresinas que actualmente se conocen, su expresión, y sus ligandos (26,148,165,169,192). Las adresinas participan en el reclutamiento de linfocitos al endotelio HEV. *In vitro*, las adresinas vasculares pueden ser inducidas, bajo ciertas condiciones, sobre vasos en sitios de inflamación crónica, pero no necesariamente participan en el reclutamiento linfocitario (105,106). Los receptores de localización que se conocen son los siguientes, **LAM-1 ó receptor de localización de GLP** (ganglios linfáticos periféricos), que se adhiere a oligosacáridos con ácido siálico, expresado en células hematopoyéticas (células mononucleares, PMNs y precursores); **H-CAM ó CD44**, que se adhiere a colágena, fibronectina y laminina e hialuronato, y se expresa sobre células hematopoyéticas y no-hematopoyéticas, mesenquimales y epiteliales y en líneas celulares, así como en células gliales de la materia blanca (SNC). En la tabla XIII se muestran algunas otras moléculas de adhesión que se conocen y que no están clasificadas; éstas incluyen también a las

Tabla XII. Moléculas de adhesión - Adresinas
C = contra

ADRESINAS

MOLÉCULA	ANTICUERPO INHIBITORIO	C-RECEPTOR	EXPRESADA
Adresina de mucosa MadCAM-1 (ratón)	MECA-367 MECA-89	Alfa4Beta7 L-selectina HEBPpp ?	HEV mucosa HEV GLM, PP
Adresina ganglios linfáticos periféricos (ratón, humano)	MECA-79	?	HEV GLP, GLM PP

Tabla XIII. Moléculas de adhesión -
Caderinas y otras moléculas de adhesión no clasificadas
C = contra

CADERINAS Y OTRAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN NO CLASIFICADAS

FAMILIA	CD	MOLECULA	C-RECEPTOR
Caderinas		Uvomorulina	Homofílico
		LCAM	Homofílico
		E-caderina	Homofílico
		N-caderina	Homofílico
		P-caderina	Homofílico
No clasificadas	CD44	CD44	Acido hialurónico
	CD15	CD15	
		Sialilado	E-selectina

caderinas que son moléculas de adhesión celular, importantes en la formación de uniones intercelulares cerradas y de brecha, en procesos de metástasis, así como en procesos de inflamación, (Edith González, comunicación personal, 1994).

b) Participación de las MAC en inflamación e inmunidad: adhesión, rodamiento y extravasación.

Una vez conocida la expresión y regulación de los diferentes receptores de adhesión, y basados en diferentes experimentos de adhesión *in vivo* e *in vitro*, varios autores han llegado al concepto de un modelo para explicar la adhesión y la migración transendotelial de leucocitos (73). Este modelo se conoce como la "cascada de adhesión", pues varias etapas se van sucediendo consecutivamente. En las figuras 8 y 9 se esquematizan las distintas etapas de la cascada de adhesión, así como las moléculas involucradas. En la primera etapa, conocida como **contacto aleatorio**, los leucocitos que fluyen en la circulación sanguínea, comienzan a tocar las paredes del endotelio de forma aleatoria, una vez que el daño tisular se ha llevado a cabo. Para este contacto, es necesaria la disminución del flujo sanguíneo, o tensión de estrés, de tal modo que los leucocitos puedan comenzar a adherirse a la pared endotelial. En este paso se lleva a cabo la adhesión, que es **reversible** (adhesiones y separaciones), y es mediada por integrinas tales como las integrinas beta 1 y beta 2 (160,169,208). Pero sobre todo, esta etapa inicial es mediada por selectinas. La segunda etapa se conoce como **rodamiento (rolling)**, donde los leucocitos ruedan ligeramente sobre la pared endotelial. En este momento comienzan a intervenir los receptores de localización como LAM-1 junto con las adreínas, así como la participación de las selectinas - primero P-selectina y después E-selectina - buscando a sus ligandos respectivos sialilados, y uniéndose con alta afinidad de forma independiente a la activación (73). El fenómeno de rodamiento disminuye considerablemente la velocidad de flujo de los leucocitos en los pequeños vasos y permite su exposición a agentes quimiotácticos o activadores producidos en ese microambiente (73). Por ejemplo, la IL-8 y el sulfato de heparano participan en este momento en la activación endotelial (Roberto González Amaro, comunicación personal, 1993). La tercera etapa corresponde a la **activación leucocitaria y unión firme**, donde los leucocitos se adhieren de forma más estable, (activación-dependiente). Esta adhesión se lleva

**Figura 8. Modelo de adhesión y trans migración
endotelial "en cascada"**



1. Contacto aleatorio

2. Rodamiento

3. Activación y unión firme

Flujo sanguíneo

4. Extravasación

Endotelio vascular

SELECTINAS

**INTEGRINAS
Ig**

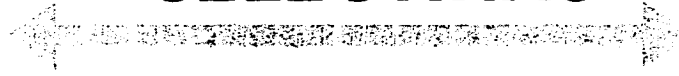
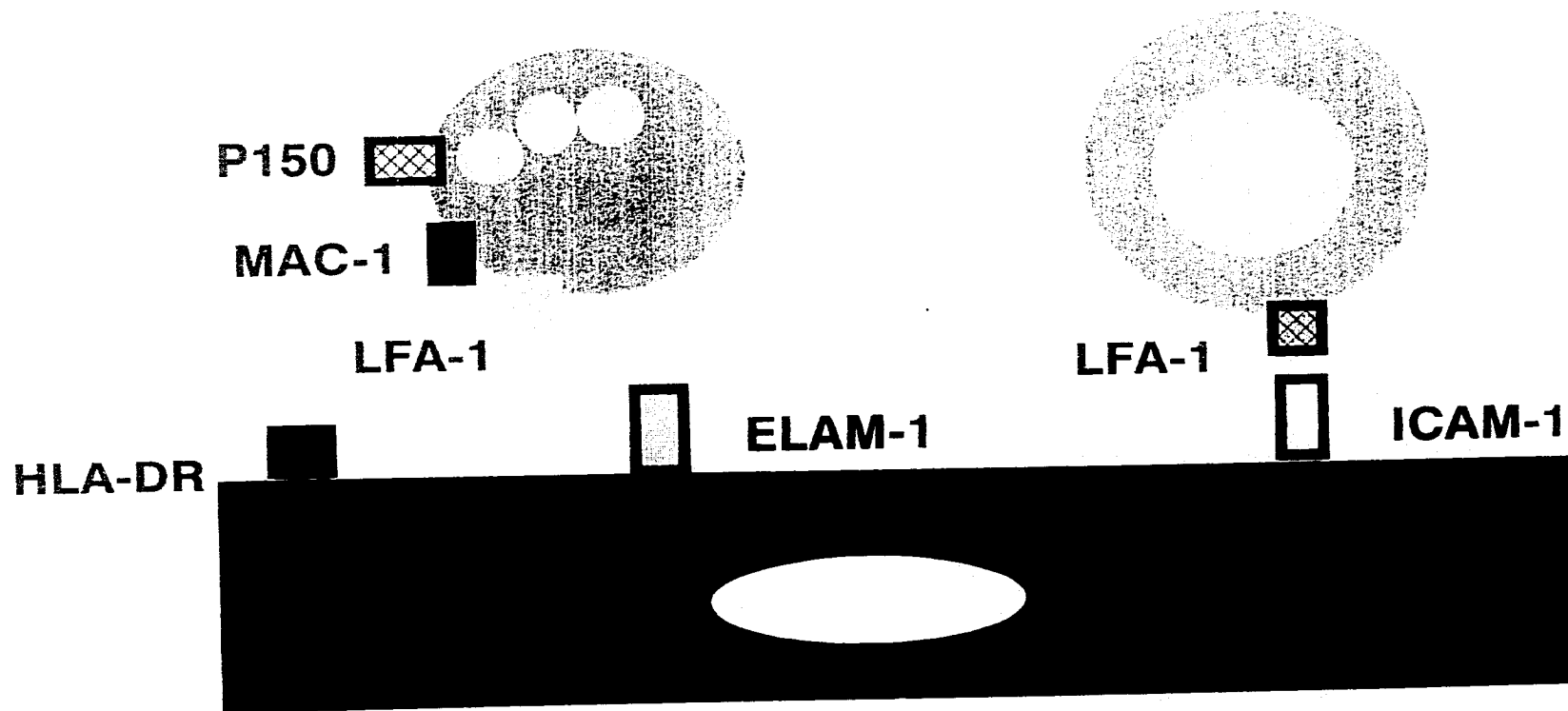


Figura 9. Moléculas involucradas en la adhesión endotelial leucocitaria sobre neutrófilos, linfocitos y endotelio

**MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA ADHESIÓN
ENDOTELIAL LEUCOCITARIA SOBRE NEUTRÓFILOS,
LINFOCITOS, Y ENDOTELIO. Cotran, RS. 1989. (36)**



a cabo gracias a la participación de Mac-1 en el caso de PMNs, y en el caso de monocitos y linfocitos, de la presencia de VLA-4 y de VCAM-1. Cuando las células T son estimuladas, la unión al endotelio activado por IL-1 utiliza las dos vías VLA-4/VCAM-1 y LFA-1/ICAM-1, mientras que la adhesión en reposo utiliza fundamentalmente LFA-1/ICAM-2 (73). Por lo tanto, es en esta etapa que intervienen más activamente las integrinas beta1 y beta2, así como las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La cuarta etapa corresponde a la **extravasación leucocitaria, o diapédesis** - mediada por las integrinas y las moléculas de la familia de las inmunoglobulinas (Ig) - donde los leucocitos migran a través de la pared endotelial para llegar a los sitios de lesión tisular. Sin embargo, algunos autores postulan que en condiciones patológicas, la adhesión podría darse directamente en una etapa, a través de los siguientes factores, i) la densidad local de un determinado ligando-receptor, afectando de forma crítica la avidéz de la interacción; ii) la concentración extracelular de algunos cationes divalentes como Mn^{2+} y Mg^{2+} , que pudieran incrementar considerablemente la avidéz de las integrinas beta1 y beta2 por sus ligandos, produciendo un cambio conformacional en la molécula; iii) la producción de factores solubles por los leucocitos activados que actuaran como activadores alostéricos de la función de las integrinas (73). Así pues, éstos y otros factores son los que probablemente determinen, que en condiciones de inflamación, la adhesión se vea incrementada, aunque se reduzca su selectividad (73).

c) Interacciones entre linfocitos T y endotelio

Los linfocitos T en la sangre, específicos contra cierto antígeno, y más tarde linfocitos T independientes de la especificidad antigénica tienen que penetrar el endotelio vascular tempranamente (174). Las células T permanecen en reposo hasta que interactúan, vía el receptor antigénico, con el antígeno en cuestión, formando un complejo con el MHC. En este momento, la célula T se activa o se anergiza en la superficie luminal del endotelio vascular, sobre el tejido donde el antígeno fue expuesto (91). Aunque las células endoteliales de vena umbilical expresan constitutivamente moléculas MHC clase I más no de clase II, estas últimas se inducen rápidamente al ser cultivadas con linfocitos alogénicos de sangre periférica (91). Por lo tanto, la respuesta proliferativa alogénica contra células endoteliales parece

ser iniciada por la presentación de moléculas de clase II inducibles (51,91). Pober, Cotran, Savage y Hughes han demostrado que dichas moléculas de clase II (HLA DR, DP, DQ) pueden ser inducidas en células endoteliales por las siguientes citocinas, IFN- γ , TNF + IFN- γ , IFN- γ + IFN- β (51,91).

Las células endoteliales y los macrófagos juegan un papel crucial en la respuesta celular inmune, tanto como células presentadoras de antígeno, como en la secreción de factores mediadores de la respuesta inmune. Se ha identificado que las células endoteliales y los macrófagos secretan un inhibidor idéntico de la síntesis de IL-2, suprimiendo de este modo, la actividad de linfocitos T (111). Las células endoteliales (HUVEC) incrementan las respuestas de linfocitos T CD4+, al aumentar las concentraciones de IL-2; de esta forma las células endoteliales poseen una habilidad única para participar en las respuestas alogénicas primarias *in vitro*, y posiblemente induzcan una respuesta muy similar *in vivo* (84). Savage, Hughes y Pober han demostrado que células endoteliales co-estimulan la activación de linfocitos T CD4+ junto con PHA, resultando en un incremento en la síntesis de IL-2 (195). La producción de IL-2 se incrementó típicamente de 3 a 8 veces (91). Sin embargo, también han demostrado que la coestimulación por parte de las células endoteliales no depende de la activación de las células T por medio de PHA; han visto que esta coestimulación se da en parte por la unión de LFA-3 a CD2, así como de un segundo ligando que actualmente ha sido identificado como CD28 (174,195). La PHA induce la síntesis temporal del transcrito de c-fos, cuya expresión pico se da al cabo de 30 minutos. Las células endoteliales sólo inducen a c-fos y necesitan la presencia de PHA (174).

Entre los ligandos involucrados en la adhesión de linfocitos T a endotelio se encuentran LFA-3, CD2, LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD44(91). Sin embargo, la vía LFA-1/ICAM-1 no está involucrada en el incremento de síntesis de IL-2 (91). Las IL-1 e IL-6 en cambio, secretadas por las células endoteliales, son incapaces de coestimular (junto con PHA) a linfocitos T CD4+ en reposo (174).

Aparentemente, las células endoteliales utilizan señales similares para activar células T de memoria y células T "vírgenes", es decir ambas expresan niveles comparables de CD28 en poblaciones de linfocitos T CD4+ (91). Al regular la expresión de moléculas cruciales, la actividad de linfocitos T puede limitarse a áreas específicas, localizando una respuesta inmune (91). Las células endoteliales

pueden entonces iniciar tanto respuestas primarias como respuestas secundarias, y gracias a la habilidad de las células endoteliales de producir señales co-estimuladoras a células T circundantes, ellas (CE) pueden servir como células presentadoras de antígeno en las respuestas inmunitarias sobre tejidos periféricos (91). Las células endoteliales en cultivo son capaces de presentar antígeno de forma inmunogénica al asociarse con moléculas del MHC, y tienen una función coestimuladora de activación sobre linfocitos T CD4+ y CD8+ (174).

El reclutamiento de linfocitos T hacia tejidos por las células T se da en diferentes etapas; primero las células pre-T que surgen de la médula ósea entran a la circulación sanguínea y migran hacia el timo donde ocurre la selección positiva y negativa de ellas. Posteriormente, las células T maduras y "vírgenes" migran hacia los ganglios linfáticos expresando CD45RA, CD2, LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6 y CD44, así como la L-selectina (174). Los linfocitos "vírgenes" migran preferencialmente hacia órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos, y recirculan, buscando a algún antígeno específico. Una vez que encuentran el antígeno sobre la superficie de CPA, la célula cambia fenotípicamente, entra en el ciclo celular y expresa marcadores de activación como el receptor de transferrina y HLA-DR. También expresan LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6 (174). La expresión de L-selectina se reduce, y la expresión de las moléculas CD2, CD44 y LFA-3 aumenta (174). Las células ahora expresan CD45RO de memoria, en vez de CD45RA (174). Posteriormente, los linfocitos T de memoria reconocen sobre la superficie del endotelio las siguientes moléculas de adhesión: ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1, aunque es posible que otras moléculas de adhesión, específicas contra linfocitos T participen en esta etapa. Posteriormente, los linfocitos migran y se localizan (de forma antígeno-independiente) sobre las HEVs de tejidos específicos (homing), donde comienzan la extravasación a través del endotelio tanto *in vivo* como *in vitro* (174).

3) Enfermedades autoinmunes con daño vascular

En este trabajo se contempla el estudio de enfermedades autoinmunes como la **esclerodermia general progresiva** y la **vasculitis sistémica**, pero se hará breve mención de otras enfermedades reumáticas íntimamente relacionadas.

La **esclerodermia o esclerosis generalizada progresiva (sistémica) (EGP)** es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la acumulación de colágena en la piel y en órganos internos (103), y por la producción de autoanticuerpos, afecta los núcleos celulares, el corazón, los pulmones, el tracto gastrointestinal y el riñón (133). Se caracteriza por la fibroesclerosis de tejidos conjuntivos cutáneos y viscerales, daño vascular difuso, y anormalidades inmunológicas (3).

Entre los fenómenos **Inmunológicos**, existe la presencia de anticuerpos anticentrómero, antinucleares, antinucleolares (RNA polimerasa I, fibrilarina, nucleolar 4-6S RNA, U2 RNA), antitopoisomerasa I, anticolágena tipos I y IV, antilaminina, antirribonucleoproteína, y otros (133). Diversos estudios indican que los linfocitos T de pacientes con EGP se encuentran sobreactivados, y se sabe que la mayoría de los infiltrados celulares cutáneos en EGP son linfocitos T (133,143). Existen varios mecanismos por los cuales las células T pudieran sobreactivarse en EGP; pudieran estar predispuestos a reaccionar contra los epítomos autogénicos mencionados arriba, mediante la expresión de moléculas del MHC clase II sobre células presentadoras de antígeno autólogas (133). Si estos antígenos llegaran a formar parte integral de la vasculatura, un ataque de linfocitos T dirigido contra este sistema pudiera tornarse auto-perpetuador (133). La presencia de citocinas solubles y la secreción de receptores de IL-2 en etapas tempranas de esclerodermia sugiere que las reacciones inmunes se perpetúan, generando más citocinas capaces de agravar las lesiones fibróticas y vasculares características de este padecimiento (177). Por supuesto, existen también alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y las integrinas beta1 y beta2 (por lo general expresión incrementada), así como en citocinas tales como TGF- β , IL-1, IL-2, IL-6, PDGF, TNF- α e IFN- γ , que afectan la activación linfocitaria (60,96,139,151,152,178). Se ha visto que en biopsias de piel de pacientes con EGP, en etapas tempranas, hay una mayor

expresión de MACs tales como E-selectina, P-selectina y VCAM-1, así como de las citocinas IL-8 y TNF- α , y la expresión de estas moléculas es significativamente mayor que en individuos sanos (32,119,188,122,203). Otras formas de activar los linfocitos T podrían incluir la expresión aumentada de componentes de matriz extracelular en fibroblastos, así como alteraciones importantes en la estructura y función del endotelio, creando microambientes que exhibieran epítomos presentados a los linfocitos T, y adheridos a ellos mediante integrinas (133). Existen por lo menos cuatro moléculas de matriz extracelular que coestimulan a linfocitos T y que se encuentran involucradas en mecanismos antígeno-específicos: colágena, (especialmente tipo IV), fibronectina, laminina, y tanascina (molécula tipo-fibronectina multimérica) (133).

Entre las alteraciones endoteliales/vasculares, se ha visto que en EGP, se desarrolla proliferación de la íntima arterial, dilatación y destrucción capilar, así como daño y desprendimiento endotelial (133,162). El blanco más probable del daño inmunológico es la célula endotelial misma, o bien, componentes de su membrana basal (incluyendo a la colágena tipo IV y a la laminina) (107). Estudios *in vitro* han demostrado que la capacidad citotóxica de células endoteliales con respecto a otras células endoteliales pudiera ser un factor contribuyente en la iniciación de una vasculopatía en EGP, representando un daño crónico de células endoteliales (52). No obstante, se desconoce aún qué es lo que activa a los linfocitos T, permaneciendo éstos altamente adherentes con respecto al endotelio (108,133). Se ha mostrado que el daño endotelial tanto en EGP como en pacientes con Raynaud se debe a mecanismos **adicionales** a la presencia de complejos inmunes solubles, a la presencia de TNF, o de lipoproteínas oxidadas (19).

Dentro de los estudios en fibroblastos y matriz extracelular, se ha visto que los fibroblastos de pacientes con EGP secretan cantidades elevadas de proteínas colagénicas. Estudios moleculares han demostrado la presencia de colágenas I, III, IV, fibronectina y proteoglicanos - sobre-expresados a nivel transcripcional en el RNA mensajero - en biopsias de piel de pacientes con EGP (90,133). Los fibroblastos de pacientes con EGP también exhiben una anomalía en su crecimiento, en la síntesis de DNA expresando el proto-oncogen *c-myc* (133). Los fibroblastos también expresan altas cantidades de PDGF,

cuya función es la de regular el crecimiento celular fibroblástico (133).

Los estímulos que inducen el desarrollo de EGP se desconocen, pero son lo suficientemente poderosos para inducir una respuesta inmune de linfocitos T incrementada, ocasionando el daño vascular. La expresión de proteínas de matriz extracelular continúa, con lo cual los linfocitos T siguen siendo activados y se establece un ciclo (133). Existe evidencia considerable para sugerir que las tres características más importantes de EGP - daño vascular, acumulaciones tisulares y perivasculares de leucocitos mononucleares, y el incremento en la proliferación y presencia de depósitos de matriz extracelular en tejido conjuntivo - se encuentran íntimamente relacionadas (178). La secuencia patogénica parece ser la siguiente: daño vascular (proliferación de la íntima) -> adhesión leucocitaria (integrinas y moléculas de adhesión celular) -> migración leucocitaria transvascular (quimioatrayentes) -> adhesión leucocito/matriz extracelular (integrinas) -> liberación de citocinas y factores de crecimiento -> presencia de fibroblastos con fenotipo fibrogénico -> acumulación excesiva de depósitos sobre la matriz del tejido conjuntivo (178). La identidad del(los) agente(s) responsable(s) de la iniciación del daño a los sistemas vascular e inmunitario aún está(n) por determinarse (178). Aunque existen diversos métodos terapéuticos para tratar a los pacientes con esclerodermia, de momento no existe una terapéutica precisa, y la enfermedad progresa y es difícilmente detenida (103).

Dentro de este estudio se incluyen a pacientes con **EGP**, así como pacientes con **esclerodermia limitada** (restringida a algún órgano más no sistémica), **EMTC** (enfermedad mixta del tejido conjuntivo, que posee características tanto de esclerodermia como de lupus eritematoso generalizado, polimiositis (vasculitis muscular) y artritis reumatoide), y **CREST** (Calcinosis Raynaud Hipomotilidad Esofágica Teleangectasias)

Las **vasculitis** son un grupo de padecimientos cuya manifestación principal es la inflamación y necrosis de vasos sanguíneos resultando en una oclusión vascular e isquemia tisular, en la formación de aneurismas, o en la ruptura vascular (no muy frecuente) (184,204). Este proceso puede afectar cualquier vaso sanguíneo del cuerpo, con lo cual el espectro clínico de la enfermedad es amplio y variado (184).

Las vasculitis pueden ser un padecimiento primario, o, puede estar asociada a alguna otra enfermedad del tejido conjuntivo (184).

La patogénesis de las vasculitis, aún oscura, ha sido atribuida a mecanismos inmunológicos, incluyendo la presencia de complejos inmunes, la inmunidad celular, la inmunidad humoral, incluyendo diversos eventos desencadenadores tales como infecciones, drogas, toxinas, o cáncer (184). La producción de citocinas inflamatorias y la activación de moléculas de adhesión son factores cruciales en el desarrollo de las respuestas inflamatorias observadas en las vasculitis.

Las citocinas y agentes que se conocen están involucrados en la patogénesis de las vasculitis son los siguientes, IL-1 α,β , TNF- α , LPS, IFN- γ , IL-8, IL-2, IL-4, IL-6, la sustancia P, PAF, el óxido nítrico y la endotelina (184). Varios estudios han demostrado que en diversos síndromes vasculíticos (incluyendo LEG) existen niveles incrementados de moléculas de adhesión solubles tales como ELAM-1, ICAM-1 (158), VCAM-1 (101), y CD44, y de citocinas tales como TNF- α (64). Otros estudios han demostrado que ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, LFA-1, Mac-1, y p150,95 se expresan de forma importante en biopsias de piel de pacientes con vasculitis leucocitoclástica y de pacientes con vasculitis linfocítica (25).

Las células endoteliales pueden convertirse en un blanco de ataque por medio de anticuerpos anti-endotelio. Los anticuerpos antineutrófilo (ANCA), y las respuestas de linfocitos T contra los antígenos en cuestión, pueden jugar un papel importante en el daño vascular en este tipo de vasculitis (184). En las vasculitis, el endotelio se activa por medio de citocinas, convirtiendolo en una superficie procoagulante y mucho más adherente, contribuyendo de este modo a la lesión vascular (196). Sin embargo, aún no es claro por qué el endotelio se convierte en un blanco del daño vascular. En las vasculitis, el daño vascular puede incluir necrosis celular, despojamiento de proteínas superficiales, o disfuncionamiento celular. Las células endoteliales pueden ser blancos específicos o no-específicos del daño, dependiendo de su posición anatómica y de su papel fisiológico (196).

La presencia de anticuerpos AECA se ha detectado en vasculitis primarias como Granulomatosis de Wegener, la enfermedad de Kawasaki, en poliarteritis y en vasculitis secundarias como aquellas asociadas con Lupus Eritematoso Generalizado y Artritis Reumatoide (196,220). Los anticuerpos AECA, una vez

unidos, tienen la capacidad de mediar daño celular endotelial y lisis vía células citotóxicas (T CD8+ y NK) y complemento (196). La presencia exclusiva de ciertas proteínas en la superficie endotelial de pacientes con Granulomatosis de Wegener en comparación con pacientes con LEG sugiere que existen diferentes reactividades endoteliales en distintos procesos vasculares (por lo menos en vasculitis primarias vs secundarias) (42,49,65). El que los AECA reconozcan determinantes de superficie endotelial apoya la noción de que estos anticuerpos pueden jugar un papel patogénico importante en enfermedades vasculares de base autoinmune (22,42,49,65). Anticuerpos anti-neutrófilo ANCA también han sido identificados en el suero de pacientes con Granulomatosis de Wegener y poliarteritis nodosa, en vasculitis sistémica necrotizante, en el síndrome Churg-Strauss, y en glomerulonefritis idiopática (65,184). En pacientes con vasculitis secundaria a artritis reumatoide se ha demostrado que existe daño vascular junto con niveles incrementados del factor de von Willebrand y una deficiencia en la actividad del activador de plasminógeno (tPA) (130).

Actualmente, el tratamiento de las vasculitis consiste en la administración de corticoesteroides o agentes inmunosupresores, o ambos (184). Sin embargo, el uso a largo plazo de estos agentes puede ser tóxico y no elimina el riesgo de una recaída potencial (157).

Dentro de este trabajo, se han incluido a pacientes con los siguientes síndromes vasculíticos: **vasculitis sistémica; vasculitis secundaria a lupus eritematoso generalizado, poliarteritis nodosa, arteritis de Takayasu (arteropatía afectando a vasos grandes como la aorta y sus ramas principales); panculitis localizada (vasculitis del pániculo); dermatomiositis (vasculitis muscular con afecciones cutáneas); vasculitis leucocitoclástica; y diátesis de Wegener.**

Moléculas de adhesión y enfermedades reumáticas

Estudios con tejidos sinoviales de pacientes con AR han mostrado que la inhibición de la adherencia de monocitos a endotelio por medio de anticuerpos específicos contra P-selectina es superior al 90%, por medio de ELAM-1 es de un 20-50%, por medio de LFA-1, Mac-1, CD18 (cadena beta2), y L-

selectina, individualmente, de un 30-40% (83), lo que muestra la importancia de los monocitos en la patogénesis reumatoide, y del papel tan importante que juega la P-selectina en la mediación de la adherencia monocito-endotelio. Otros investigadores han revelado la presencia de ICAM-1 y VCAM-1 también en las interacciones monocito-endotelio en sinovio inflamado, así como la acumulación de TNF e IL-6 durante estas interacciones (20).

Se ha visto que los niveles de P-selectina sérica en pacientes con LEG, EMTC, y AR se encuentran alrededor de 306, 1048 y 844 ng/ml respectivamente, comparados con controles (220 ng/ml), y que estos niveles se incrementan sobretodo cuando existen otras complicaciones (209).

A medida que se lleva a cabo una transición entre células T no comprometidas CD45RA+/RO- a células T de memoria CD45RA-/RA+ en AR, existe una transición en la correlación con la expresión de L-selectina (166); la expresión de esta molécula constitutiva se incrementa en una etapa temprana, mientras que en etapas subsecuentes disminuye fuertemente su expresión (166).

Postigo y colaboradores (72,124), han mostrado que en artritis reumatoide *in vivo*, la regulación de la adherencia de células T a fibronectina en líquido sinovial es mediada tanto por VLA-4 como por VLA-5. En efecto, estudios inmunohistoquímicos han revelado que la expresión de VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-5 y beta 1 (CD29) es muy alta en el endotelio de tejido sinovial reumatoide, y que la mediación inflamatoria por medio de las integrinas beta 1 es de importancia crucial en este padecimiento (55).

Postigo, Sánchez-Madrid y colaboradores (179) han demostrado que los linfocitos T en AR - tanto de sinovio como de sangre periférica - poseen una gran capacidad de proliferación y adherencia a las moléculas ELAM-1 y VCAM-1 aisladas sobre placas de cultivo *in vitro*.

Estudios morfométricos en AR han sugerido que la migración de células mononucleares de sangre periférica hacia las áreas perivasculares sucede antes de la proliferación vascular y la alteración morfológica de las células endoteliales (63,120). De acuerdo con van-Dinther-Janssen y colaboradores, la vía de adhesión de células T a endotelio más importante en sinovio reumatoide, es a través de VLA-1/VCAM-1, cuya expresión es mayor que la de LFA-1/ICAM-1 (221). Existen estudios que indican que los monocitos de pacientes con AR tienen una mayor capacidad de adherencia a células HUVEC que los

obtenidos de individuos sanos (144); aparentemente la vía predominante utilizada *in vitro* por estas células es LFA-1/ICAM-1.

Brown *et al* (24) sugieren que ICAM-1 media primordialmente la adhesión leucocitaria a HEVs en AR, y que su función por lo contrario no parece ser la mediación de la migración a través de la pared vascular.

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que LFA-3 e ICAM-1 se expresan en células sinoviales "macrofágicas" tipo A, en fibroblastos sinoviales, y en endotelio (85). Utilizando anticuerpos anti-ICAM-1 y anti-LFA-3 demostraron una reactividad en fibroblastos sinoviales. Concluyeron que los ligandos de LFA-1 y LFA-3 (ICAM-1 y CD2 respectivamente) tienen una distribución celular amplia en el microambiente sinovial en AR (85).

Sin embargo, Koch, Johnson, y colaboradores han demostrado que la expresión de las integrinas VLA 1-6 así como de las selectinas P (presentes en el endotelio) y L, no se incrementa en tejidos sinoviales de pacientes con AR (104). Sin embargo, encontraron una expresión incrementada de las moléculas CD31, CD44 y de una integrina $\beta 3$ en los vasos sanguíneos de los pacientes con AR (104). Por el contrario, otros investigadores han encontrado un alto contenido de células T expresando VLA-1-6 en el líquido sinovial de pacientes con AR, siendo estos niveles mayores que en sangre periférica, y estos últimos niveles no tan altos como aquellos encontrados en la sangre periférica de individuos sanos (211). En biopsias sinoviales de pacientes con AR se han detectado altos niveles de CD44, L-selectina, integrinas beta1 y beta2 por inmunohistoquímica (62).

En ciertos estudios realizados por Wilkinson *et al* en sinovio inflamado, se ha visto que la molécula VCAM-1 se expresa de forma muy intensa en cuatro poblaciones no-macrofágicas: i) sinoviocitos tipo B, ii) paredes vasculares al exterior de la capa endotelial, iii) células de estroma con extensiones citoplásmicas y iv) células similares a células dendríticas foliculares en agregados linfoides y centros germinales) (233).

En artritis reumatoide juvenil y en espondiloatropatías seronegativas en niños, se ha visto que existe una mayor adhesividad de células B a endotelio HUVEC que de células T CD4+ (154). Por lo tanto

se ha sugerido que los linfocitos B y T utilizan moléculas de adhesión diferentes durante el proceso inflamatorio (154).

Estudios realizados por Veale y colaboradores (222) han demostrado que aunque el infiltrado linfocítico en la membrana sinovial es similar en pacientes con artritis psoriática (AP) y AR, existe una mayor expresión de ELAM-1 y un mayor número de macrófagos en AR que en AP. En psoriasis, se ha visto un incremento de adherencia leucocitaria a endotelio de 61% comparado con individuos sanos (132). En efecto, otros estudios han demostrado que linfocitos T y B se adhieren fuertemente a células endoteliales dérmicas de biopsias psoriáticas, y que esta adherencia en linfocitos T se da través de la vía LFA-1/ICAM-1 (31).

La molécula p150,95 se expresa predominantemente en AR y osteoartritis (OA) en macrófagos, en sitios profundos del infiltrado vascular sobre el tejido sinovial, mientras que ELAM-1 tiene una reactividad primordialmente endotelial, presentandose principalmente en vénulas y capilares, y expresandose de manera más importante en AR que en OA (118).

Wellicome y colaboradores (230), mediante el uso de los anticuerpos monoclonales 1G11 y 1E5 que inhiben la adherencia de linfocitos T a endotelio activado (TNF), han demostrado que existen niveles altos de una forma soluble de VCAM-1 en AR y lupus eritematoso generalizado (LEG). Con respecto a ICAM-1, Mason, Kapahy y Haskard (142) han demostrado que existen altos niveles de ICAM-1 en pacientes con AR, más no en pacientes con LEG, y AR (58), y que estos niveles no se encuentran correlacionados con los niveles de VCAM-1 circulante que reflejan un índice de daño en LEG (142). Estudios realizados por Haskard, Ziff, y colaboradores (88) sobre en pacientes linfopénicos con LEG, han demostrado que existe una reducción en la adherencia linfocitaria a células HUVEC a diferencia de controles sanos; se encontró un decremento en la adherencia a partir de controles sanos de 36.4% con células T no estimuladas, y de 34% con células T estimuladas con IL-1. Estos estudios sugieren que la pérdida de linfocitos altamente adherentes puede contribuir a la linfopenia observada en LEG (88). En estudios realizados en pacientes con LEG, se demostró una alta expresión de ELAM-1, ICAM-1 y VCAM-1 (comparada con la de controles) en biopsias de piel por inmunohistoquímica (12). Estos niveles

se encontraron correlacionados con los niveles de las proteínas séricas de complemento C3a desArg, C3 y C4 (12).

En el síndrome de Sjögren y en AR, ciertos estudios han corroborado que la adherencia de linfocitos T a endotelio es mediada por LFA-1/ICAM-1 (94). En el síndrome de Sjögren se ha detectado mediante inmunohistoquímica una expresión incrementada de ICAM-1 sobre células endoteliales, linfocitos, fibroblastos y células epiteliales de la glándula salival, así como de ELAM-1 sobre células endoteliales (8). VCAM-1 también se detectó en algunas biopsias de Sjögren (8).

Experimentos realizados en pacientes con enfermedad de Kawasaki, se ha demostrado que durante la fase aguda, los niveles de ELAM-1 soluble se ven netamente incrementados (27.5 ng/ml) comparados con individuos sanos (3.1 ng/ml) (114). Estos niveles se mantienen relativamente altos durante la fase sub-aguda (16.2 ng/ml) (114).

De acuerdo con estudios realizados por Gerritsen (77), las células endoteliales de sinovia reumatoide expresan ICAM-1 en respuesta a citocinas, y la regulación de esta expresión en células endoteliales de sinovia difiere de aquella encontrada en HUVEC. El IFN- γ actúa de manera sinérgica con otras citocinas en la regulación de ICAM-1 en tejido sinovial (77,123). Dicha regulación diferencial de la expresión de moléculas de adhesión puede indicar un mecanismo en el que diferentes poblaciones de leucocitos se dirigen a lechos vasculares selectos.

B) HIPÓTESIS

Dado que diversas moléculas de adhesión celular juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica a través del endotelio vascular, se propuso identificar el papel de ciertas MACs en los procesos inflamatorios observados en enfermedades reumáticas autoinmunes. En el caso de dichas enfermedades, por un lado, existen comúnmente depósitos de complejos antígeno/anticuerpo en una respuesta autoinmunitaria. Por otro lado, existe el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica, intrínsecamente ligada con la respuesta inmunológica.

En particular, nos hemos interesado en la **esclerodermia** y en las **vasculitis**, pues son dos enfermedades reumáticas de las cuales no se sabe mucho de la participación de moléculas de adhesión en su patogenia.

Existen amplios datos al respecto en artritis reumatoide, y en un grado menor, en lupus eritematoso generalizado - como hemos visto - pero los procesos inflamatorios en esclerodermia y vasculitis han sido menos estudiados.

Durante los procesos inflamatorios, ciertas vías de adhesión linfocitaria se ven involucradas selectivamente. Consecuentemente, se especuló que las vías de adhesión tanto en las respuestas inflamatorias como en el reconocimiento de autoanticuerpos contra endotelio vascular pudieran ser diferentes en distintas enfermedades autoinmunes, contribuyendo de ese modo a las diferencias histológicas y sintomáticas observadas en ellas. Por otra parte, ciertas similitudes en la expresión de MACs en estas enfermedades pudieran ser únicas y características de los padecimientos reumáticos. ¿Distintas enfermedades reumáticas utilizan acaso diferentes mecanismos de adhesión como resultado, muy posiblemente, de distintos grados y variantes de daño endotelial? ¿Existen diferencias en la expresión de ciertas moléculas de adhesión en esclerodermia y vasculitis a diferencia de individuos sanos?

En este proyecto experimental se propuso la caracterización específica de las vías de adherencia mediadas por ELAM-1, y p150,95, en esclerodermia y en vasculitis. Se incluyó el estudio tanto de una selectina (involucrada en las etapas iniciales de adhesión linfocitaria al endotelio) como de una integrina

(importante en etapas subsecuentes, sobre todo de transmigración endotelial). Elegimos a p150,95, dado que existe gran controversia al respecto de su expresión en células T. Elegimos también a ELAM-1, de importancia extrema en procesos inflamatorios, y cuya participación en estas enfermedades es prácticamente desconocida. Para inducir la expresión de éstas moléculas se estimuló el endotelio, y elegimos a la lectina PHA (fitohemaglutinina), dado que pocos estudios, como los de Pober, Gimbrone y Cotran (36,172,174), documentan el efecto proliferativo y de adherencia de células T o células mononucleares a endotelio vascular, y por el contrario, mucho se sabe acerca de la activación de endotelio por medio de citocinas como IL-1, TNF y LPS.

Por otra parte, la respuesta de adherencia linfocitaria en teoría debe ser diferente si se utiliza una población de células mononucleares totales, o una subpoblación de linfocitos, pues diferentes leucocitos expresan distintas moléculas de adhesión. Por lo mismo se decidió la caracterización de diferencias en la respuesta de adherencia a endotelio en poblaciones de células mononucleares totales (en estudios preliminares) comparadas con la subpoblación de linfocitos T. Se eligió la población de linfocitos T, pues se piensa que estas células juegan un papel crucial en el desencadenamiento auto-reactivo y la perpetuación del estado de inflamación crónica en enfermedades reumáticas (Alberto Palacios, comunicación personal, 1993).

Este estudio se basó en la noción de que el endotelio es un tejido atractivo de intervención terapéutica no nada más en enfermedades reumáticas, sino en otros padecimientos donde el endotelio pudiera ser sujeto de daño isular, a la vez de ser un mediador importante de procesos inflamatorios. Es concebible que bloqueando la interacción entre algunos de los ligandos de las células endoteliales (como las moléculas de adhesión en cuestión), con sus receptores correspondientes, se podrían contener diversas respuestas proinflamatorias, siempre y cuando sea posible identificar la vía de activación y adherencia predominante. Así pues, el desarrollo de anticuerpos monoclonales, o bien de agentes antagonistas, específicos contra dichos ligandos, pudiera facilitar de manera importante el estudio de los daños vasculares generados en estas enfermedades reumáticas autoinmunes.

C) OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo fue la de detectar el papel de las moléculas de adhesión p,150,95 y ELAM-1 en la adherencia de células mononucleares o linfocitos T a endotelio vascular humano *in vitro*, en pacientes con esclerodermia, vasculitis, e individuos sanos. Los objetivos fueron los siguientes:

- 1) Determinar en estudios preliminares, el porcentaje de adherencia basal a células endoteliales HUVEC, de células mononucleares depletadas de macrófagos, en pacientes con esclerodermia generalizada y vasculitis, comparados con individuos sanos.
- 2) Determinar el porcentaje de adherencia a células endoteliales HUVEC, de linfocitos T en estado basal, en pacientes con esclerodermia generalizada y vasculitis, comparados con individuos sanos.
- 3) Precisar si dicho porcentaje de adherencia se modifica bajo estímulo mitogénico por medio de PHA.
- 4) Investigar si la adherencia linfocitaria puede ser inhibida en presencia de anticuerpos monoclonales específicos contra las moléculas de adhesión ELAM-1 y la integrina p150,95.
- 5) Comparar la adherencia o inhibición de la adherencia linfocitaria a endotelio vascular entre los distintos grupos de pacientes, y entre los pacientes y los controles.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

- Pacientes y controles -

Las muestras sanguíneas de los pacientes y controles fueron obtenidas por decisión voluntaria de cada individuo, previamente informados del estudio. Los pacientes fueron seleccionados entre una población de pacientes vistos regularmente en la consulta externa del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), así como de pacientes internados en el Hospital General de México. Todas las muestras sanguíneas fueron procesadas en condiciones de ayuno, entre 9:00 y las 12:00 horas de la mañana, y, en el momento del estudio, ningún individuo presentaba alguna enfermedad fuera de los padecimientos previamente diagnosticados.

En una primera parte, se realizaron estudios preliminares de adherencia de células mononucleares (CMN) de sangre periférica depletadas de macrófagos (MO) a células endoteliales de vena umbilical humana *in vitro*, utilizando una población de 8 pacientes con esclerodermia y 5 pacientes con vasculitis, pareados por edad y sexo con 13 individuos sanos (controles). La edad promedio de los pacientes con esclerodermia fue de 43 años, con un rango de edades de 21 a 65; de vasculitis, un promedio de edades de 44.5 años, con un rango de 30 a 74 años. El tiempo de evolución de la enfermedad fue de 0.5 años a 12 años en el grupo de esclerodermia, y de 2 meses a 9 años, en el grupo de vasculitis. El promedio de edades de los dos grupos de pacientes fue de 44 años, con un rango de 21 a 74 años, y un tiempo de evolución de la enfermedad de 2 meses a 12 años, y la edad promedio de los controles fue de 43 años, con un rango de 23 a 77 años. En la tabla XIV se describen a los individuos incluidos en este estudio.

En una segunda parte, se realizaron estudios de adherencia de linfocitos T a células endoteliales de vena umbilical humana *in vitro*, utilizando una población de 10 pacientes con esclerodermia, 11 pacientes con vasculitis, y 21 controles, pareados por edad y sexo. La edad promedio de los pacientes con esclerodermia fue de 42 años, con un rango de edades de 21 a 65, y un tiempo de evolución de la

Tabla XIV. Edad, sexo, diagnóstico, tiempo de evolución de la enfermedad, y tratamiento de los pacientes incluidos en el estudio de células mononucleares (CMN)

CMN

PACIENTE O CONTROL	EDAD	SEXO	DIAGNÓSTICO	TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD	TRATAMIENTO	CONTROL	
EGP17	ENB	21	F	EGP	6 años	Ninguno	C6
EGP2	FGG	29	M	EGP	1 año	Ninguno	C16
EGP9	HEDA	25	M	EGP, Raynaud	2 años	Ketotifeno	C3
EGP10	RGL	30	M	EGP	2 años	Ninguno	C23
EGP18	CTFA	54	F	EGP, p.tirocoiditis autoinmune	2 años	Ninguno	C20
EGP3	RHS	65	M	CREST	4 años	Ninguno	C21
EGP8	MTHV	65	F	EGP	6 meses	Ninguno	C41
EGP19	RHGP	55	F	EGP	12 años	Voltairen/Winasorb	C32
VASC10B	ICC	33	M	VASC LeucocitoClástica	2 años	Prednisona	C29
VASC11	SCH	42	F	Dermatomiositis	3 años	Ninguno	C22
LEG3	RNSA	43	M	LEG + VASC	1 año	Ninguno	C14
VASC1	RDB	74	F	PAN + Cáncer + Epilepsia	9 años	Raliflex/Parafón F	C33
LEG2	HC	30	F	LEG/Eritema Nodoso, VASC	2 meses	Ninguno	C17
C16	HAL	30	M				
C6	CSR	23	F				
C22	HASH	46	F				
C14	AKW	40	M				
C3	EMH	25	M				
C41	CRC	65	F				
C33	EVR	77	F				
C29	JCC	30	M				
C17	BHC	30	F				
C20	CRS	53	F				
C32	ARV	55	F				
C23	LFPS	27	M				

EGP = Esclerodermia Generalizada Progresiva (Esclerosis Sistémica)
 CREST = Calcinosis Raynaud Hipomotilidad Esofágica Teleangectasias
 VASC = Vasculitis
 LEG = Lupus Eritematoso Generalizado
 PAN = Poliarteritis Nodosa
 p = Probable

Tabla XV. Edad, sexo, diagnóstico, tiempo de evolución de la enfermedad, y tratamiento de los pacientes incluidos en el estudio de linfocitos T

Linfocitos T

PACIENTE O CONTROL	EDAD	SEXO	DIAGNÓSTICO	TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD	TRATAMIENTO	CONTROL	
EGP17	ERB	21	F	EGP	6 años	Ninguno	C6
EMTC2	LNA	25	F	EMTC, AR, SSS	13 años	Hallival, Ranisen	C1
EL-1	LNC	60	F	EL, Hiperlipidemia	1 año	Ninguno	C39
EGP10	RGL	30	M	EGP	2 años	Ninguno	C29
EGP12	SEPG	48	F	EGP, Raynaud	5 años	Ninguno	C20
EGP16	JMS	55	F	EGP	5 años	Ninguno	C32
EGP2	FGG	29	M	EGP	1 año	Ninguno	C38
EGP19	RHGP	55	F	EGP	12 años	Voltarén/Winasorb	C20
EGP7	SHB	65	F	EGP/Diabetes/Hipercolesterolemia	11 años	Ninguno	C43
EGP6	HRSC	29	F	EGP	9 años	Ninguno	C17
VASC10B	ICC	33	M	VASC Leucocitoelástica	2 años	Prednisona	C16
VASC11	SCH	42	F	Dermatomiositis	3 años	Ninguno	C37
LEG3	RHSA	43	M	LEG + VASC	1 año	Ninguno	C19
VASC1	RDB	74	F	PAN + Cáncer + Epilepsia	9 años	Reiflex/Parafón P	C33
LEG2	MC	30	F	LEG/Eritema Nodoso, VASC	2 meses	Ninguno	C2
VASC12	GLA	58	F	LEG + VASC + Sordera bilateral	2 años	Winasorb/Anteporin	C40
VASC2	RHCT	17	F	Arteritis Takayatsu	1 mes	Ninguno	C35
VASC4	JCH	21	M	LEG + VASC + Diátesis Wegener/ Polineuropatía/Atrofia bilateral del nervio óptico	1 año	Ninguno	C9
VASC13	SAS	64	F	Dermatomiositis	14 años	Ligrotón	C41
VASC8,	ARCV	23	F	VASC	2 años	Ninguno	C5
VASC9B	ALVV	28	F	Peniculitis localizada	3 años	AINES/Prednisona	C4
C16	HAL	30	M				
C6	CSR	23	F				
C22	HASH	46	F				
C1	YRP	26	F				
C4	ALWG	28	F				
C41	CRC	65	F				
C33	EVR	77	F				
C29	JCC	30	M				
C17	BHC	30	F				
C20	CRS	53	F				
C32	ARV	55	F				
C39	XLC	58	F				
C38	DLK	27	M				
C43	MPL	68	F				
C40	MJOS	58	F				
C35	EEE	23	F				
C9	PSB	21	M				
C19	AAC	40	M				
C2	SBA	32	F				
C5	AMC	24	F				
C37	EPO	45	F				

EGP = Esclerodermia Generalizada Progresiva (Esclerósis Sistémica)

EMTC = Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo

EL = Esclerodermia Limitada

AR = Artritis Reumatoide

SSS = Síndrome de Sjögren Secundario

VASC = Vasculitis

LEG = Lupus Eritematoso Generalizado

PAN = Poliarteritis Nodosa

enfermedad de 1 año a 13 años. La edad promedio de los pacientes con vasculitis fue de 39 años, con un rango de edad de 17 a 74 años, y un tiempo de evolución de la enfermedad de 1 mes a 14 años. La edad promedio de los dos grupos de pacientes fue de 40 años, con un rango de edad de 17 a 74, y un tiempo de evolución de la enfermedad de 1 mes a 14 años, mientras que la edad promedio en el grupo control fue de 39.5 años, con un rango de edad de 21 a 77.

En la tabla XV se describen a los individuos incluidos en este estudio señalando los padecimientos y tratamientos de cada uno.

**- Separación de células mononucleares (CMN) y subpoblaciones de linfocitos T
a partir de sangre periférica humana -**

Se obtuvo sangre periférica heparinizada de cada paciente o control (40 ml) y se separaron las CMN por centrifugación durante 30 minutos, a 1500 rpm, 18°C (Sorvall RT 6000 D, DuPont, ó CU-5000 centrifuge, Damon/IEC Division) en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (SIGMA), en condiciones estériles (7). Las CMN se lavaron dos veces con buffer de fosfato (PBS), centrifugando por 10 minutos a 1400 rpm, y resuspendiendo en 5 ml de medio RPMI. La población de células adherentes (macrófagos) se separó por cualquiera de los dos métodos descritos a continuación (de preferencia el segundo):

Método 1: en cajas de Petri de plástico estériles se añadieron las CMN a una concentración de 5×10^6 células/ml, incubándose 45 minutos a 37°C, en presencia de CO₂ al 5%, H₂O. Posteriormente se extrajo la población de CMN no adherentes (linfocitos T y B) con 5 lavados de PBS sobre las cajas de Petri.

Método 2: a las CMN *en botón de centrifugación* se añadieron 10 ml de RPMI mezclado con 9.1 mg de Leucine-metil-ester (SIGMA) (efectuando la lisis de los macrófagos y células no T, no B), por cada 50×10^6 células/ml. Las células se incubaron 45 minutos a 25°C, y se lavaron por centrifugación durante 5 minutos a 1400 rpm en medio RPMI (7). Las células no adherentes se resuspendieron en RPMI suplementado con Suero Bovino Fetal de complementado (SBF) (GIBCO) al 10%, ajustadas a una

concentración de 10×10^6 células/ml (contador de glóbulos blancos Coulter-Counter, Coulter Electronics Inc).

Para la separación de subpoblaciones de linfocitos T, se prepararon eritrocitos de carnero frescos (EC), lavándolos 3 veces por centrifugación en PBS por 5 min a 2500 rpm, y se les agregaron 10 ml de solución AET estéril (amino etil tiuronium B) (SIGMA) (1 g AET/ 25 ml PBS), pH 8.5. Los EC se incubaron en esta solución 20 minutos, 37°C , CO_2 , H_2O , agitando cada 5 minutos. Posteriormente se lavaron 4 veces por centrifugación en PBS durante 5 minutos a 2500 rpm, dejándolos a una concentración de 8%. Los linfocitos T se separaron por roseteo de los EC sobre los linfocitos T, añadiendo a la mezcla de células no adherentes, 1 volumen de EC al 8%, y 1/2 volumen de SBF (bloqueo de sitios de unión irrelevantes sobre la superficie eritrocitaria o linfocitaria). Las células se prepararon para roseteo durante 12 horas a 4°C , después de lo cual se separó la población de linfocitos T de la población de linfocitos B, por medio de centrifugación por Ficoll-Hypaque en frío (Sorvall RT 6000 D, DuPont, ó, DPR-6000 Centrifuge, Damon/IEC Division), quedando las células T en el botón, lavadas 2 veces por centrifugación en PBS por 10 minutos a 1400 rpm y ajustadas a una concentración de 10×10^6 células/ml. En algunos casos fué necesario eliminar los eritrocitos contaminates, utilizando una solución de AKC (Merck) (lisis de eritrocitos), 1 ml por cada 10×10^6 células en el botón. Esta solución se aplicó en frío, durante 5 minutos, agitando fuertemente, y diluyendo con PBS frío. Posteriormente se lavó por centrifugación, y se ajustó a la concentración de linfocitos T mencionada. Se realizó un análisis por inmunofluorescencia (FACS Scan, Becton Dickinson) de las poblaciones de linfocitos T, marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD19 (marcador de células B), y se encontró en todos los casos, una pureza superior al 95% (cf. técnica de marcaje por inmunofluorescencia más adelante).

Durante la colecta de muestras de pacientes y controles, las células mononucleares no adherentes, o los linfocitos T se congelaron en criotubos para uso posterior en una solución fresca de 10% DMSO (dimetil sulfóxido) (preservación celular) (SIGMA) y 90% SBF de complementado, en frío ($1\text{ml}/10^6$ células), equilibradas durante 30 minutos a 4°C , transferidas a -70°C por un lapso de 24 horas, y posteriormente guardadas en nitrógeno líquido durante el tiempo necesario, hasta su uso.

- Extracción y cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) -

Se obtuvieron muestras de cordón umbilical humano, de mujeres y bebés sanos, gracias a la contribución de la Dirección Médica del Hospital de GinecoObstetricia #4 del IMSS, sin mediación económica alguna. Cada cordón umbilical se obtuvo en condiciones estériles dentro de las salas de labor/expulsión, o en los quirófanos de cesárea programada. Las muestras fueron procesadas en fresco y en condiciones estériles, en un lapso menor de 6 horas después del parto. De acuerdo a la técnica descrita por Jaffe (98), con ligeras modificaciones (87,100,149,176,228), 20 a 30 cm de cordón umbilical fueron sumergidos en medio RPMI suplementado con Penicilina (50U/ml) - Estreptomicina (50µg/ml) (GIBCO), y con el antimicótico anfotericina B (Amfostat, SQUIBB) (0.25 µg/ml), desde su obtención hasta su procesamiento. Cada cordón se limpió con etanol al 70%, y la vena umbilical se perfundió (utilizando un catéter) con medio RPMI con 10% de SBF de complementado. Una vez permeada la vena, se desprendieron las células endoteliales (CE) utilizando colagenasa (SIGMA) al 0.1% en RPMI al 10% de SBF de complementado. Se sembraron frascos de cultivo (FALCON) tras dos lavados por centrifuga en medio modificado de Dulbecco Iscove (GIBCO), suplementado con 20% de SBF de complementado, L-glutamina, 25mM HEPES, penicilina-estreptomicina, anfotericina B, y 75 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales (Endothelial Cell Growth Supplement - Bovine Neural Tissue, SIGMA). Las CE se cultivaron por un espacio de 4 a 10 días hasta adquirir confluencia en monocapa (aparición "empedrada"), y la pureza de la población endotelial fue identificada por inmunofluorescencia indirecta utilizando la aglutinina I (lectina) de *Ulex europaeus*, marcada con FITC (UEA I, SIGMA), proteína característica de la superficie de células endoteliales. Se tripsinizaron las CE, utilizando Trpsina-EDTA al 0.25% (GIBCO) (1.5 ml para frascos de cultivo chicos, 3ml para frascos de cultivo grandes), con el objeto de despegar las CE del frasco de cultivo y volverlas a sembrar (estimulando las propiedades de adherencia de dichas células), en frascos de cultivo más grandes o en microplacas de cultivo de 24 pozos (FALCON). Para los estudios de adherencia, las CE se sembraron en microplacas de cultivo al cabo del segundo o tercer pasaje.

- Estudios de adherencia linfocitaria a endotelio vascular *in vitro* -

* Medición de adherencia por microscopía

En los estudios de adherencia, ya sea de CMN (preliminares) o de linfocitos T, se sembraron 50,000 células endoteliales en cada pozo de las microplacas de cultivo, según la técnica de Takeuchi (210), con algunas adaptaciones. Una vez que las células adquirieron confluencia, se establecieron las siguientes 8 condiciones experimentales por duplicado sobre las CE, (por cada placa de cultivo): sin estímulo, estímulo mitogénico (PHA) (estimula linfocitos T al adherirse a CD2 induciendo mitosis) (115) (GIBCO), en presencia del anticuerpo monoclonal anti-beta2microglobulina (SIGMA) (anticuerpo irrelevante/control), en presencia del anticuerpo monoclonal anti-p150,95 (donación del Dr. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid), en presencia del anticuerpo monoclonal anti-ELAM-1 (donación del Dr. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid), anti-beta2microglobulina¹ + PHA, anti-p150,95 + PHA, anti-ELAM-1 + PHA. Primero se lavaron los pozos 1 vez con PBS, y se dejaron 200 µl de medio ISCOVE en cada pozo. Después se añadió la PHA (5µl/pozo de 500 µl, índice de estímulo = 0.2µg/ml de acuerdo al lote) durante 30 minutos a 37°C, 5% CO₂, H₂O, y posteriormente se añadieron los anticuerpos (0.1 µl/pozo de 500 µl, dilución de 1:5000², índice de estímulo = 10µg/ml) durante 30 minutos a 37°C, 5% CO₂, H₂O. Simultáneamente, para la preparación de las muestras de linfocitos T ó CMN, se descongelaron viales de 10 x 10⁶ células/ml del nitrógeno líquido, en una solución de 15 ml de SBF de complementado + 5 ml de RPMI, a 37°C en baño María de forma inmediata. Las células en suspensión, se dejaron equilibrar durante 30 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual, se centrifugaron 10 minutos, a 1300 rpm. Se lavaron por centrifugación en medio RPMI durante 5 minutos a 1400 rpm. Se determinó la viabilidad de las células al microscopio, en cámara de Neubauer y por

¹ En los estudios preliminares de adherencia con CMN, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-beta2glicoproteína (anticuerpo irrelevante) (ascitis 1mg/ml, donación del Dr. Luis Llorente, INNSZ), pero puesto que los resultados con este anticuerpo fueron inconsistentes, se seleccionó otro anticuerpo control.

² Después de haber realizado experimentos para determinar una curva de titulación de actividad óptima de los anticuerpos utilizados, se seleccionó la dilución de 1:5000, como la apropiada para los estudios.

exclusión con azul tripano, siendo esta viabilidad superior al 80%. Después de contar el número de células totales por el método de Coulter, se añadieron en cada pozo de las placas de microcultivo, 250,000 linfocitos T (o CMN), en una proporción de 1:5 (T ó CMN: CE) (14, 87). La adherencia se llevó a cabo durante un lapso de 2 horas a 37°C, 5% CO₂, H₂O. Al término de ésta, se levantaron los sobrenadantes de los pozos (conteniendo la población de linfocitos no adheridos), y se enjuagaron los pozos 3 veces, con medio PBS. Finalmente, se cubrieron los pozos con 200 µl de glutaraldehído al 1.25% durante toda la noche, a 4°C, con el fin de fijar los complejos T:CE (ó CMN:CE). Al día siguiente, se cubrieron las placas con 500 µl de azul tripano al 4% durante 45 minutos, después de lo cual se lavaron 2 veces con medio PBS. Se observó cada pozo al microscopio (ZEISS 473012-9902 e IRASCOPE SI-PH de contraste de fase) y se contó el número de linfocitos adheridos a las células endoteliales por campo, mediante exclusión por azul tripano (objetivo de 25x en el Zeiss, objetivo de 25x en el Irascope, oculares de 10x en ambos, por lo tanto, aumentos de 250x), observándose 3 campos por pozo y promediando el resultado; posteriormente se usó el promedio final de los pozos por duplicado, para cada condición experimental. Fué necesario realizar un factor de corrección al microscopio de acuerdo a lo observado por campo, para ajustarlo a lo observado por pozo, y de acuerdo al aumento propio del objetivo seleccionado (cf. Apéndice).

Se calcularon los porcentajes de adherencia, de acuerdo a la siguiente fórmula (cf. Apéndice) (Norberto Reyes, Zeiss, comunicación personal):

$$\% \text{ Adherencia/pozo} = \frac{\# \text{ Linfocitos adheridos}}{\# \text{ Linfocitos totales sembrados}} \times \text{Factor de Corrección} \times 100$$

Finalmente se fotografiaron los pozos de algunas placas, utilizando dos microscopios, el microscopio IRASCOPE SI-PH, con una cámara de 35 mm adaptada manualmente (LEIKA) (250x), y el microscopio REINHERT-JUNG, con cámara POLYSPEC-POLYVAR con un aumento propio del objetivo de 4x, y un aumento del ocular de 10x, dando un aumento total de 40x. Solamente se fotografiaron las placas de

experimentos de adherencia con linfocitos T.

*** Medición de adherencia por Inmunofluorescencia (FACS)**

Simultáneamente, se realizaron los mismos estudios de adherencia a microplacas de 24 pozos, con HUVEC en confluencia, pero la detección de la adherencia se realizó por inmunofluorescencia en el fluorocitómetro FACS-Scan. Se utilizaron células T ó CMN de algunos de los mismos pacientes utilizados para los estudios de adherencia por microscopía (no fue posible obtener muestras adicionales frescas de linfocitos T); 5 pacientes con esclerodermia (EGP 19, EGP7, EGP7, EGP2, EMTC2), 6 con Vasculitis (VASC10, LEG2, VASC13, VASC4, LEG3, VASC2), y 5 controles sanos (C19, C38, C6, C1, C40). El método fue el siguiente (Luis Llorente, comunicación personal, 1993):

En placas diferentes, se realizaron los mismos estudios de adherencia ya descritos, bajo las mismas condiciones, más una adicional por duplicado: **células endoteliales SOLAS (sin linfocitos)**, como control negativo. Después de haber cumplido las dos horas de adherencia, se añadieron 100µl de EDTA (Baker) al 2% (concentración adecuada para garantizar la estabilidad de la adherencia linfocitaria) a cada pozo, y se utilizó un émbolo de jeringa de 1ml (insulina), para recoger los complejos linfocitos/CE, y despegarlos del plástico (función semejante a un "rubber policeman"). Las placas se mantuvieron así durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes individualmente, en viales de plástico para FACS (Falcon 2058). En suma, se agregaron 5×10^6 linfocitos T o CMN en un vial por separado. Se lavaron todos los viales por centrifugación con PBS durante 10 minutos a 1400 rpm. A todos los botones de las muestras, se agregaron 2.5 µl (asumiendo una población linfocitaria de 250,000) de anticuerpo monoclonal anti-CD3-RITC (**rodamina isotiocianato, fluoresce rojo, marcador de linfocitos T**), y 1 µl (asumiendo que las HUVEC hayan alcanzado una confluencia de 100,000 células) del anticuerpo monoclonal **Ulex Europaeus UEA I-FITC (fluoresceína isotiocianato, fluoresce verde, marcador de células endoteliales)**. Las únicas excepciones, fueron los viales de las **células endoteliales solas**, y de los **linfocitos T (o CMN) solos**, que recibieron respectivamente, 5 µl de **Ulex Europaeus UEA I-FITC** y 5 µl de **anti-CD3-RITC**.

Después de añadir los anticuerpos a las muestras, estas permanecieron durante 20 minutos a 4°C. Se mezclaron por vórtex, y se lavaron las muestras por centrifugación 2 veces durante 5 minutos, a 1500 rpm, en 1.5 ml de PBS frío al 1 % de Suero de Caballo de complementado (5% azida de sodio) (SIGMA). Después de eliminar el sobrenadante, se fijaron las células en 0.5 ml de formaldehído al 1% (Baker), agitando por vórtex cada vial. Los viales permanecieron a 4°C durante toda la noche, y se leyeron los resultados por inmunofluorescencia al día siguiente (FACS Scan), midiendo FL1 vs FL2, aislando por "gating" los complejos celulares de detritus, obteniendo estadísticamente el porcentaje de adherencia de linfocitos T a las CE, vía el programa computacional del FACS Scan.

- Análisis estadístico -

El valor significativo **Interexperimental** de los porcentajes de adherencia por microscopía se midieron 1) al interior de cada grupo de individuos (esclerodermia, vasculitis, y controles), 2) comparativamente entre los tres grupos de individuos, y 3) entre los dos grupos de pacientes juntos, comparados con el grupo de controles.

Para este tipo de análisis y con el número de individuos utilizados en este estudio, se utilizó estadística no paramétrica, por los métodos de Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney/Prueba de Wilcoxon (SPSS/PC+ "The Statistical Package for IBM PC"). En suma, se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas para verificar la validez **Intraexperimental** de los estudios de adherencia por microscopía (desviaciones estándar, frecuencias, media...), (programa computacional "Harvard Graphics").

VI. RESULTADOS

Estudios de adherencia linfocitaria a HUVEC por microscopía

1) PHA induce un incremento en la adhesión linfocitaria a endotelio

En estudios preliminares realizados con células mononucleares depletadas de macrófagos, se determinó que la adherencia a endotelio HUVEC de dichas células fue mayor en condiciones de estímulo por medio de PHA que en condiciones basales (sin estímulo).

La figura 10 y la tabla XVI muestran el porcentaje promedio de adherencia de las CMN a HUVEC tanto en individuos sanos (n=13) como en los pacientes con esclerodermia (n=8) y vasculitis (n=5). En todos los casos se observó un incremento de adherencia bajo estímulo, siendo éste mayor en el grupo de esclerodermia (24.67%) y en el grupo de vasculitis (20.28%) que en los controles (5.23%). En condiciones basales, la adherencia fue mayor en el grupo de esclerodermia (3.99%), y posteriormente en el grupo de vasculitis (2.48%), mientras que en el grupo de controles fue de 1.61%.

Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis en estas poblaciones pequeñas, resultando en una diferencia en los datos obtenidos entre los tres grupos ($p = 0.0570$). Sin embargo, las diferencias entre el grupo de vasculitis y el grupo de esclerodermia, así como entre los grupos de pacientes con respecto al grupo de controles no fueron significativas.

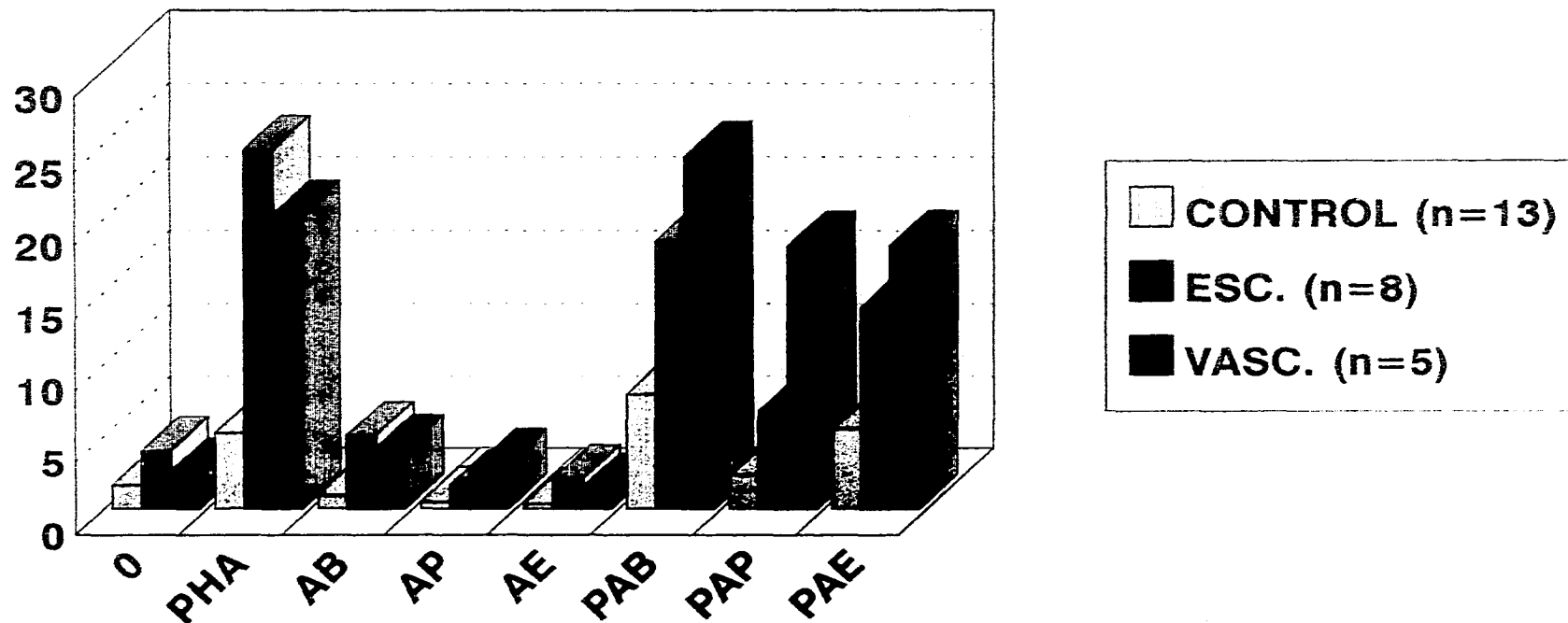
En los estudios realizados con linfocitos T purificados, se verificó que la adherencia linfocitaria a endotelio era mayor en presencia de PHA que en ausencia de ella.

La figura 11 y la tabla XVII muestran el porcentaje promedio de adherencia de linfocitos T a células HUVEC en individuos sanos (n=21), pacientes con esclerodermia (n=10), y pacientes con vasculitis (n=11). Nuevamente, en todos los casos se observó un incremento en la adherencia linfocitaria, partiendo de valores de 1.65% en el grupo de controles, 5.53% en el grupo de esclerodermia, y 8.64%

Figura 10. Porcentaje promedio de adherencia de CMN depletadas de macrófagos a células endoteliales *in vitro*, en individuos sanos comparados con pacientes con esclerodermia y vasculitis.

PORCENTAJE PROMEDIO DE ADHERENCIA DE CMN DEPLETADAS DE MØ A CÉLULAS ENDOTELIALES IN VITRO, EN INDIVIDUOS SANOS VS PACIENTES CON ESCLERODERMIA Y VASCULITIS

% Promedio de adherencia/pozo



AB = Anti-beta2glicoproteína AP = Anti-p150,95 AE = Anti-ELAM-1
 P = PHA Células Endoteliales = CEVUH

Tabla XVI. Porcentaje promedio de adherencia de CMN depletadas de macrófagos a células endoteliales *in vitro*, en individuos sanos comparados con pacientes con esclerodermia y vasculitis.

**PORCENTAJE PROMEDIO DE ADHERENCIA DE CMN DEPLETADAS
DE MO A CÉLULAS ENDOTELIALES IN VITRO, EN INDIVIDUOS
SANOS VS PACIENTES CON ESCLERODERMIA Y VASCULITIS**

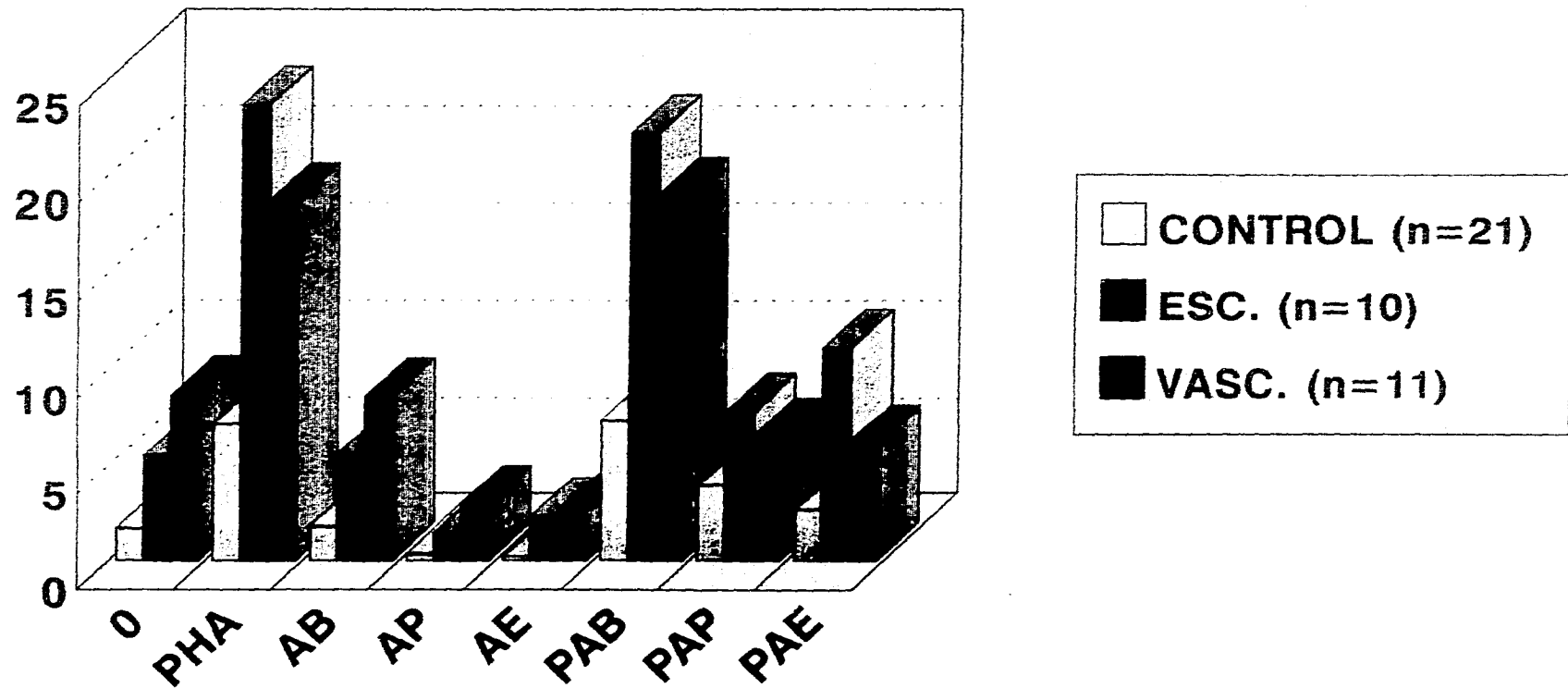
	0	PHA	AB	AP	AE	PAB	PAP	PAE
CONTROL (n=13)	1.61	5.23	0.93	0.49	0.35	7.98	2.33	5.54
ESC. (n=8)	3.99	24.67	5.05	1.6	2.03	18.5	6.82	13.98
VASC. (n=5)	2.48	20.28	4.13	3.16	1.39	24.22	18.15	18.21

AB = Anti-beta2glicoproteína AP = Anti-p150,95 AE = Anti-ELAM-1
P = PHA Células Endoteliales = CEVUH

Figura 11. Porcentaje promedio de adherencia de células T a células endoteliales *in vitro*, en individuos sanos comparados con pacientes con esclerodermia y vasculitis.

PORCENTAJE PROMEDIO DE ADHERENCIA DE CÉLULAS T A CÉLULAS ENDOTELIALES IN VITRO, EN INDIVIDUOS SANOS VS PACIENTES CON ESCLERODERMIA Y VASCULITIS

% Promedio de adherencia/pozo



AB = Anti-beta2microglobulina AP = Anti-p150,95 AE = Anti- ELAM-1
 P = PHA Células Endoteliales = CEVUH

Tabla XVII. Porcentaje promedio de adherencia de células T a células endoteliales *in vitro*, en individuos sanos comparados con pacientes con esclerodermia y vasculitis.

**PORCENTAJE PROMEDIO DE ADHERENCIA DE CÉLULAS T
A CÉLULAS ENDOTELIALES IN VITRO, EN INDIVIDUOS SANOS
VS PACIENTES CON ESCLERODERMIA Y VASCULITIS**

	0	PHA	AB	AP	AE	PAB	PAP	PAE
CONTROL (n=21)	1.65	7.2	1.76	0.37	0.22	7.4	3.92	2.63
ESC. (n=10)	5.53	23.58	5.61	1.44	2.3	22.11	7.79	11.06
VASC. (n=11)	8.64	18.54	8.58	2.95	2.63	18.83	6.5	6.19

AB = Anti-beta2microglobulina AP = Anti-p150,95 AE = Anti- ELAM-1
P = PHA Células Endoteliales = CEVUH

en el grupo de vasculitis, en condiciones basales, a valores de 7.20% (controles), 23.58% (esclerodermia), y 18.54% (vasculitis), bajo estímulo con PHA. El análisis por Kruskal-Wallis reveló entre los tres grupos estudiados diferencias significativas de $p = 0.0000$ tanto en condiciones basales como en presencia de PHA.

Para confirmar la validez de los hallazgos, se realizaron estudios estadísticos intra-experimentales que consistieron en lo siguiente: se midió la adherencia de linfocitos T sobre un mismo control por sextuplicado, así como sobre un paciente de esclerodermia y uno de vasculitis (por sextuplicado) en todas las condiciones experimentales. La tabla *Estadística Intra-experimental* en el Apéndice presenta las desviaciones estándar y las medias de los resultados obtenidos en los tres grupos, demostrando que cada condición experimental (medidas por sextuplicado), para cada individuo, era reproducible, (bajos valores de desviación estándar).

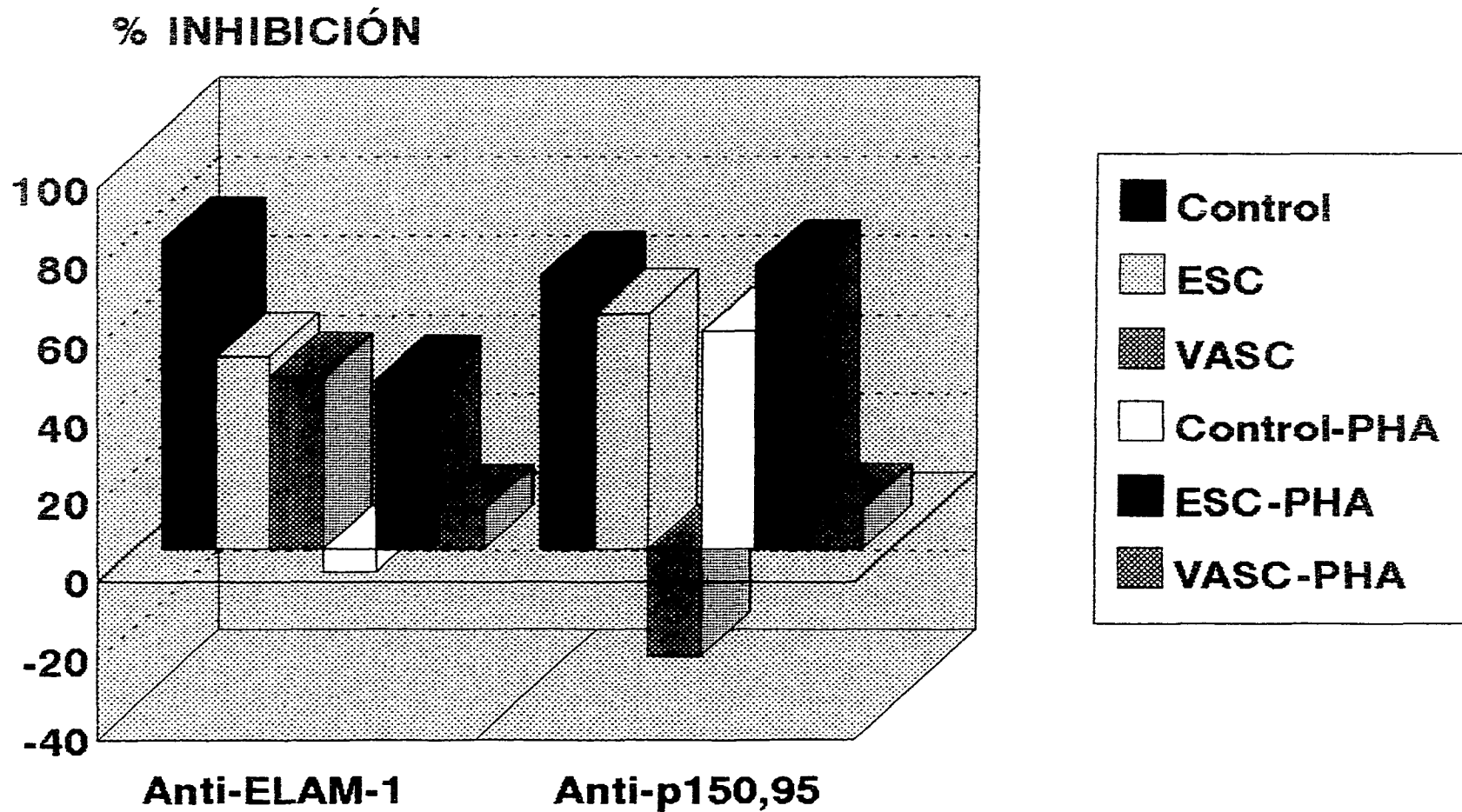
2) Los anticuerpos monoclonales anti-p150,95 y anti-ELAM-1 Inhiben significativamente la adherencia de linfocitos a HUVEC

En los estudios preliminares realizados sobre CMN se determinó que los anticuerpos monoclonales específicos contra ELAM-1 y p150,95 inhibían la adherencia de CMN depletadas de macrófagos a HUVEC.

En la figura 10 y tabla XVI se muestran los promedios de adherencia de las CMN a endotelio en presencia de los anticuerpos anti- $\beta 2$ glicoproteína, anti-p150,95 y anti-ELAM-1, tanto en condiciones basales como en presencia de PHA. En la figura 12 se muestra el porcentaje de inhibición de la adherencia de CMN a HUVEC en presencia de anti-ELAM-1 o anti-p150,95 en condiciones basales o de estímulo. En condiciones basales se observó una mayor inhibición en el grupo de controles (78.3% anti-ELAM-1; 69.6% anti-p150,95) que en los grupos de pacientes para cada anticuerpo. En cambio, en condiciones de estímulo, no se observó inhibición de la adherencia para el grupo de controles. Por otra parte, se observó una mayor inhibición en la adherencia en el grupo de esclerodermia que en el grupo

Figura 12. Porcentaje de inhibición de la adherencia de CMN a células endoteliales *in vitro*, en individuos sanos comparados con pacientes con esclerodermia y vasculitis.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ADHERENCIA DE CMN A CÉLULAS ENDOTELIALES IN VITRO, EN INDIVIDUOS SANOS VS PACIENTES CON ESCLERODERMIA Y VASCULITIS



de vasculitis en todas las condiciones.

El anticuerpo anti- β 2 glicoproteína generó resultados inconsistentes con respecto a su efecto sobre la adherencia linfocitaria, en algunos casos incrementando la adherencia, y en otros disminuyendola, tanto en condiciones basales como de estímulo. Estos resultados no fueron significativos estadísticamente.

En los estudios realizados con linfocitos T se corroboraron varios de los resultados previos en CMN.

En la figura 11 y tabla XVII se muestran los porcentajes promedio de adherencia de los distintos grupos (controles, esclerodermia, vasculitis) en presencia de los anticuerpos anti- β 2 microglobulina, anti-p,150,95 y anti-ELAM-1, en condiciones basales y en presencia de PHA. En la figura 13 se muestra el porcentaje de inhibición en la adherencia de células T tanto en condiciones basales como de estímulo.

Tanto el anticuerpo anti-ELAM-1 como el anticuerpo anti-p150,95 indujeron una disminución en la adherencia en todos los grupos en condiciones basales y en condiciones de estímulo, ($p=0.0001$ Kruskal-Wallis), con porcentajes de inhibición entre 58% y 87% en condiciones basales, y 46% a 67% en condiciones de estímulo.

No se apreciaron diferencias concluyentes en la inhibición de la adherencia linfocitaria entre los distintos grupos de controles y pacientes.

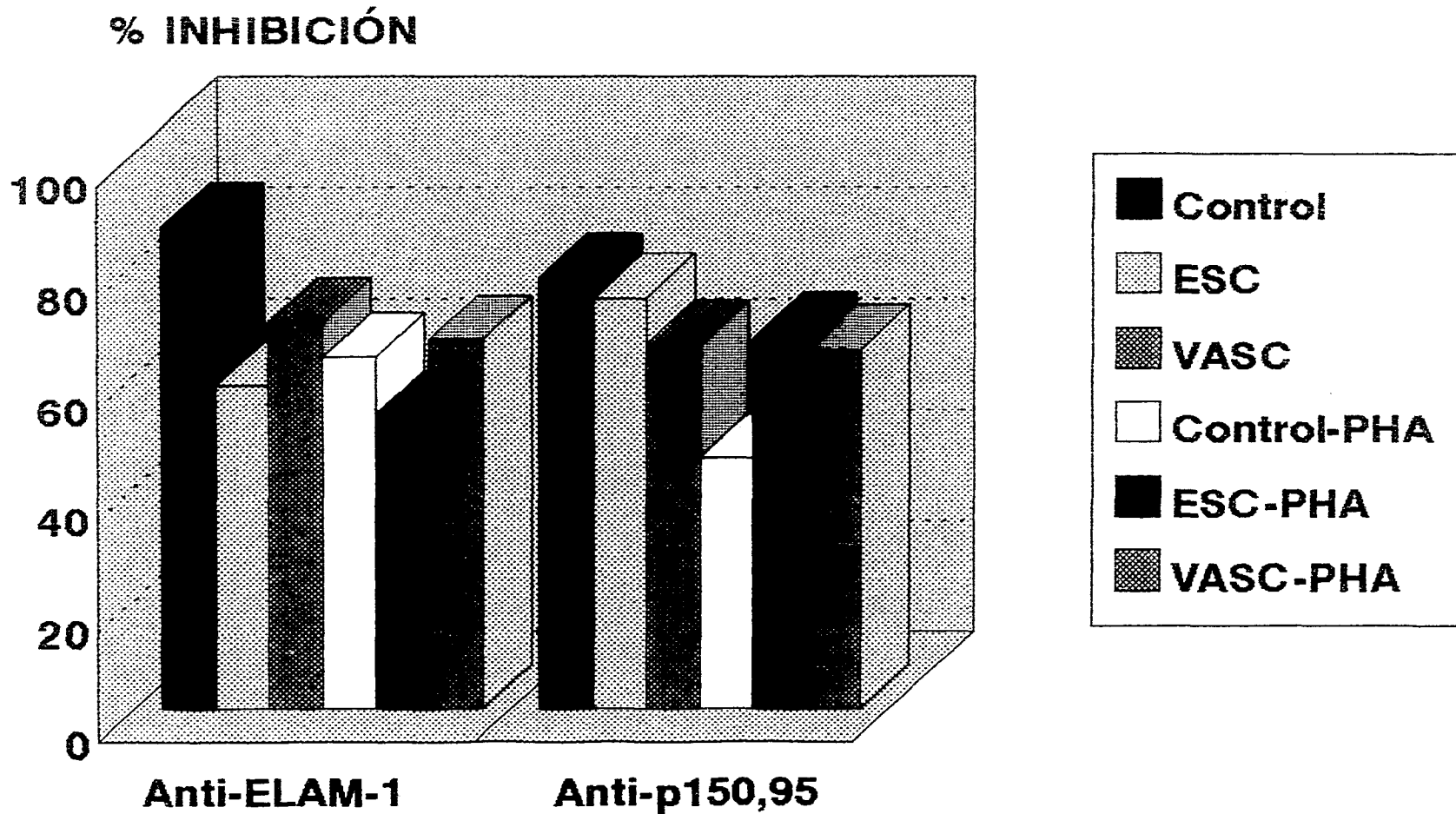
El anticuerpo anti- β 2 microglobulina no mostró ningún cambio importante con respecto a los resultados obtenidos en condiciones basales o en presencia de PHA en cada uno de los tres grupos estudiados y entre ellos.

3) La adherencia linfocitaria a endotelio es mayor en pacientes con esclerodermia y en pacientes con vasculitis que en individuos sanos.

En la figura 10 y tabla XVI se puede apreciar que la adherencia promedio de CMN a endotelio es mayor en todas las condiciones experimentales, en los pacientes con esclerodermia y en los pacientes con vasculitis, que en el grupo de controles.

**Figura 13. Porcentaje de inhibición de la adherencia de células T
células endoteliales *in vitro*, en individuos sanos comparados
con pacientes con esclerodermia y vasculitis.**

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ADHERENCIA DE CÉLULAS T A CÉLULAS ENDOTELIALES IN VITRO, EN INDIVIDUOS SANOS VS PACIENTES CON ESCLERODERMIA Y VASCULITIS



En la figura 11 y tabla XVII se confirmaron los resultados de estos hallazgos, demostrando que para la población de linfocitos T específicamente, la adherencia fue mayor en los grupos de pacientes con esclerodermia y vasculitis que en el grupo de controles.

El análisis por medio de la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon sobre este último estudio, demostró una diferencia significativa entre el grupo de vasculitis y el grupo de controles de $p=0.0001$.

También se encontraron diferencias significativas entre el grupo de esclerodermia y el grupo de controles, con valores de $p<0.0008$.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de esclerodermia y el grupo de vasculitis en ninguna de las dos poblaciones celulares.

Las figuras 14 a 30 muestran fotografías tomadas sobre células de algunos de los pacientes de esclerodermia (EGP2, EL-1), vasculitis (LEG3) y controles (C6) incluidos en el estudio de linfocitos T. Se incluyen fotografías de distintos aumentos; de 250X (figuras 14 a 26) y de 100X (figuras 27 a 30).

La figura 14 muestra un cultivo de células HUVEC en confluencia en ausencia de linfocitos, anticuerpos, o PHA como control absoluto.

Se observa en particular que la adherencia de linfocitos T a endotelio en condiciones normales, en individuos sanos, es relativamente baja, pero que ésta aumenta en presencia de PHA (figura 15).

Las fotografías presentan evidencia irrefutable de la adherencia elevada en pacientes con esclerodermia y vasculitis a diferencia de individuos sanos (figuras 19 (vasculitis) y 23,28 (esclerodermia).

Además, en estos resultados, [figuras 17,21,25,29 (anti-p150,95) y 18,22,26,30 (anti-ELAM-1)] se puede observar claramente el efecto inhibitorio de los anticuerpos monoclonales anti-ELAM-1 y anti-p150,95 sobre la adherencia de linfocitos T a endotelio.

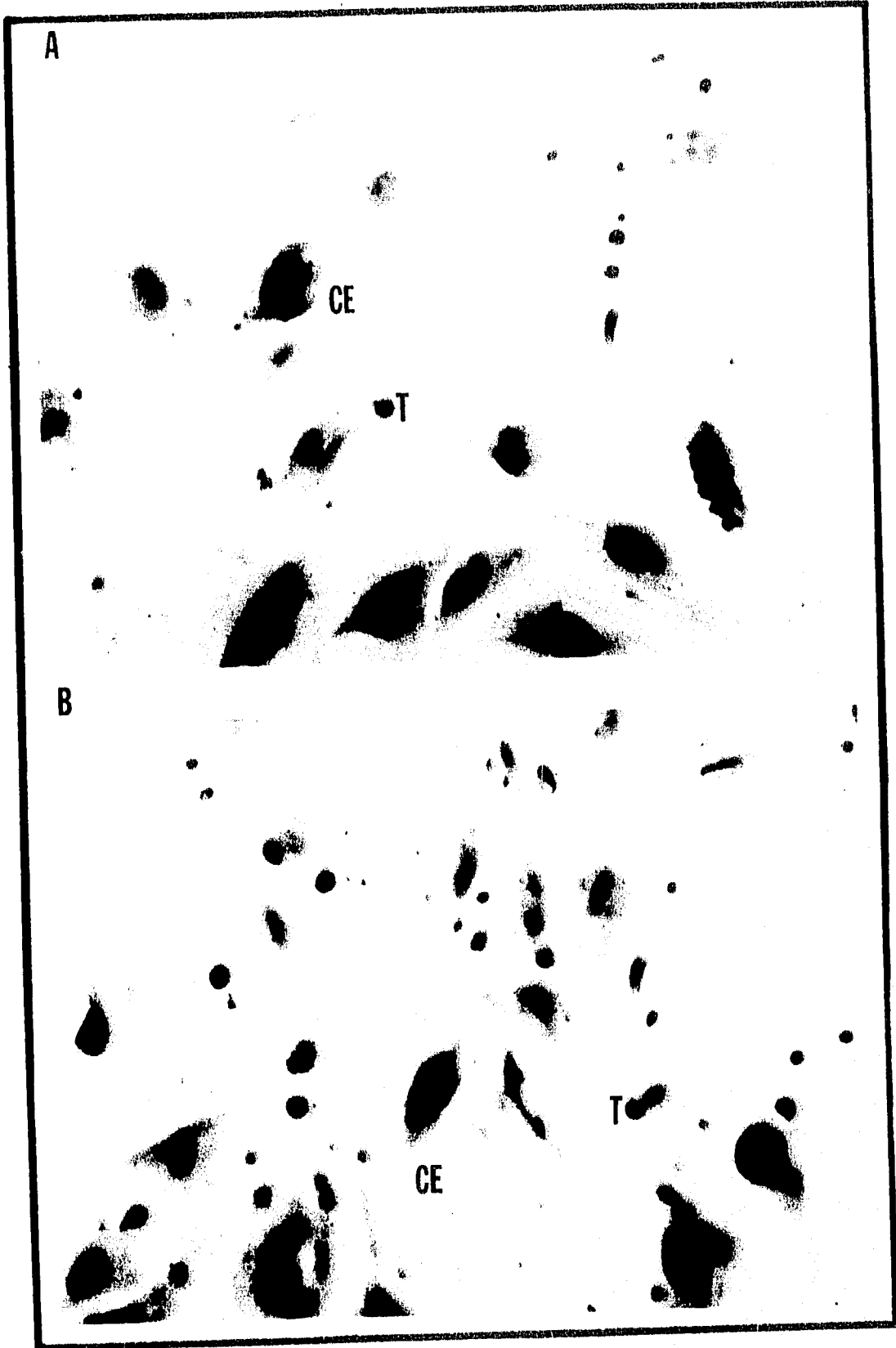
También se puede observar que el anticuerpo anti- $\beta 2$ microglobulina no produce cambios significativos en la adherencia de linfocitos T a endotelio, en condiciones basales (0 vs AB), y de estímulo (PHA vs PAB) (figuras 16,20,24).

Cabe mencionar que en los estudios preliminares realizados con CMN, en un principio se observó

Figura 14. Células endoteliales HUVEC confluentes en estado basal.
Aumento : 250 X



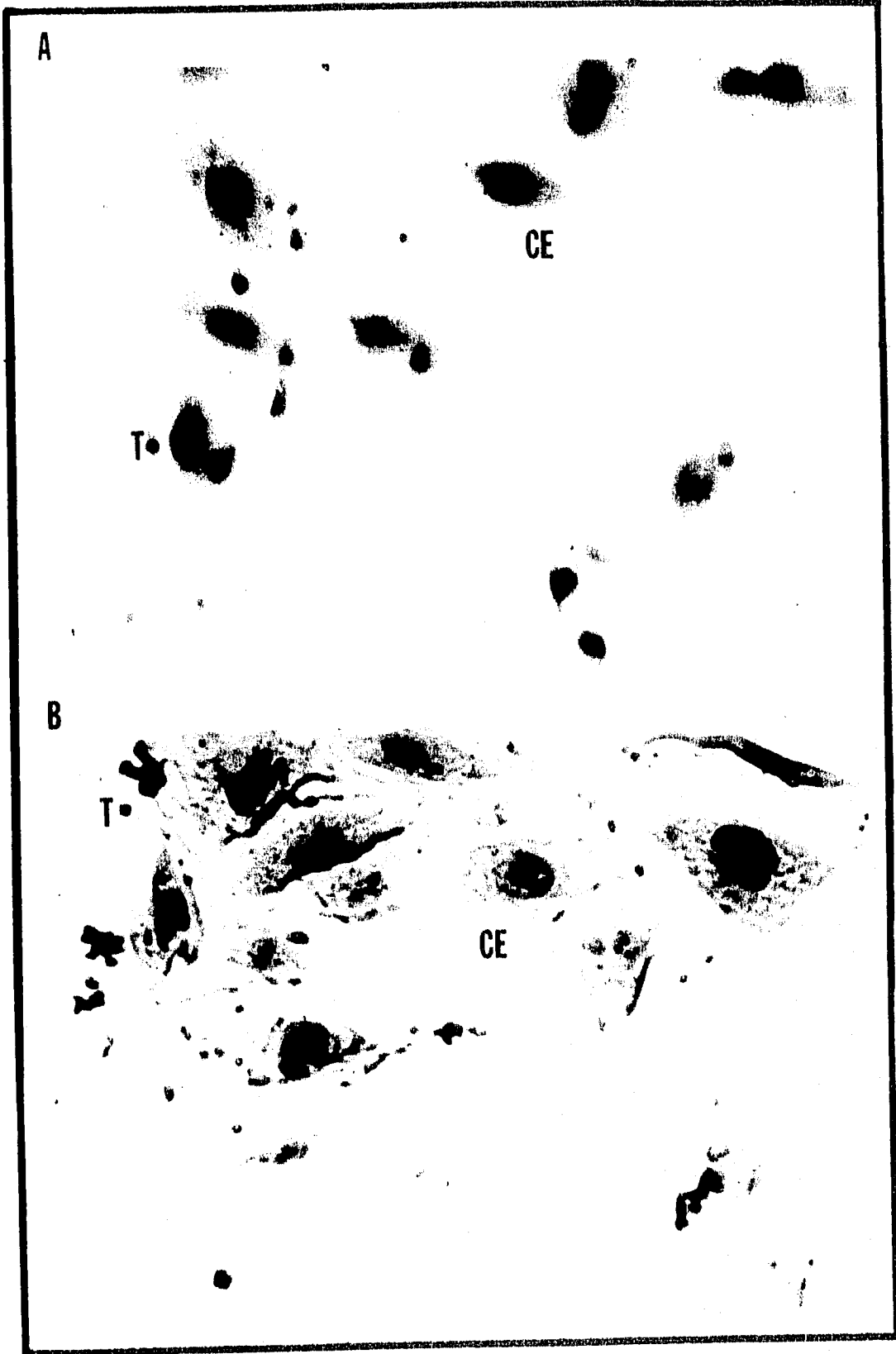
**Figura 15. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro* con linfocitos T de un individuo sano (T) (Control 6).
A. Estado basal (0) B. Estímulo mitogénico (PHA)
Aumento : 250 X**



0

pha

Figura 16. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un individuo sano (T) (Control 6).
A. anti- β 2 microglobulina (ab)
B. PHA + anti- β 2 microglobulina (pab)
Aumento : 250 X



A

CE

T

ab

B

CE

T

pab

Figura 17. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un individuo sano (T) (Control 6).
A. anti-p150,95 (ap) B. PHA + anti-p150,95 (pap)
Aumento : 250 X

A

CE

T

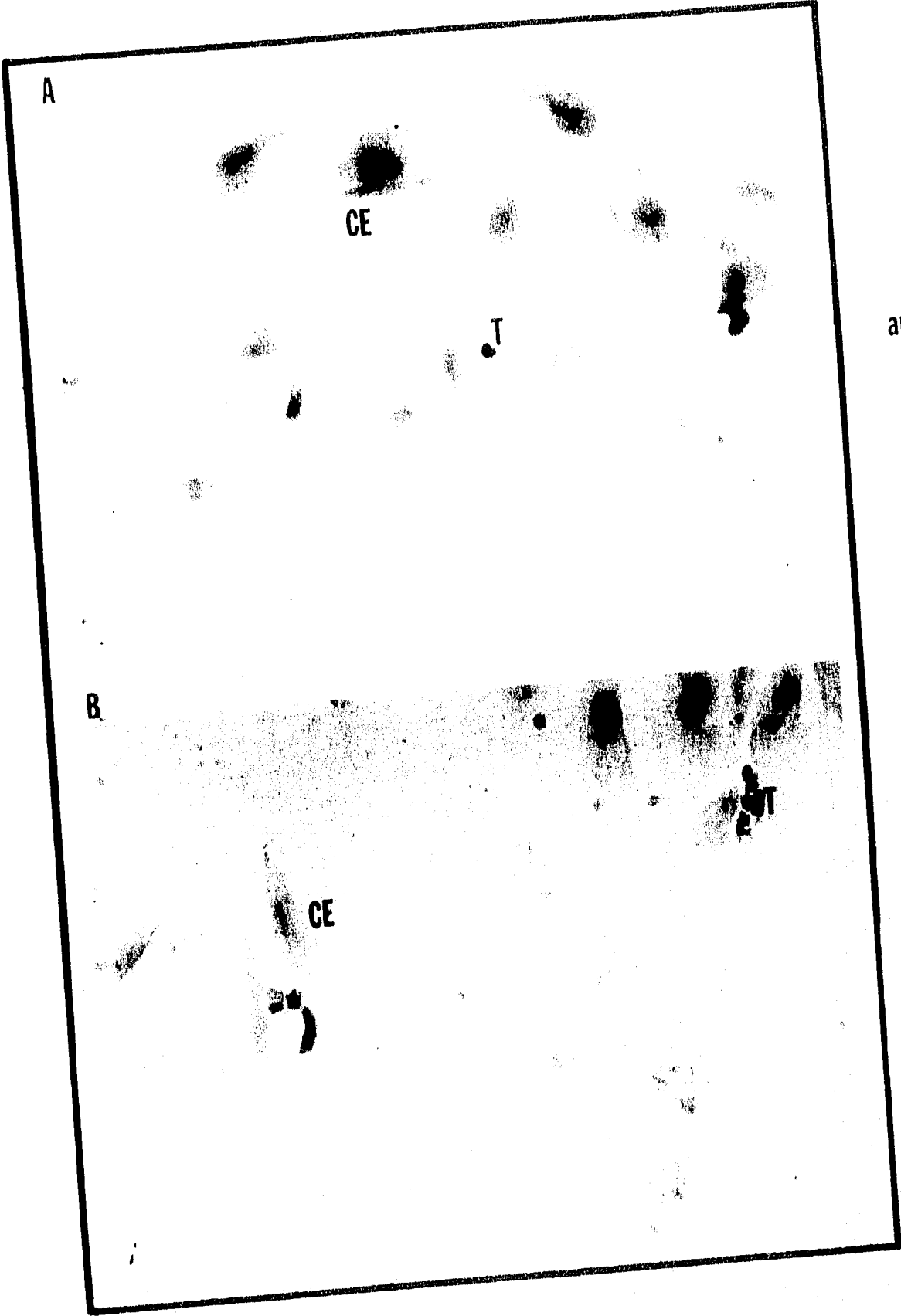
ap

B

CE

T

pap



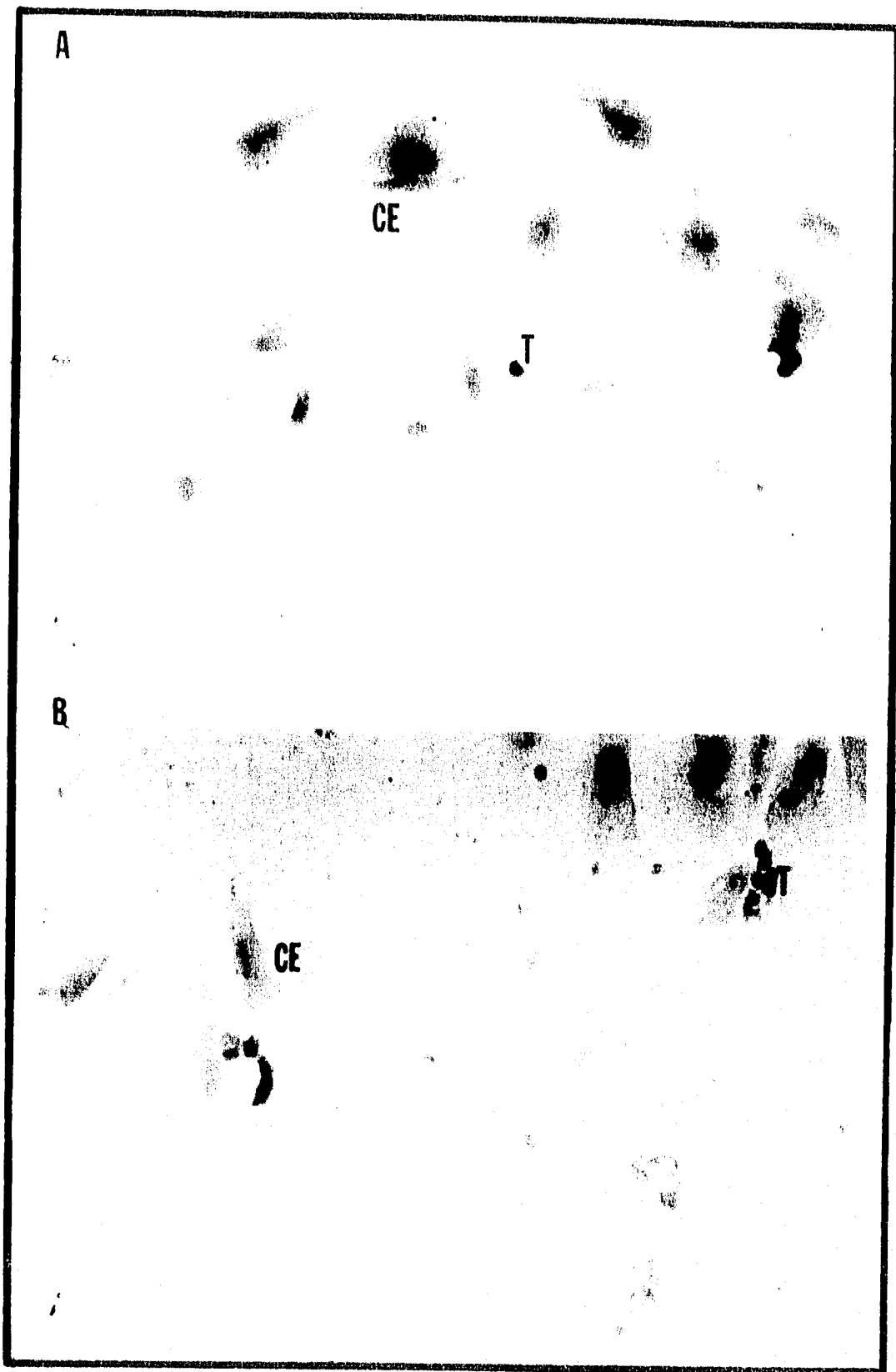


Figura 18. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un individuo sano (T) (Control 6).
A. anti-ELAM-1 (ae) B. PHA + anti-ELAM-1 (pae)
Aumento : 250 X

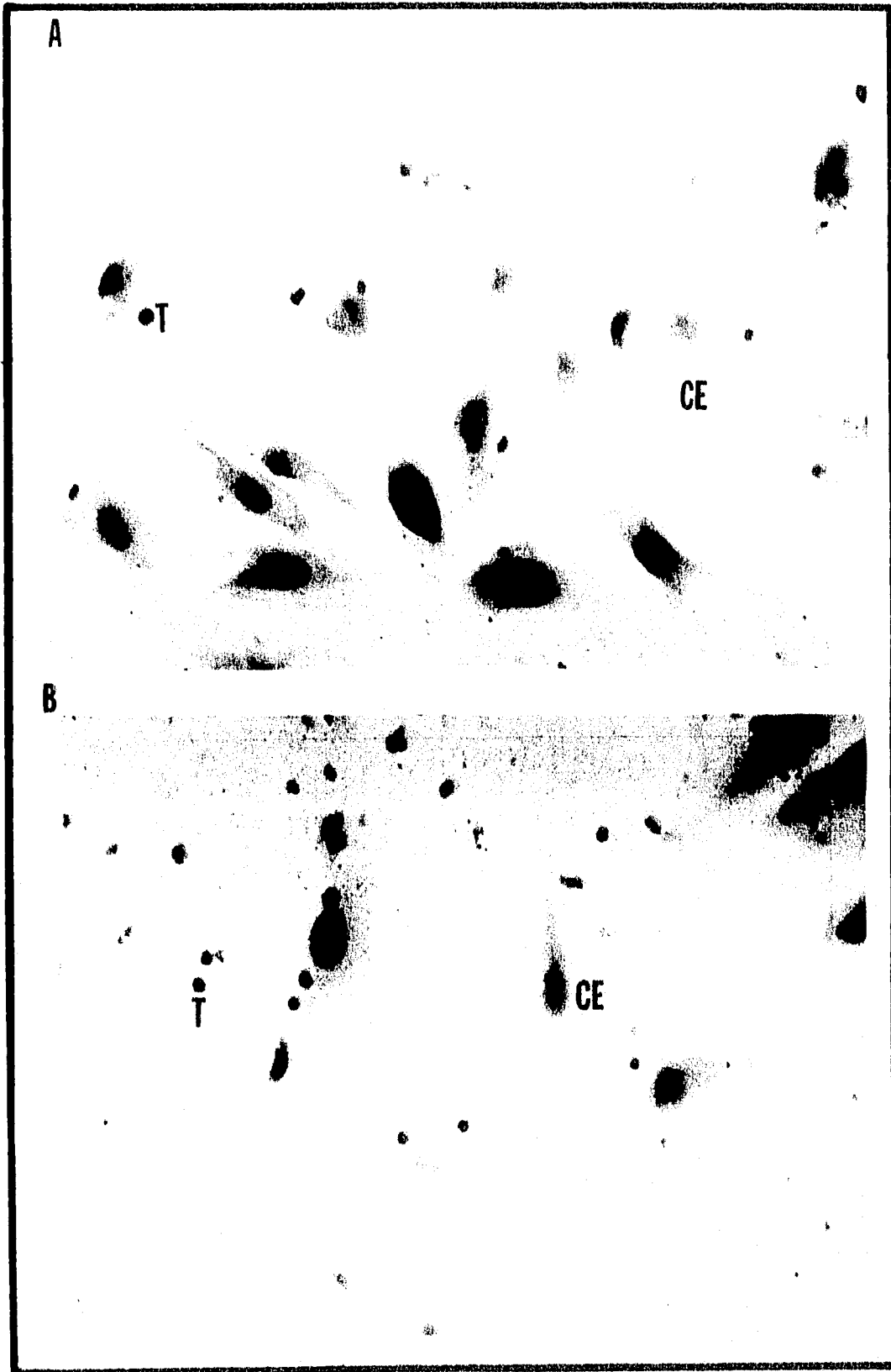
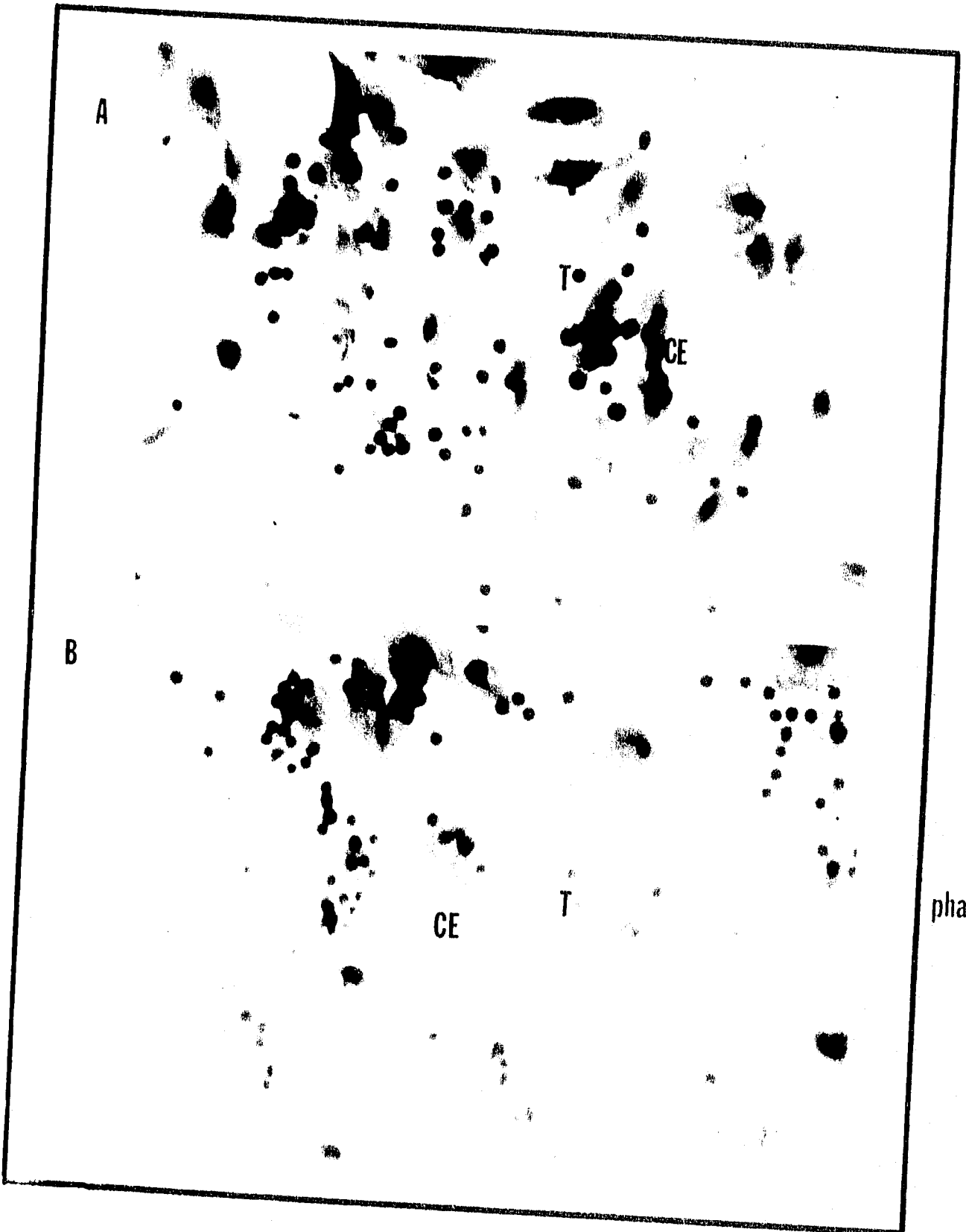


Figura 19. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un paciente con vasculitis (T) (LEG3).
A. Estado basal (0) B. Estímulo mitogénico (PHA)
Aumento : 250 X

LEG 3



0

pha

Figura 20. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro* con linfocitos T de un paciente con vasculitis (T) (LEG3).

A. anti- β 2 microglobulina (ab)

B. PHA + anti- β 2 microglobulina (pab)

Aumento : 250 X

LEG 3

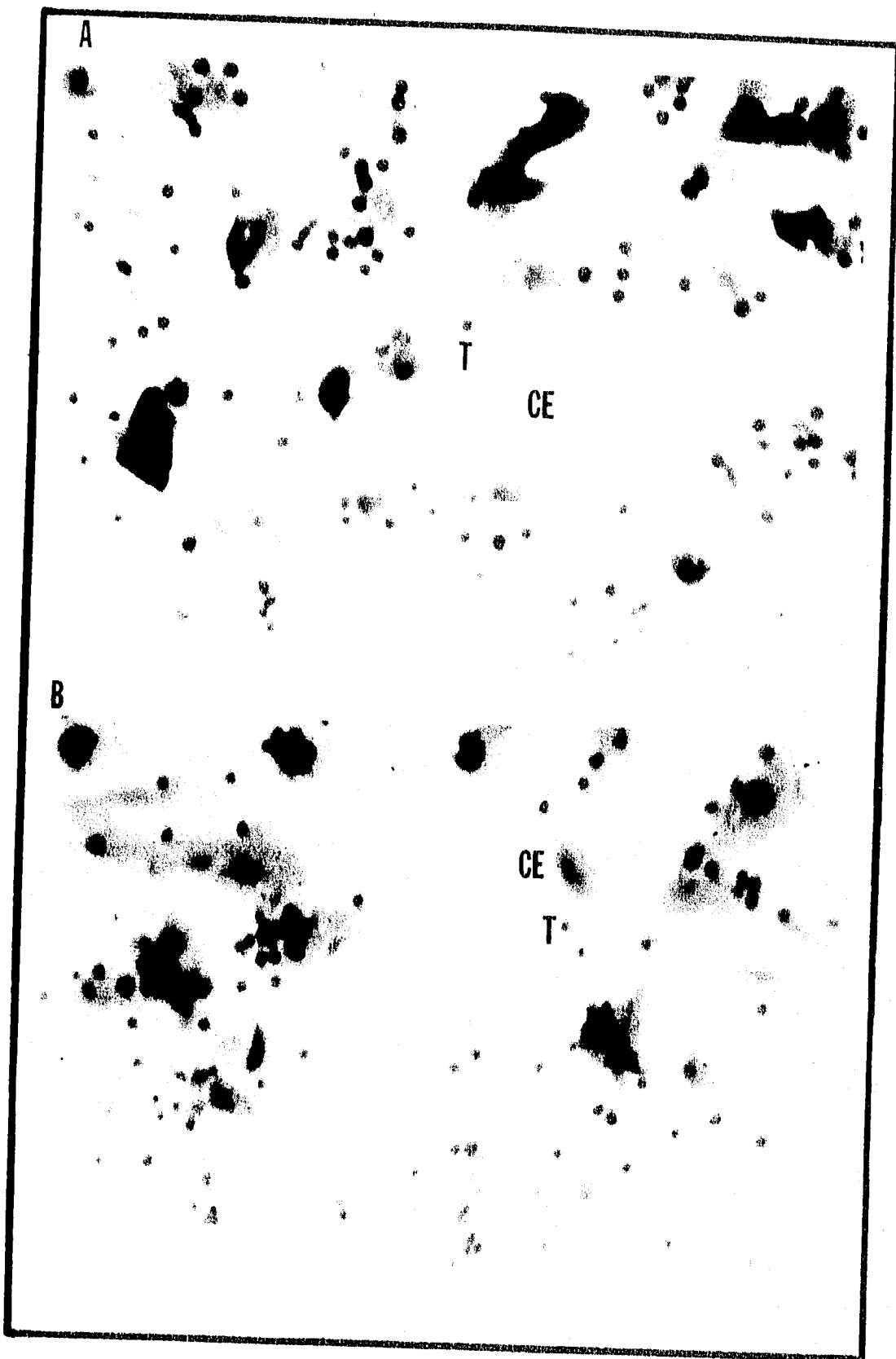


Figura 21. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un paciente con vasculitis (T) (LEG3)
A. anti-p150,95 (ap) B. PHA + anti-p150,95 (pap)
Aumento : 250 X

LEG 3

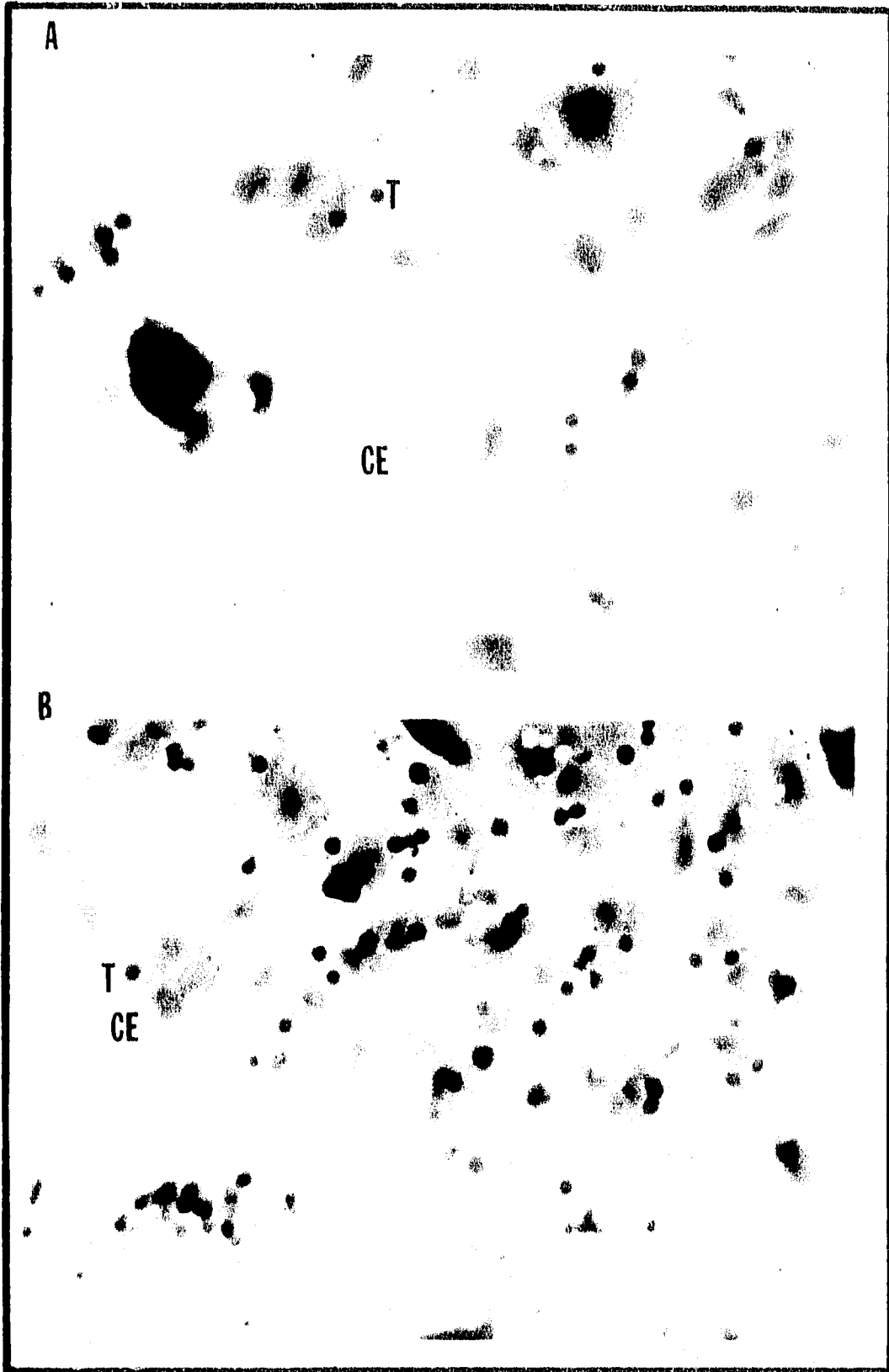
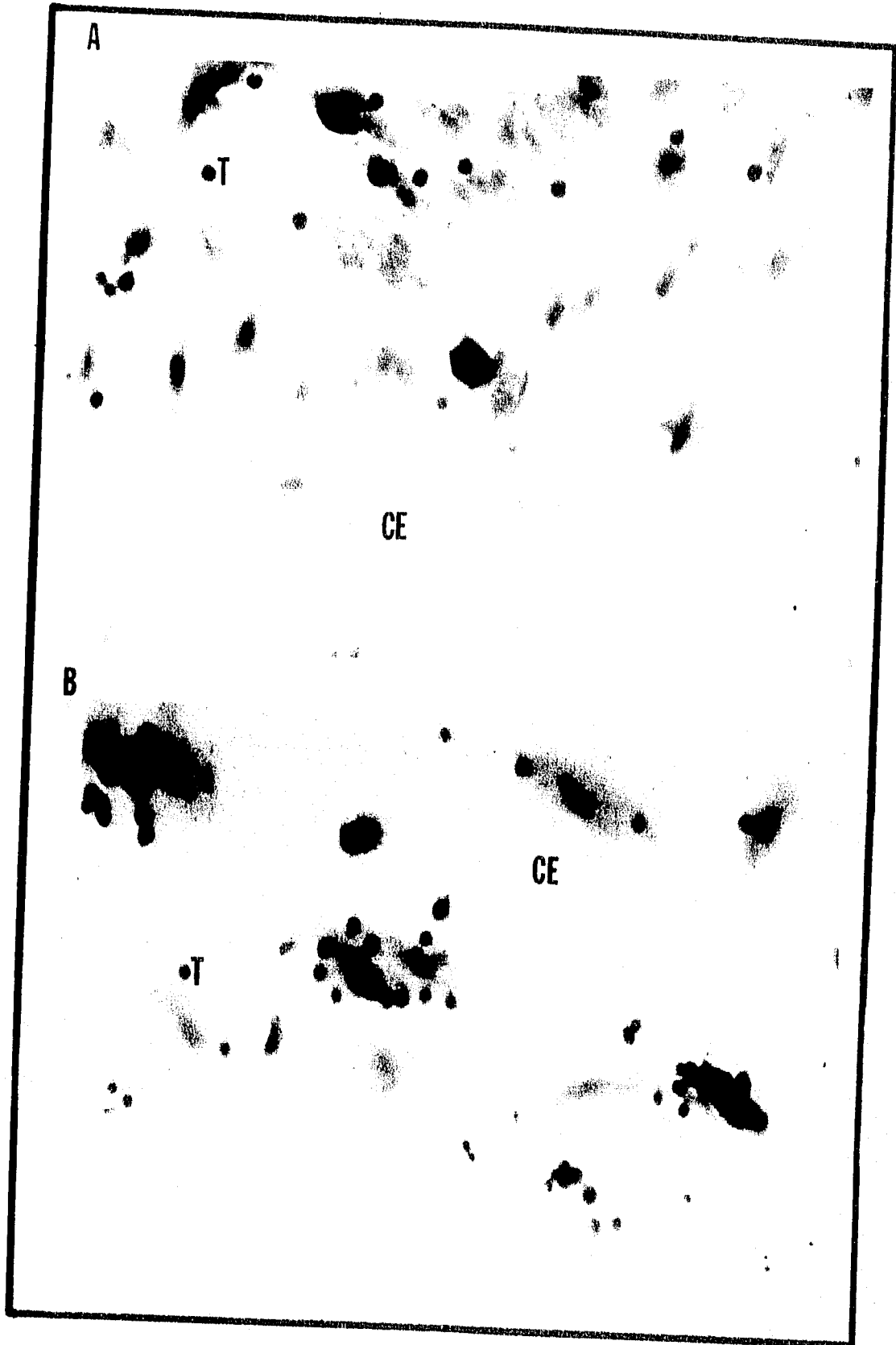


Figura 22. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un paciente con vasculitis (T) (LEG3)
A. anti-ELAM-1 (ae) B. PHA + anti-ELAM-1 (pae)
Aumento : 250 X

LEG 3



ae

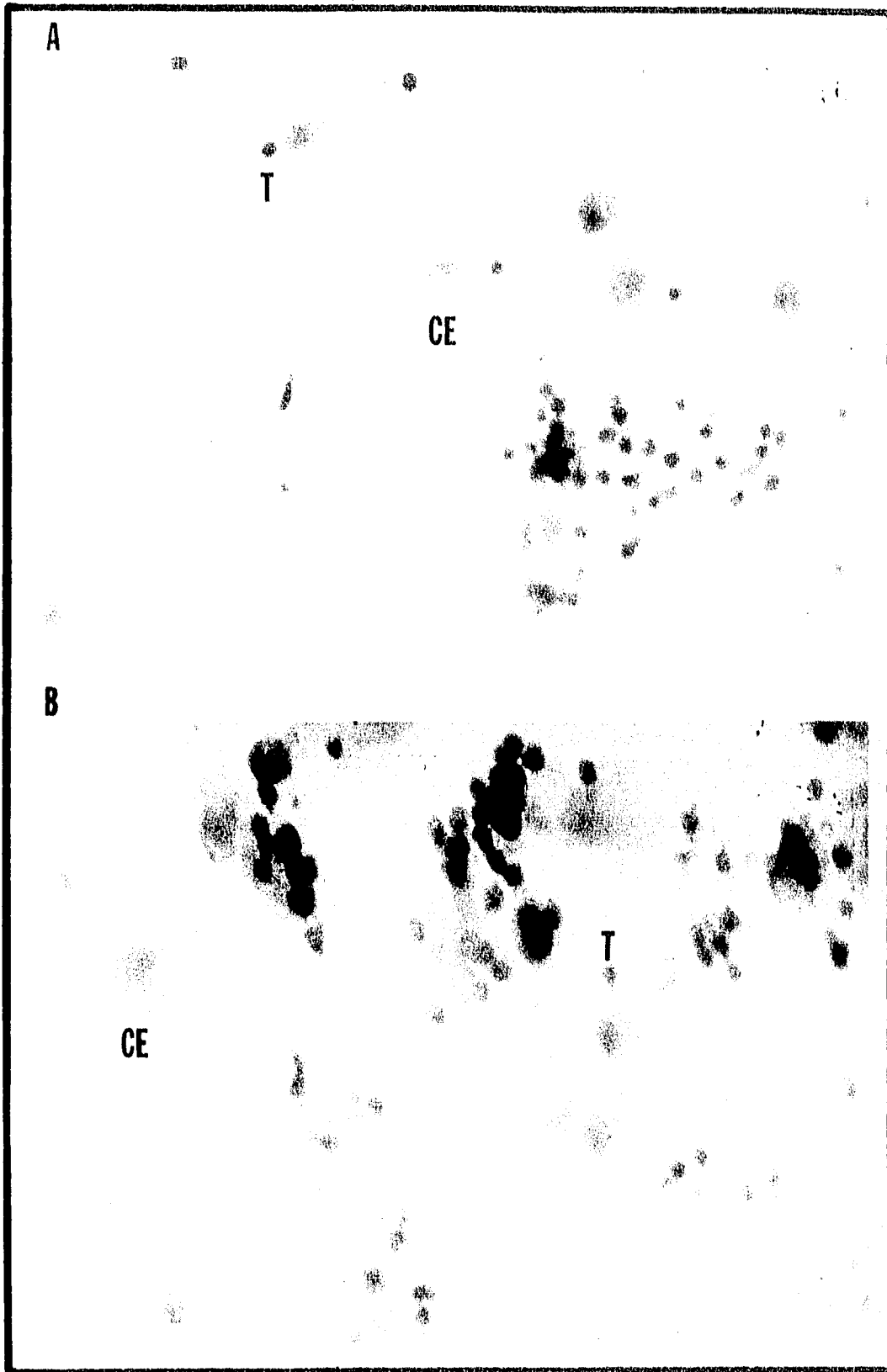
pae

Figura 23. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un paciente con esclerodermia (T)
(EGP2)

A. Estado basal (0) B. Estímulo mitogénico (PHA)

Aumento : 250 X

EGP2



0

pha

Figura 24. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro* con linfocitos T de un paciente con esclerodermia (T) (EGP2).

- A. anti- β 2 microglobulina (ab)
- B. PHA + anti- β 2 microglobulina (pab)

Aumento : 250 X

EGP 2

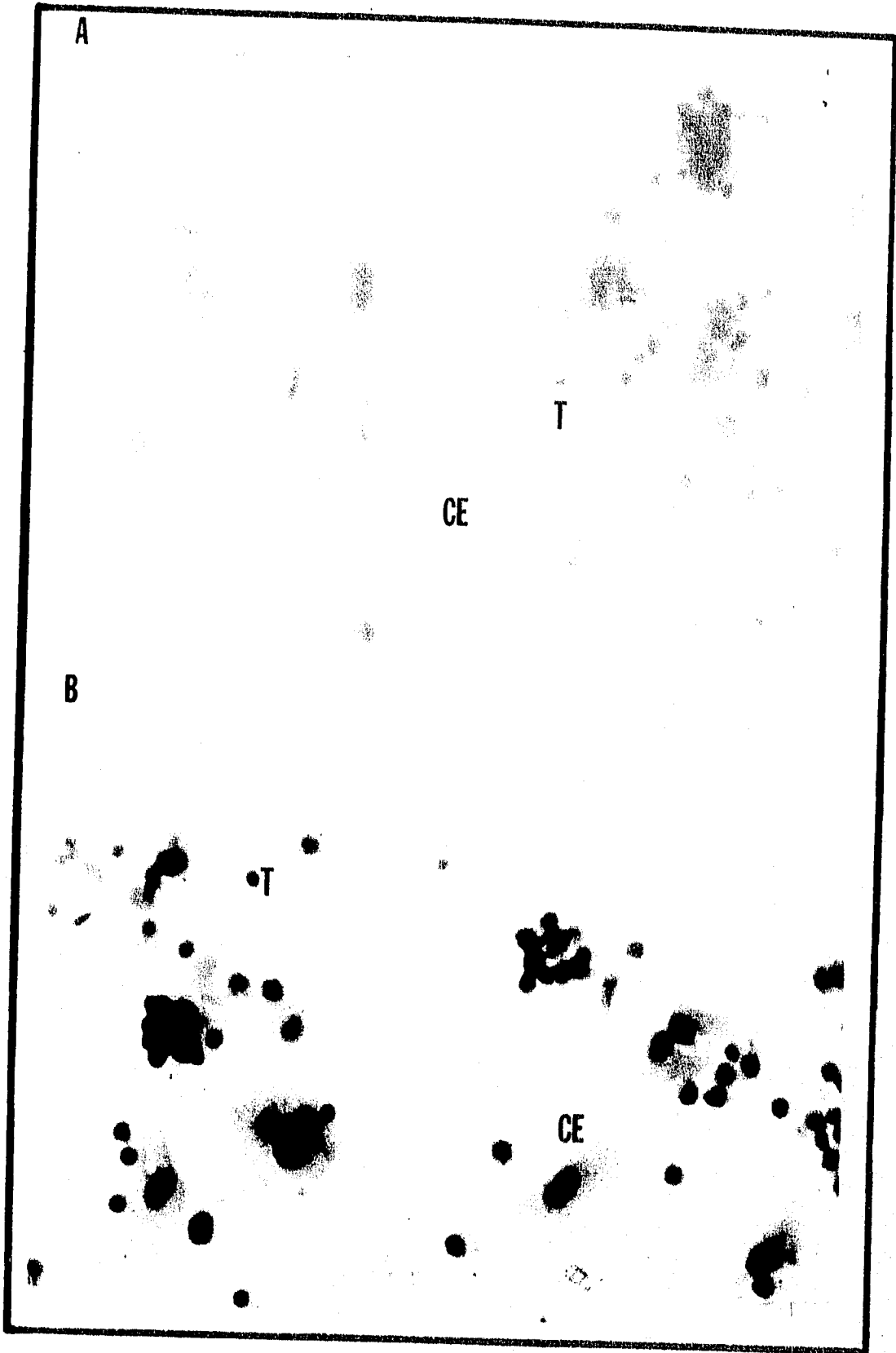


Figura 25. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un paciente con esclerodermia (T)
(EGP2)
A. anti-p150,95 (ap) B. PHA + anti-p150,95 (pap)
Aumento : 250 X

EGP 2

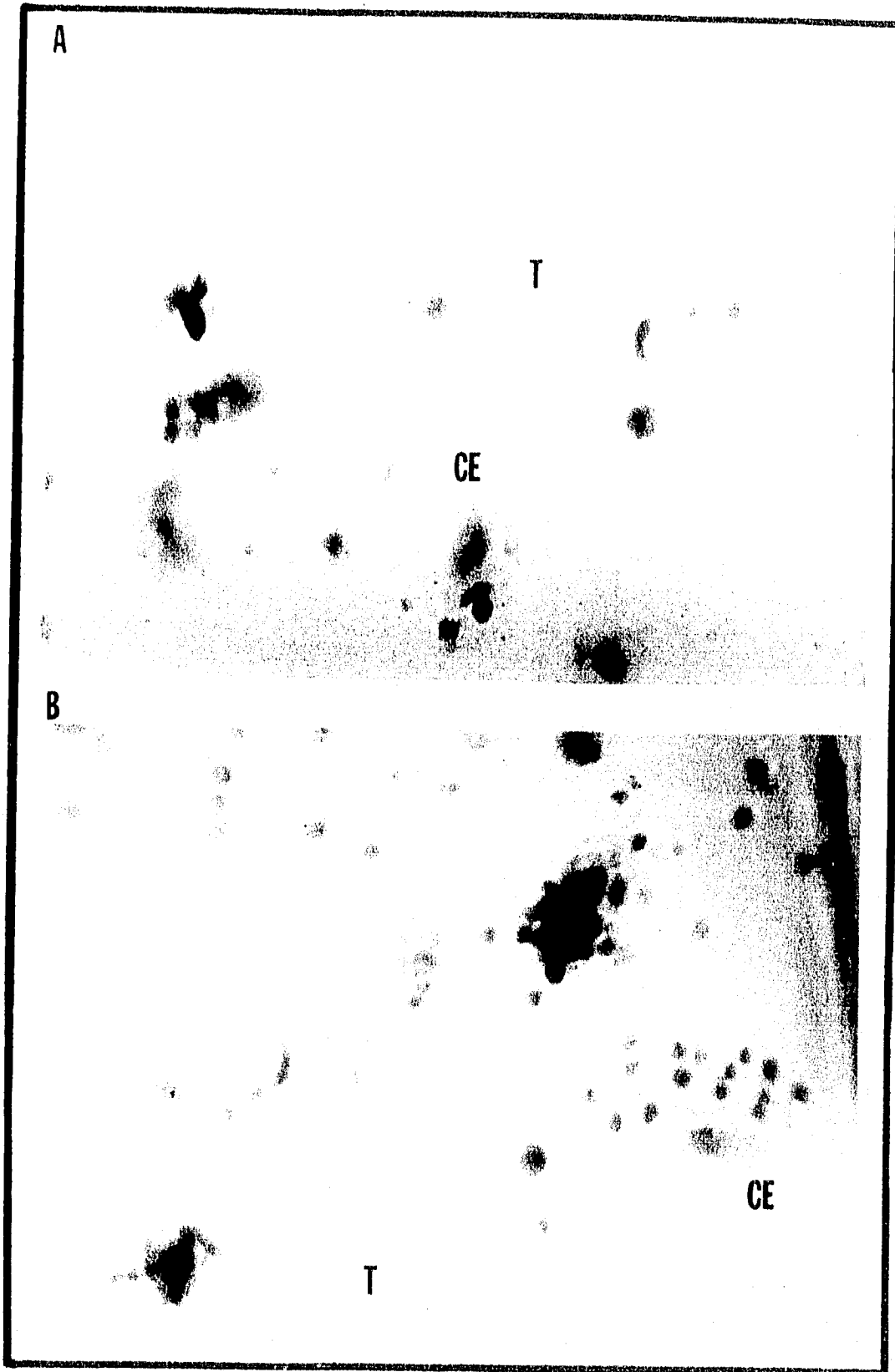


Figura 26. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) cultivadas *in vitro*
con linfocitos T de un paciente con esclerodermia (T)
(EGP2)
A. anti-ELAM-1 (ae) B. PHA + anti-ELAM-1 (pae)
Aumento : 250 X

EGP 2

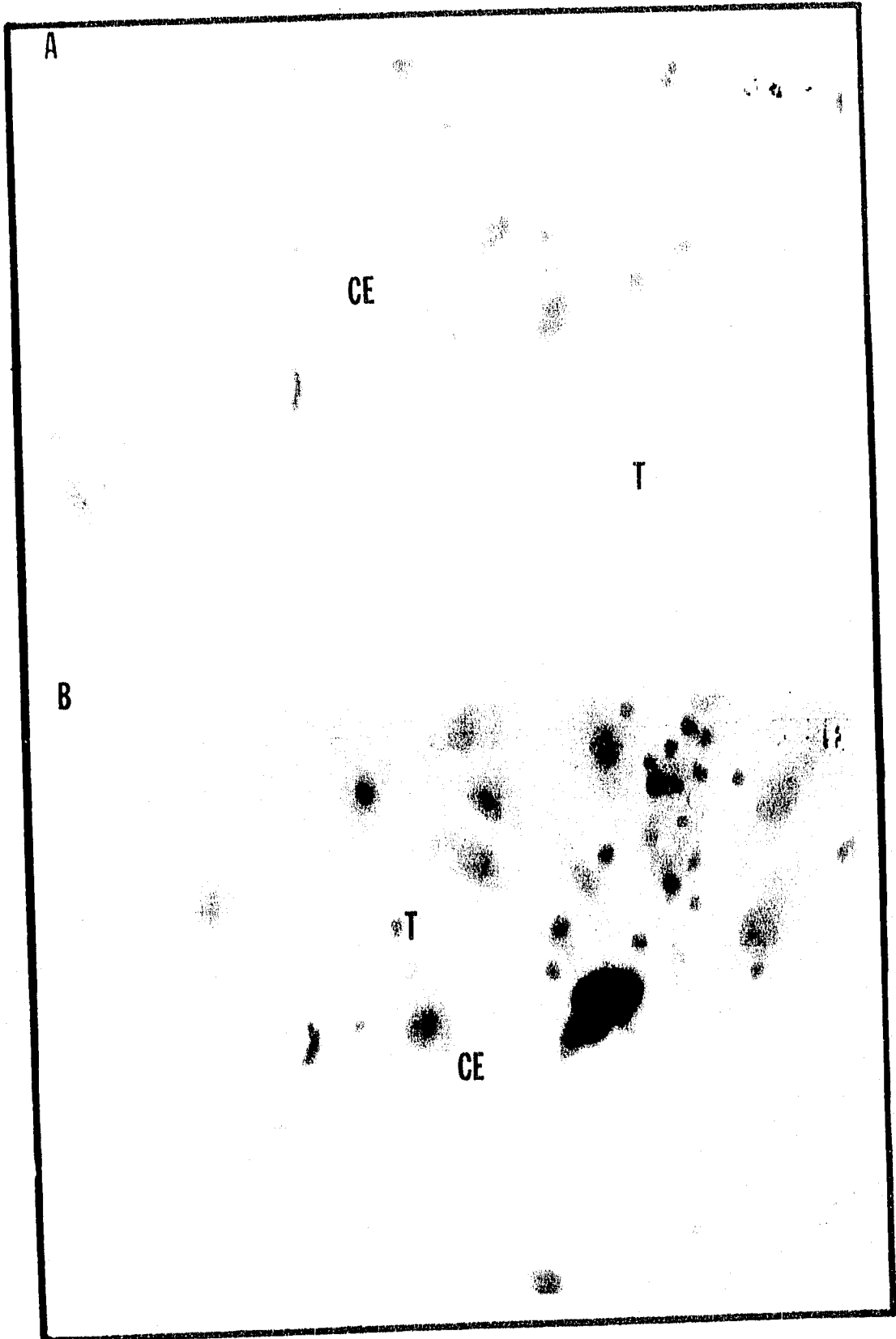


Figura 27. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE) en estado basal (0),
cultivadas *in vitro* con linfocitos (T) de un paciente con esclerodermia (EL-1)
Aumento : 100 X

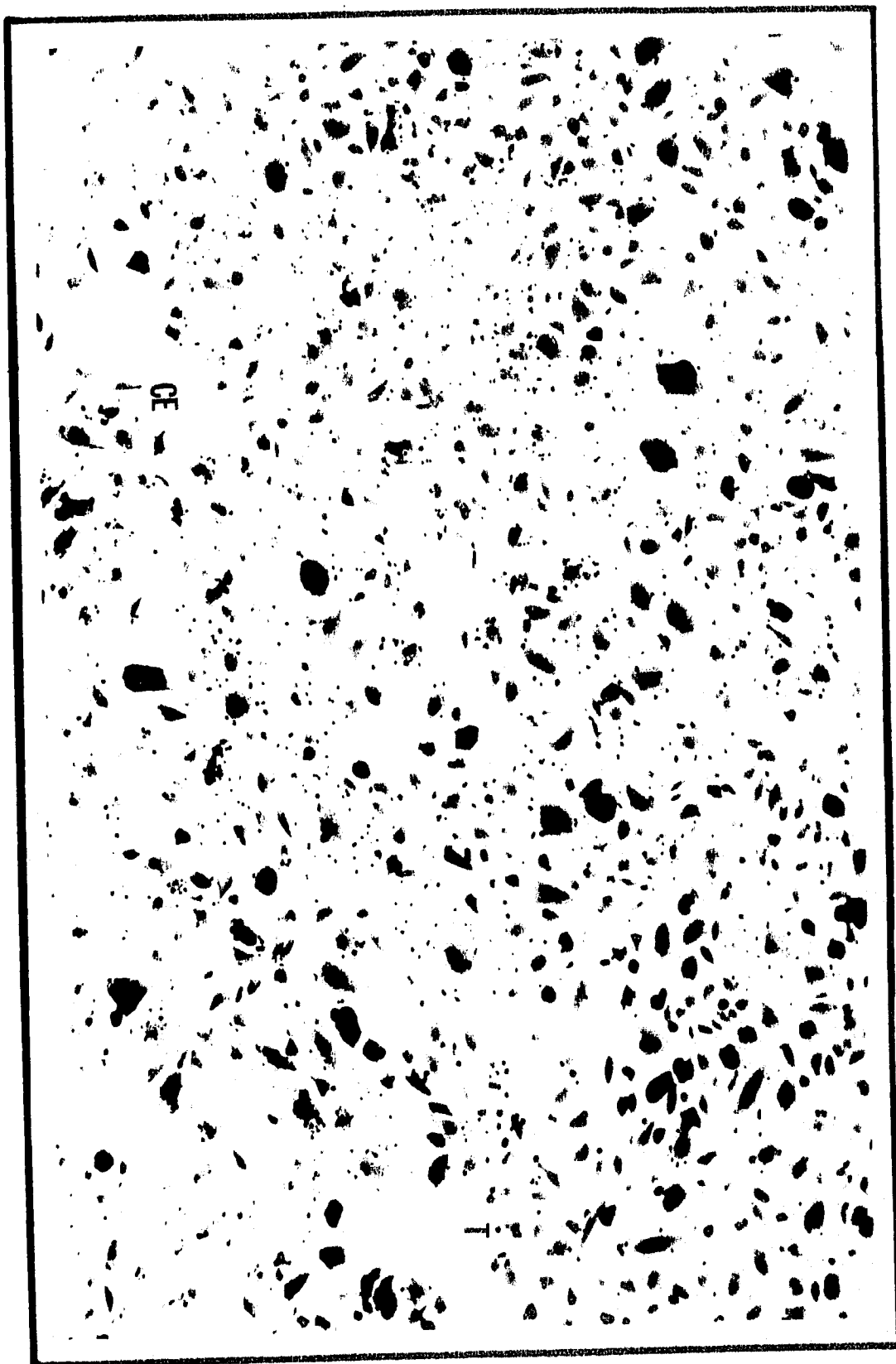


I.
CE

EL-1

Figura 28. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE), cultivadas *in vitro*
con linfocitos (T) de un paciente con esclerodermia (EL-1) bajo estímulo mitogénico (PHA)
Aumento : 100 X

PHA

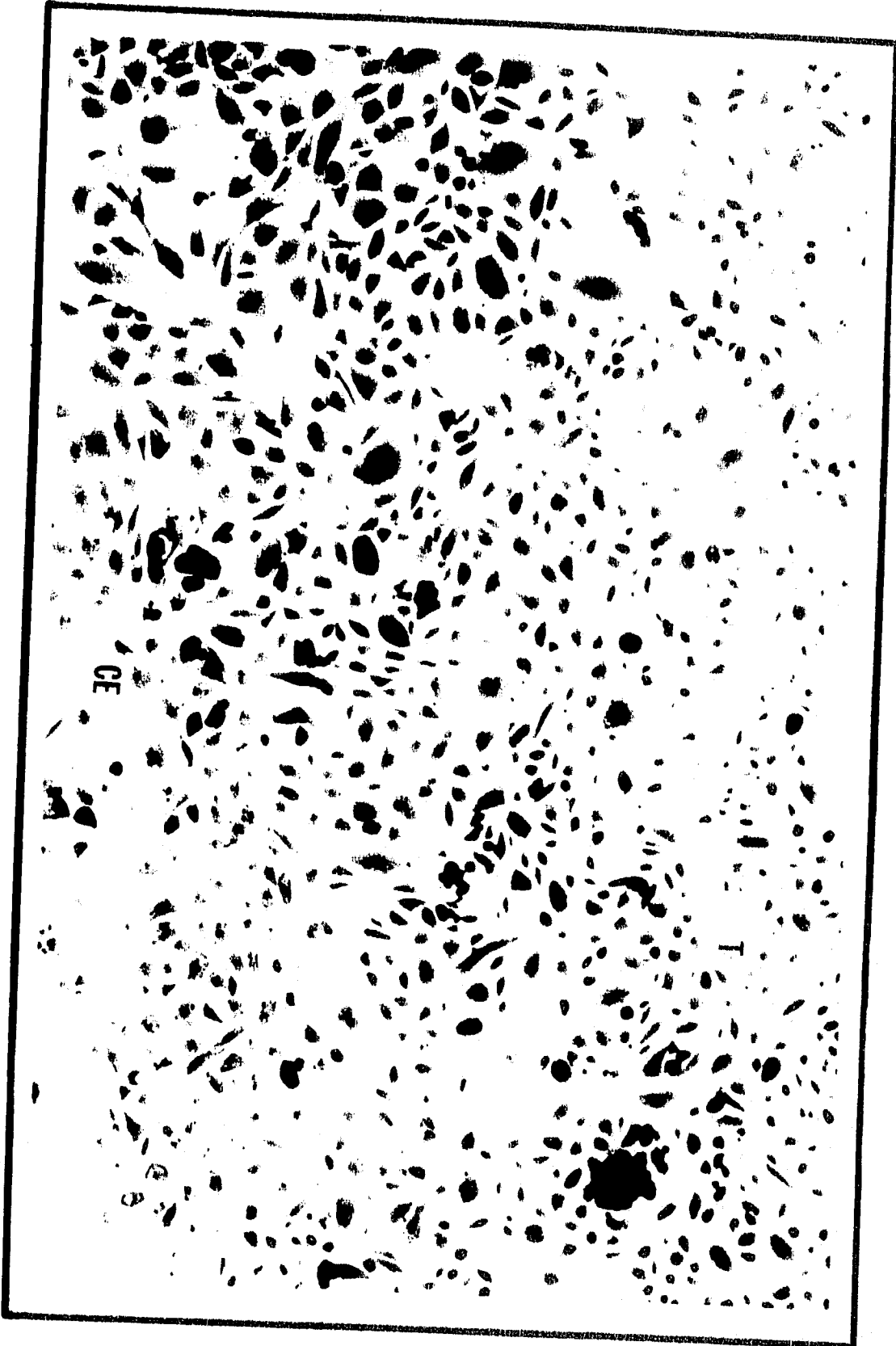


GE

EL-1

Figura 29. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE), cultivadas *in vitro*
con linfocitos (T) de un paciente con esclerodermia (EL-1) en presencia de anti-p150,95 (AP)
Aumento : 100 X

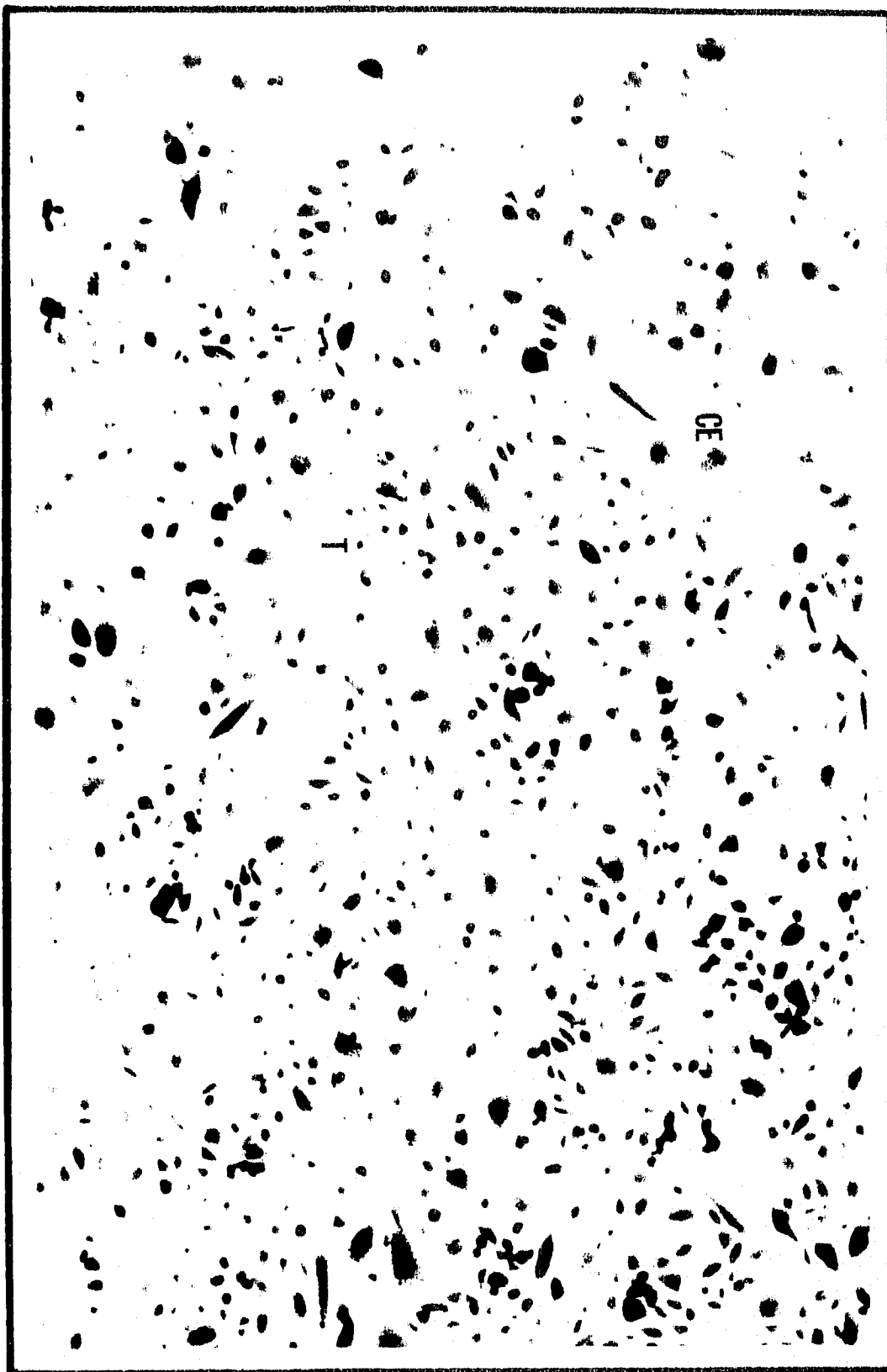
AP



CE

EL-1

Figura 30. Células endoteliales HUVEC confluentes (CE), cultivadas *in vitro* con linfocitos (T) de un paciente con esclerodermia (EL-1) en presencia de anti-ELAM-1 (AE)
Aumento : 100 X



AE

CE

T

una tendencia aparente de mayor adherencia de linfocitos a HUVEC en la población de pacientes con esclerodermia que en la de los pacientes con vasculitis. Sin embargo, en los estudios realizados con linfocitos T, la tendencia fue lo contrario; es decir, se observó mayor adherencia de linfocitos T a HUVEC en los pacientes con vasculitis que en los pacientes con esclerodermia. Sin embargo, estadísticamente, no se encontró diferencia alguna entre estas dos poblaciones.

Con respecto a los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio, el anticuerpo anti-ELAM-1 aparentemente tuvo mayor capacidad inhibitoria sobre la adherencia linfocitaria que anti-p150,95 en los controles y en los pacientes con vasculitis, en los estudios tanto con CMN, como con linfocitos T. Sin embargo en los pacientes con esclerodermia, en ambos estudios, se observó lo contrario; es decir una mayor capacidad inhibitoria sobre la adherencia linfocitaria con anti-p150,95 que con anti-ELAM-1.

Sin embargo estas observaciones no fueron concluyentes, y el comportamiento de los dos anticuerpos relevantes pareció ser relativamente similar.

Estudios de adherencia linfocitaria a HUVEC por citofluorometría de flujo

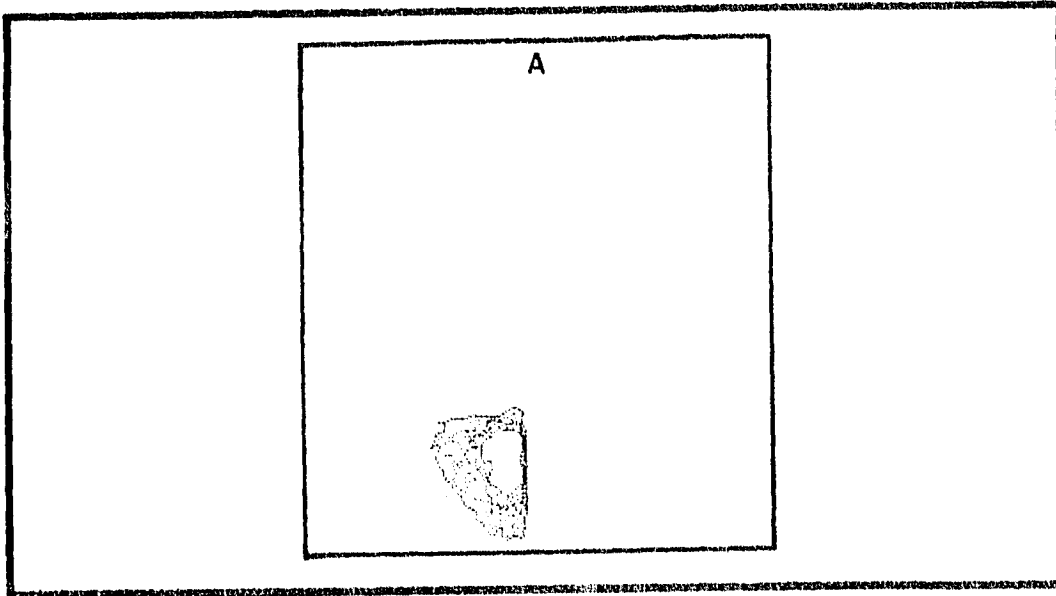
En forma adicional, se realizaron ensayos de adherencia y mediante citofluorometría de flujo sobre la población de linfocitos T, para determinar si dichos estudios pudieran corroborar los resultados de adherencia por microscopía.

Los resultados que se describen a continuación son muestras representativas de un ensayo seleccionado a partir de un total de 8 ensayos realizados.

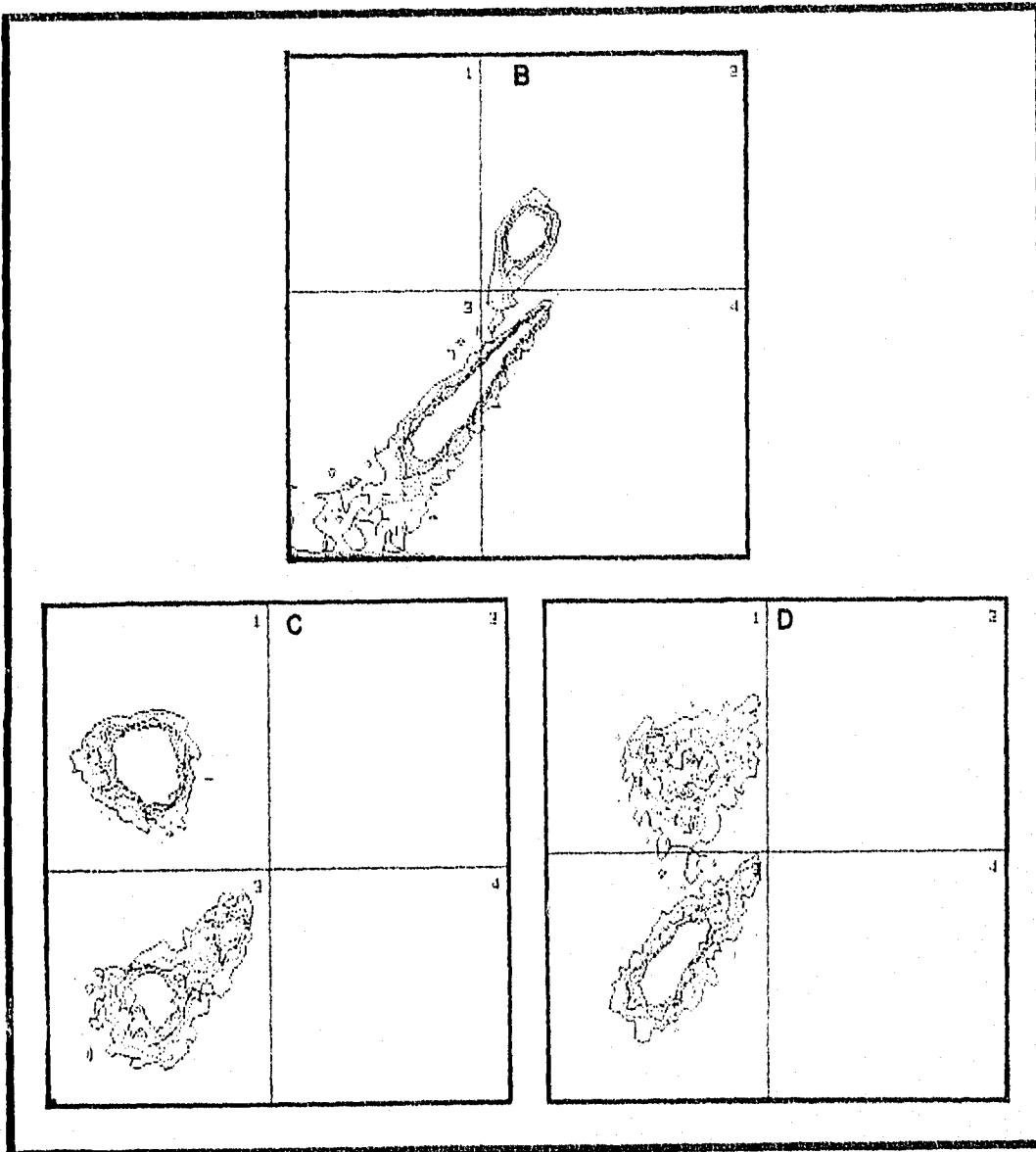
La figura 31 muestra las poblaciones celulares utilizadas como controles en este estudio. Se observaron diferencias en fluorescencia y tamaño (granularidad) de la población de células HUVEC (A) y de los linfocitos T de un individuo sano (Control 19) (B), de un paciente con esclerodermia (EGP2) (C), y de un paciente con vasculitis (LEG2) (D). No se apreciaron diferencias entre las distintas poblaciones de linfocitos T. Cabe mencionar que en los estudios de citofluorometría, no se utilizaron linfocitos T purificados, sino poblaciones de CMN que se aprovecharon una vez terminados los estudios de adherencia por microscopía. El estudio por FACS Scan reveló la población de linfocitos T aislados de las

Figura 31. Citofluorografías de flujo:

- A. Células endoteliales HUVEC teñidas con el marcador Ulex Europeus (FL1)**
- B. En los cuadrantes 3 y 4 se encuentra la población de linfocitos T de un individuo sano (Control 19), teñidos con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (FL2), y separados de la población de células mononucleares restantes (cuadrantes 1 y 2)**
- C. En el cuadrante 3 se encuentra la población de linfocitos T (FL2 = CD3) de un paciente con esclerodermia (EGP2), separados de la población de células mononucleares restantes (cuadrante 1)**
- D. En el cuadrante 3 se encuentra la población de linfocitos T (FL2 = CD3) de un paciente con vasculitis (LEG2), separados de la población de células mononucleares restantes (cuadrante 1)**



FL1 = ULEX



FL2 = CD3

CMN (observados en los cuadrantes 3 y 4) (figura 31). Se consideraron únicamente estos cuadrantes (excluyendo así las CMN), para el cálculo del porcentaje de adherencia. En promedio se obtuvieron poblaciones de linfocitos T aisladas correspondientes aproximadamente a un 60%. El porcentaje de adherencia se calculó estadísticamente por el programa computacional de FACS Scan, considerando el número de células obtenidas dentro de un cuadrante creado (cuadrante 2), caracterizado por los complejos células endoteliales/linfocitos T (figuras 32,33,34,35).

La figura 32 muestra diferencias de adherencia en condiciones basales y en presencia de PHA, entre el control 19, el paciente con esclerodermia EGP2, y el paciente con vasculitis LEG2. La figura 33 muestra los resultados de adherencia obtenidos para los mismos individuos en presencia del anticuerpo anti- β 2microglobulina, con y sin estímulo. La figura 34 muestra los resultados de adherencia obtenidos para los mismos individuos en presencia del anticuerpo anti-p150,95, con y sin estímulo. La figura 35 muestra los resultados de adherencia obtenidos para los mismos individuos en presencia del anticuerpo anti-ELAM-1, con y sin estímulo.

Individualmente (por condición experimental), estos estudios no corroboraron los hallazgos encontrados en los estudios de adherencia por microscopía. Se hallaron altos porcentajes de adherencia no correlacionables con los porcentajes observados por microscopía, y los patrones de estímulo por PHA, no reflejaron mayores porcentajes de adherencia en muchos de los casos. Los anticuerpos relevantes tampoco mostraron patrones de disminución de adherencia en gran parte de los casos. Cabe mencionar incluso, que los porcentajes de adherencia obtenidos por citofluorometría resultaron ser de 3 a 6 veces mayores que aquellos obtenidos por microscopía, observación que se comentará mas tarde.

Sin embargo, en el conjunto (distintas condiciones experimentales), se observó que los porcentajes de adherencia eran mayores en los pacientes con esclerodermia y en los pacientes con vasculitis que en los individuos sanos. No se obtuvieron resultados concluyentes con respecto a las diferencias de adherencia entre la población de pacientes con esclerodermia y la de los pacientes con vasculitis.

Figura 32. Citofluorografías de flujo:

Las figuras A, C, E representan condiciones de cultivo de células endoteliales basales (sin estímulo). Las figuras B, D, F representan condiciones de cultivo de células endoteliales donde los linfocitos T se estimularon mitogénicamente (PHA).

Los linfocitos T fueron teñidos con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (FL2), mientras que las células endoteliales HUVEC con el marcador *Ulex Europeus* (FL1).

El cuadrante 2 representa la población de linfocitos T adheridos a células endoteliales (complejos T-CE), delimitando en los bordes exteriores la población de células T o células endoteliales no adheridas. Otros cúmulos celulares representan debris o células muertas.

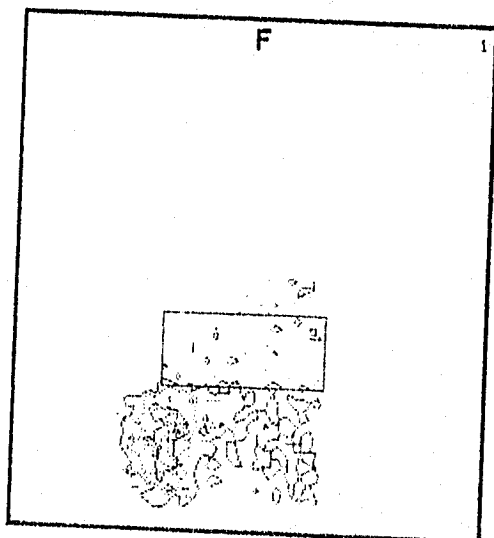
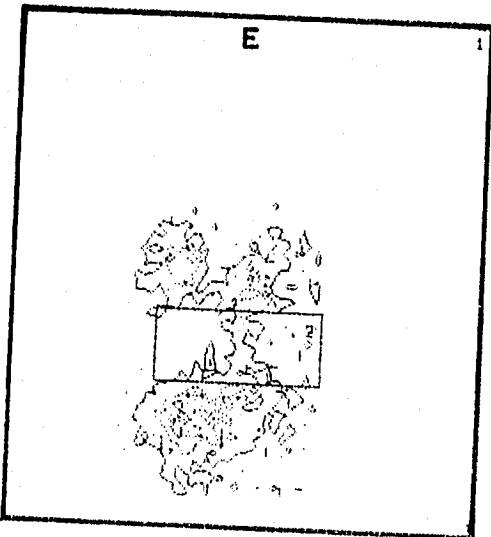
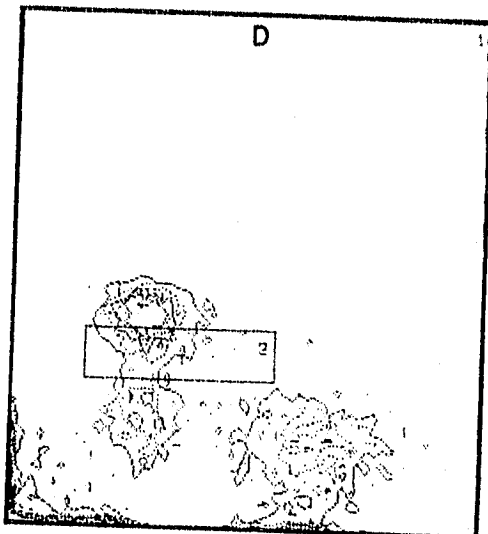
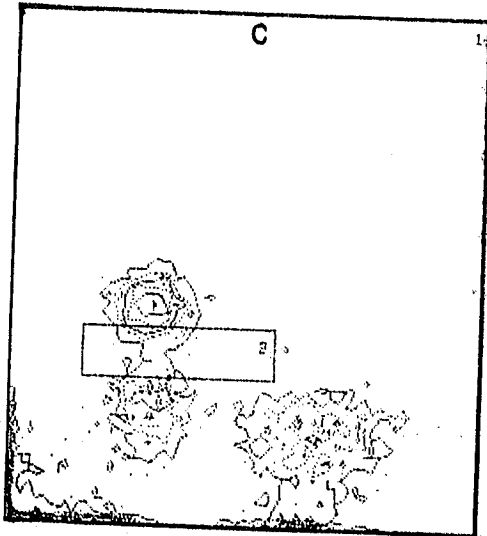
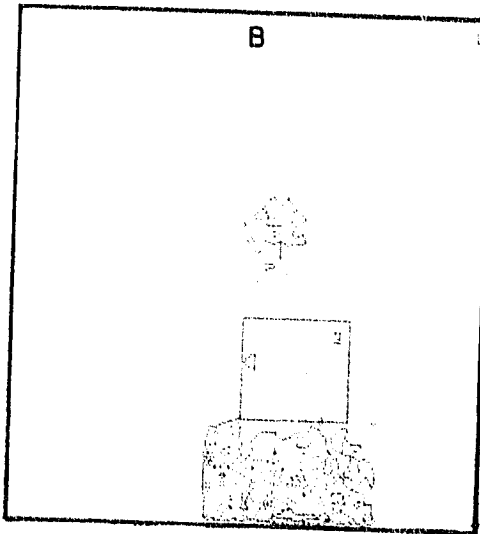
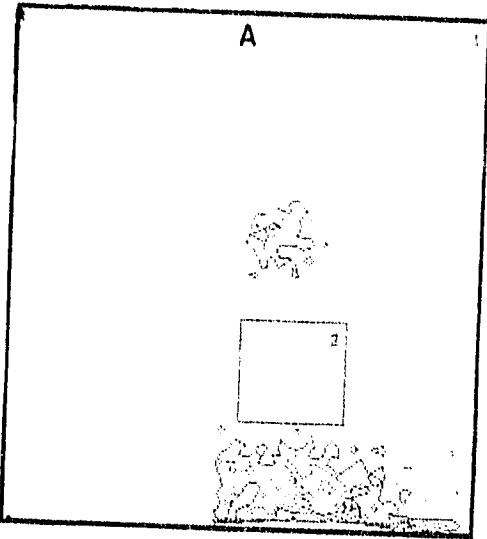
A y B. Linfocitos T de un individuo sano (Control 6)

C y D. Linfocitos T de un paciente con esclerodermia (EGP17)

E y F. Linfocitos T de un paciente con vasculitis (LEG3)

SIN ESTIMULO

PHA



FL2 = CD3

FL1 = ULEX

Figura 33. Citofluorografías de flujo:

Las figuras A, C, E representan condiciones de cultivo de células endoteliales en presencia del anticuerpo monoclonal anti- $\beta 2$ microglobulina. Las figuras B, D, F representan condiciones de cultivo de células endoteliales en presencia del anticuerpo monoclonal anti- $\beta 2$ microglobulina más estímulo mitogénico con PHA.

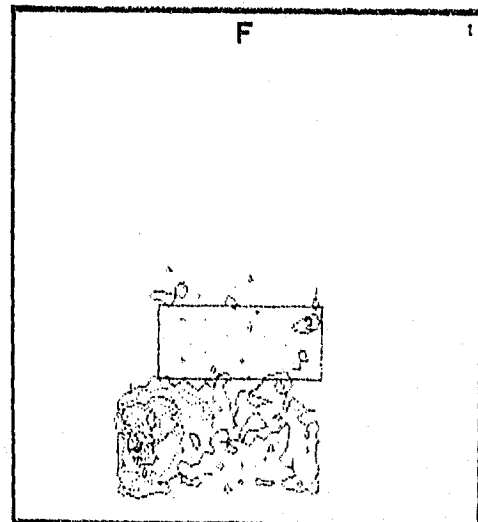
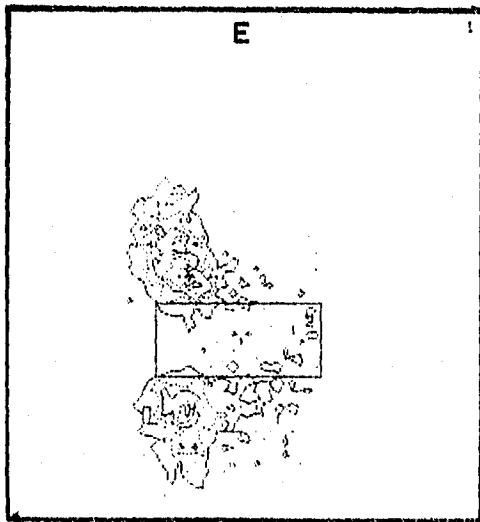
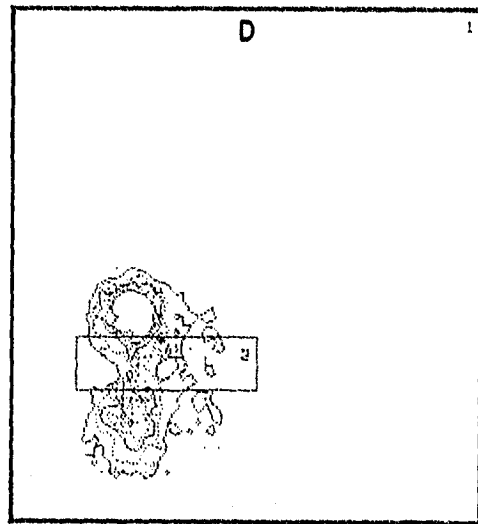
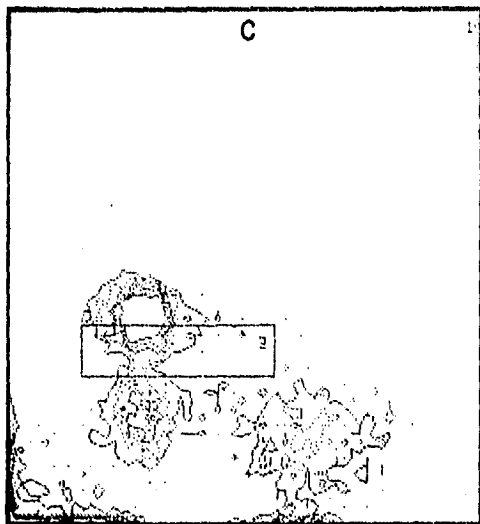
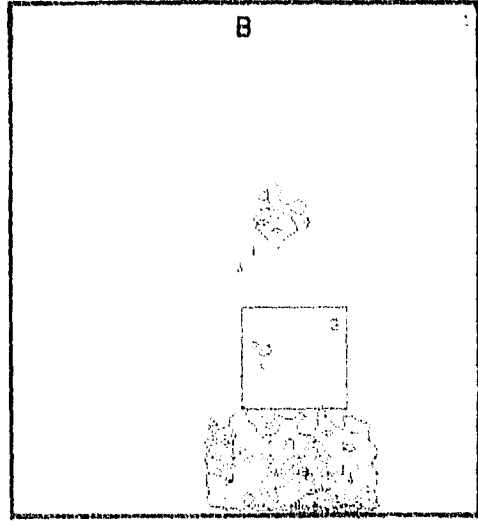
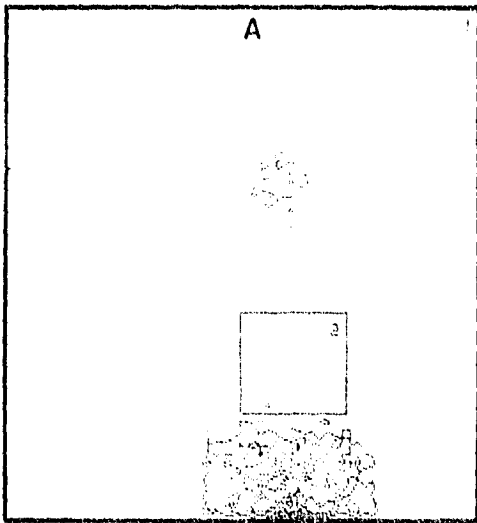
Los linfocitos T fueron teñidos con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (FL2), mientras que las células endoteliales HUVEC con el marcador Ulex Europeus (FL1).

El cuadrante 2 representa la población de linfocitos T adheridos a células endoteliales (complejos T-CE), delimitando en los bordes exteriores la población de células T o células endoteliales no adheridas. Otros cúmulos celulares representan debris o células muertas.

- A y B. Linfocitos T de un individuo sano (Control 6)
- C y D. Linfocitos T de un paciente con esclerodermia (EGP17)
- E y F. Linfocitos T de un paciente con vasculitis (LEG3)

ANTI-BETA 2 microglobulina

PHA+ANTI-BETA2 microglobulina



FL2 = CD3

FL1 = ULEX

Figura 34. Citofluorografías de flujo:

Las figuras A, C, E representan condiciones de cultivo de células endoteliales en presencia del anticuerpo monoclonal anti-p150,95. Las figuras B, D, F representan condiciones de cultivo de células endoteliales en presencia del anticuerpo monoclonal anti-p150,95 más estímulo mitogénico con PHA.

Los linfocitos T fueron teñidos con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (FL2), mientras que las células endoteliales HUVEC con el marcador Ulex Europeus (FL1).

El cuadrante 2 representa la población de linfocitos T adheridos a células endoteliales (complejos T-CE), delimitando en los bordes exteriores la población de células T o células endoteliales no adheridas. Otros cúmulos celulares representan debris o células muertas.

A y B. Linfocitos T de un individuo sano (Control 6)

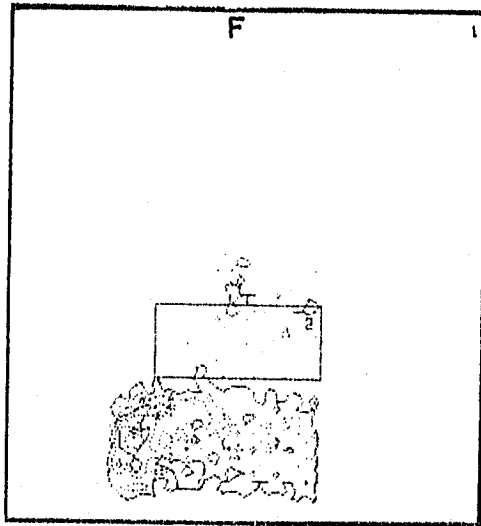
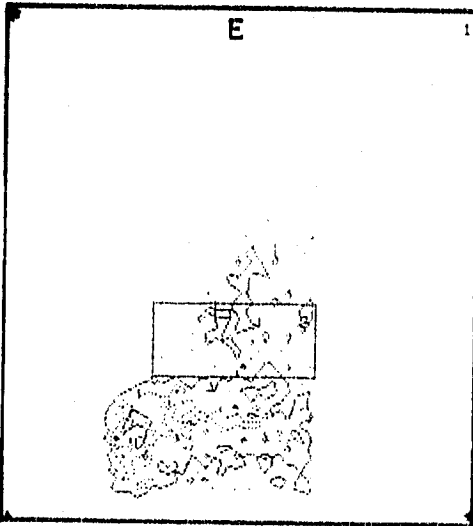
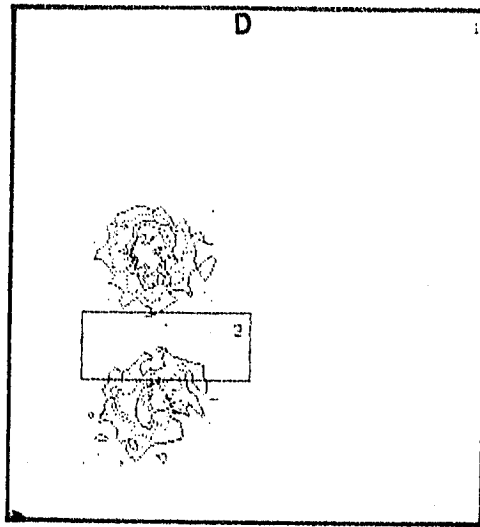
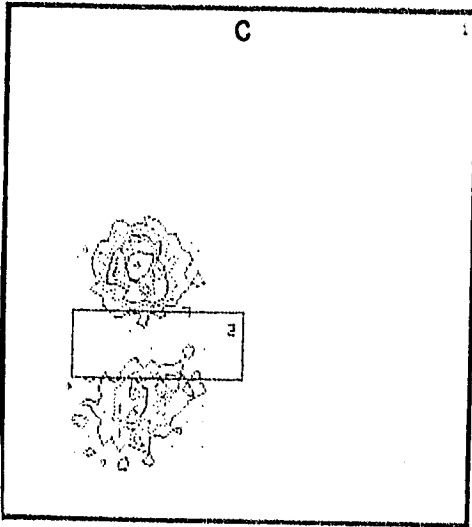
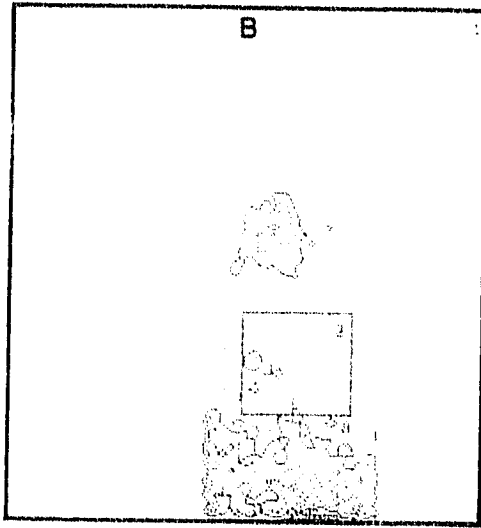
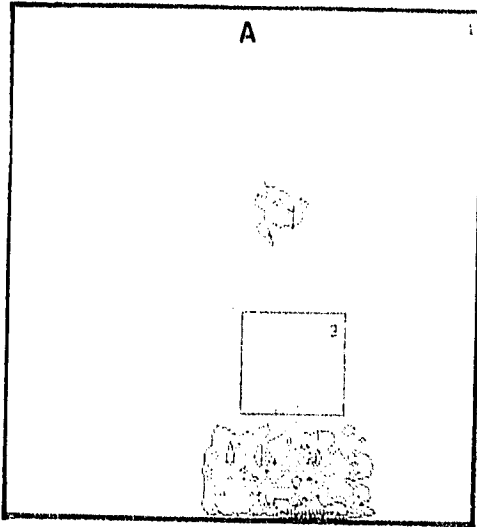
C y D. Linfocitos T de un paciente con esclerodermia (EGP17)

E y F. Linfocitos T de un paciente con vasculitis (LEG3)

ANTI - p 150, 95

PHA + ANTI - p 150, 95

FL2 = CD3



FL1 = ULEX

Figura 35. Citofluorografías de flujo:

Las figuras A, C, E representan condiciones de cultivo de células endoteliales en presencia del anticuerpo monoclonal anti-ELAM-1. Las figuras B, D, F representan condiciones de cultivo de células endoteliales en presencia del anticuerpo monoclonal anti-ELAM-1 más estímulo mitogénico con PHA.

Los linfocitos T fueron teñidos con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (FL2), mientras que las células endoteliales HUVEC con el marcador Ulex Europeus (FL1).

El cuadrante 2 representa la población de linfocitos T adheridos a células endoteliales (complejos T-CE), delimitando en los bordes exteriores la población de células T o células endoteliales no adheridas. Otros cúmulos celulares representan debris o células muertas.

A y B. Linfocitos T de un individuo sano (Control 6)

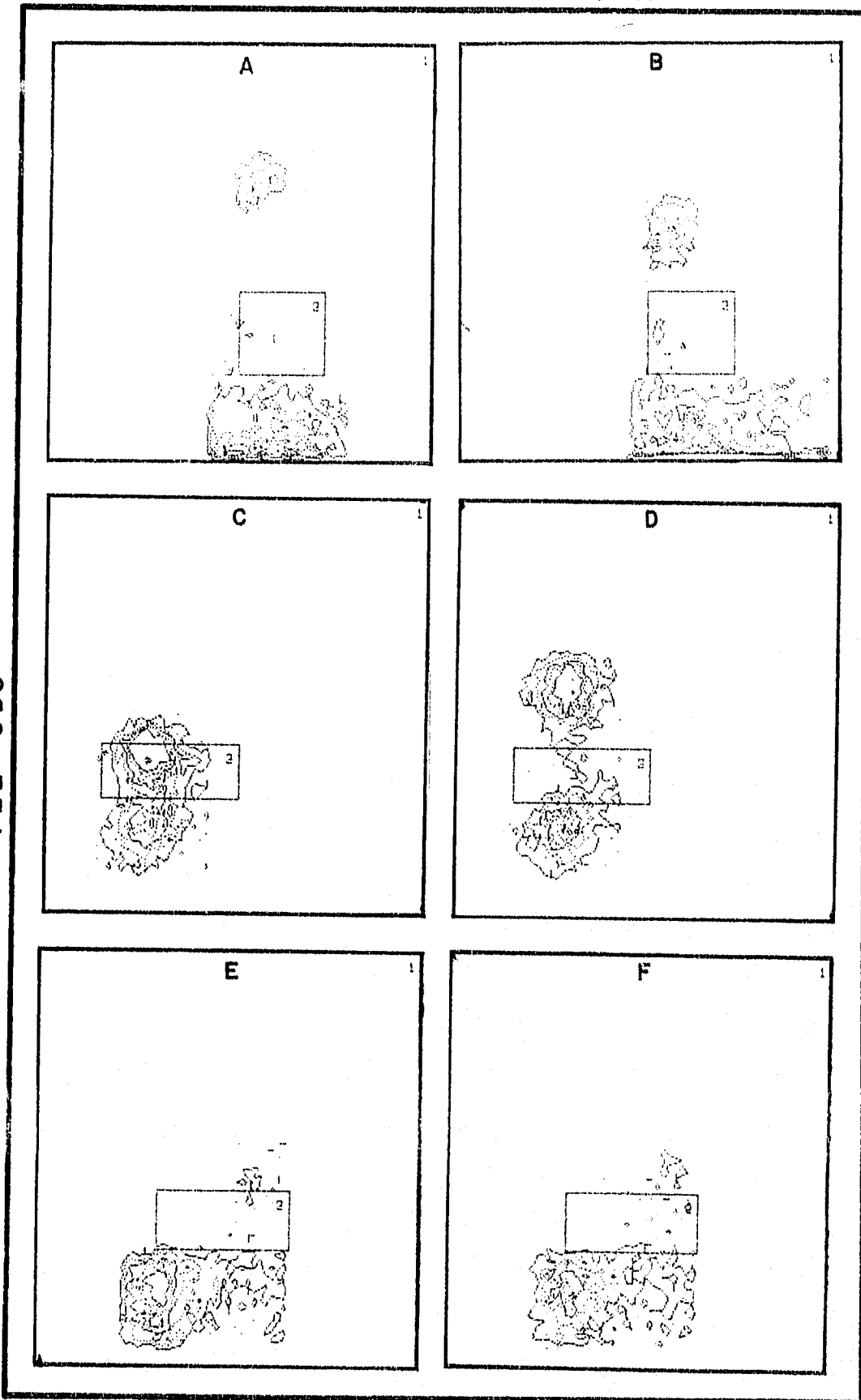
C y D. Linfocitos T de un paciente con esclerodermia (EGP17)

E y F. Linfocitos T de un paciente con vasculitis (LEG3)

ANTI-ELAM-1

PHA + ANTI-ELAM-1

FL2 = CD3



FL1 = ULEX

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha podido demostrar - por medio de estudios de adherencia *in vitro* y análisis microscópico - que las células mononucleares de sangre periférica (depletadas de macrófagos) y los linfocitos T de individuos sanos, de pacientes con esclerodermia generalizada, así como de pacientes con diversas vasculitis, exhiben una mayor adherencia a las células endoteliales de vena umbilical HUVEC bajo estímulo con PHA que en estado basal. En los dos estudios realizados se obtuvieron incrementos con respecto a la adherencia basal de 3 a 4 veces en los controles, de 4 a 6 veces en los pacientes con esclerodermia, y de 2 a 8 veces en los pacientes con vasculitis. Se observó que las CMN presentaban mayor adherencia a endotelio que los linfocitos T bajo estímulo. Dado que PHA es un mitógeno de linfocitos T, parece claro que el incremento de la adherencia a endotelio por parte de las CMN depletadas de macrófagos bajo estímulo se debe a la activación de linfocitos T primordialmente. Pero, ¿quizás exista un efecto cooperativo de adherencia en la población de CMN una vez que los linfocitos T se encuentran estimulados?

También se ha podido demostrar que la respuesta de adherencia a células HUVEC por parte de las CMN y de los linfocitos T es significativamente mayor en los pacientes con esclerodermia y vasculitis que en individuos sanos.

Por otra parte, no fue posible encontrar diferencias significativas entre las respuestas de adherencia a endotelio entre los pacientes con esclerodermia y los pacientes con vasculitis.

En los estudios preliminares con CMN parecía claro que la adherencia linfocitaria era mayor en pacientes con esclerodermia que en pacientes con vasculitis (190). Sin embargo, en estudios de linfocitos T, además de que no hubo diferencias significativas entre el grupo de vasculitis y el grupo de esclerodermia, la adherencia parecía ser mayor en el grupo de vasculitis.

Ahora bien, para explicar este fenómeno se pueden considerar varias posibilidades; i) que realmente no existen diferencias en los patrones de adherencia entre esclerodermia y vasculitis, por lo menos en las dos vías examinadas (ELAM-1 y p150,95); ii) que las posibles diferencias que pudieran

existir entre estos dos tipos de padecimientos no pueden ser apropiadamente valoradas dada la diversidad de las vasculitis consideradas en este estudio; iii) que posiblemente existan diferencias en los patrones de adherencia entre los dos grupos de pacientes considerados, pero que estas no pueden ser propiamente valoradas dado que en un estudio se utilizaron células mononucleares y en el otro linfocitos T purificados. Esto implicaría que quizás las diferencias observadas en los dos estudios sean el reflejo de la participación en los procesos de adherencia de otros tipos celulares como linfocitos B, células NK, etc; iv) que el número de pacientes considerados en estos ensayos, sobre todo en el estudio de CMN, no fueron suficientes para evaluar diferencias significativas entre los patrones de adherencia de los dos grupos de pacientes. En cambio, es de extrema importancia el hecho de que las diferencias entre los patrones de adherencia de los pacientes y los controles fueron lo suficientemente dramáticas para atribuirles un valor significativo, aun con el bajo número de individuos incluidos en el estudio; v) que las vías de adherencia consideradas no reflejan patrones distintos en vasculitis y en esclerodermia, que sí pudiesen hallarse explorando otras vías de adherencia.

Si existen diferencias en los patrones de adherencia entre vasculitis y esclerodermia por medio de las vías de ELAM-1 y p150,95, no se debe excluir la participación de otras vías de adherencia. Es menester tomar en cuenta que existen otras vías de adherencia que deben ser consideradas, y que sin antes realizar estudios que exploren estas vías, es imposible entender del todo los procesos de adherencia e inflamación que se llevan a cabo en estos padecimientos, así como en condiciones normales. Probablemente entre las vías de adherencia más importantes aún por continuar a estudiarse - y sobre todo por entender su participación en esclerodermia y vasculitis - están ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/VLA-4, fuertemente involucradas en los procesos de transmigración y rodamiento, y que como se ha indicado, se encuentran en concentraciones muy elevadas en la mayoría de los padecimientos reumáticos.

Para explorar la posibilidad de que sí pudiesen existir diferencias en la adherencia linfocitaria a endotelio entre esclerodermia y vasculitis, es necesario discutir el comportamiento de los anticuerpos utilizados en este estudio en función del padecimiento autoinmune en cuestión.

existir entre estos dos tipos de padecimientos no pueden ser apropiadamente valoradas dada la diversidad de las vasculitis consideradas en este estudio; iii) que posiblemente existan diferencias en los patrones de adherencia entre los dos grupos de pacientes considerados, pero que estas no pueden ser propiamente valoradas dado que en un estudio se utilizaron células mononucleares y en el otro linfocitos T purificados. Esto implicaría que quizás las diferencias observadas en los dos estudios sean el reflejo de la participación en los procesos de adherencia de otros tipos celulares como linfocitos B, células NK, etc; iv) que el número de pacientes considerados en estos ensayos, sobre todo en el estudio de CMN, no fueron suficientes para evaluar diferencias significativas entre los patrones de adherencia de los dos grupos de pacientes. En cambio, es de extrema importancia el hecho de que las diferencias entre los patrones de adherencia de los pacientes y los controles fueron lo suficientemente dramáticas para atribuirles un valor significativo, aun con el bajo número de individuos incluidos en el estudio; v) que las vías de adherencia consideradas no reflejan patrones distintos en vasculitis y en esclerodermia, que sí pudiesen hallarse explorando otras vías de adherencia.

Si existen diferencias en los patrones de adherencia entre vasculitis y esclerodermia por medio de las vías de ELAM-1 y p150,95, no se debe excluir la participación de otras vías de adherencia. Es menester tomar en cuenta que existen otras vías de adherencia que deben ser consideradas, y que sin antes realizar estudios que exploren estas vías, es imposible entender del todo los procesos de adherencia e inflamación que se llevan a cabo en estos padecimientos, así como en condiciones normales. Probablemente entre las vías de adherencia más importantes aún por continuar a estudiarse - y sobre todo por entender su participación en esclerodermia y vasculitis - están ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/VLA-4, fuertemente involucradas en los procesos de trans migración y rodamiento, y que como se ha indicado, se encuentran en concentraciones muy elevadas en la mayoría de los padecimientos reumáticos.

Para explorar la posibilidad de que sí pudiesen existir diferencias en la adherencia linfocitaria a endotelio entre esclerodermia y vasculitis, es necesario discutir el comportamiento de los anticuerpos utilizados en este estudio en función del padecimiento autoinmune en cuestión.

Con el anticuerpo anti-p150,95, en los estudios con CMN, se observaron inhibiciones con respecto a la adherencia basal de 2.8 veces (controles), de 3.0 veces (esclerodermia), y ninguna inhibición en vasculitis. En los estudios con linfocitos T se observaron inhibiciones con respecto a la adherencia basal de 3.1 veces (controles), de 3.4 veces (esclerodermia), de 2.9 veces (vasculitis).

Con el anticuerpo anti-ELAM-1, en los estudios con CMN, se observaron inhibiciones con respecto a la adherencia basal de 4.6 veces (controles), de 1.8 veces (esclerodermia), y de 1.4 veces (vasculitis). En los estudios con linfocitos T se observaron inhibiciones con respecto a la adherencia basal de 5.1 veces (controles), de 2.2 veces (esclerodermia), de 3.1 veces (vasculitis). Los resultados son muy similares en condiciones de estímulo con PHA (para dichos anticuerpos).

Estos análisis comparativos demuestran que tanto las CMN como los linfocitos T de los individuos sanos responden más ante una inhibición por medio de anti-ELAM-1 que por medio de anti-p150,95, aunque ambos anticuerpos inhiben fuertemente. Parece ser que los linfocitos T responden más que la población de CMN totales ante estos anticuerpos, pero esto es tan solo una especulación. Por otra parte, tanto las CMN como los linfocitos T de los individuos con esclerodermia parecen responder más ante una inhibición por medio de anti-p150,95 que por medio de anti-ELAM-1. Sin embargo, estas respuestas inhibitorias no son tan fuertes como aquellas de los individuos sanos. Parece también haber mayor respuesta inhibitoria por parte de los linfocitos T que de las CMN. Por último, en las vasculitis, tanto las CMN como los linfocitos T parecen tener una mayor respuesta inhibitoria por parte del anticuerpo anti-ELAM-1 que por parte de anti-p150,95, aunque esta respuesta sea muy baja (la más baja de los tres grupos). Nuevamente, la respuesta de linfocitos parece ser mayor que aquella de las CMN.

Con respecto a la mayor respuesta inhibitoria observada en linfocitos T a diferencia de CMN se podría considerar que los linfocitos T responden con mayor especificidad o afección a estas moléculas de adhesión que las demás poblaciones leucocitarias.

Esto sería factible si se tomara en cuenta que al haber menos leucocitos expresando el antígeno Lewis X, hubiera menos competencia por su ligando en endotelio (ELAM-1). En el caso de p150,95 también se podría considerar lo mismo si fuera cierto que los linfocitos T expresan p150,95 dado que el endotelio

produce fibrinógeno (se sabe que ciertos granulocitos y células NK expresan p150,95, y aun no es claro si los linfocitos T lo expresan o no). Quizás los hallazgos de este estudio sirvan para apoyar la idea de que muy posiblemente los linfocitos T también expresan p150,95.

Por otra parte, existe la pregunta de por qué los controles parecen responder más ante las señales inhibitorias por estas vías que los pacientes. Este trabajo, dado el número de individuos estudiados, no apoya de forma absoluta dicha observación. Sin embargo, asumiendo que la observación es correcta, es fácil suponer que los pacientes con enfermedades autoinmunes - exhibiendo una respuesta inflamatoria crónica, una constante autoreactividad celular, y una respuesta de adherencia a endotelio incrementada - sean menos capaces de inhibir sus vías de adherencia sobre-activadas, que digamos, un individuo sano.

Tal parece que los pacientes con esclerodermia responden un poco más ante señales inhibitorias por medio de estas vías que los pacientes con vasculitis. Dado que el daño vascular de la esclerodermia es fibrosante, mientras que el de las vasculitis es inflamatorio, ¿podríamos especular entonces que ciertas manifestaciones de cada enfermedad dependen de la facilidad con la que el individuo es capaz de inhibir o estimular su adherencia linfocitaria a endotelio? Si ese fuese el caso, lo anterior indicaría que los pacientes con vasculitis presentan un daño más grave que los pacientes con esclerodermia. Esta observación sin embargo, es muy difícil de sostener, dado que no se obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes y dado que el grupo de pacientes con vasculitis comprendía individuos con diferentes grados de compromiso patológico.

Otro dato que parece intrigante en este trabajo, es el comportamiento que tuvieron los anticuerpos anti- $\beta 2$ glicoproteína y anti- $\beta 2$ microglobulina, incrementando en general la adherencia linfocitaria, aunque de forma inconsistente y no significativa.

Quizá el haber obtenido mayor adherencia haya sido a causa de la existencia de algún tipo de activación endotelial por medio de la presencia del anticuerpo, demostrando cierta afinidad conformacional por el sitio de unión correspondiente sobre el endotelio. Contrariamente, el haber obtenido menor adherencia con estos anticuerpos se haya debido tal vez a la interferencia estérica de estos anticuerpos, bloqueando

los sitios de unión de las moléculas de adhesión. O simplemente, (y más tangiblemente), estas variaciones en la actividad de los anticuerpos supuestamente irrelevantes se deban a que quizás los anticuerpos - especialmente la anti- $\beta 2$ glicoproteína sean más específicos al endotelio de lo que uno pensaba. Esto es inverosímil en el caso de la anti- $\beta 2$ microglobulina, pues los efectos de este anticuerpo sobre la adherencia fueron prácticamente nulos.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en acuerdo con hallazgos de otros grupos como el de Benschop (14) en donde por medio de estudios citofluorométricos, obtuvieron porcentajes de adherencia a HUVEC similares a los presentados en este trabajo por medio de microscopía (aunque estimularon con IFN- γ), y encontraron también que la adherencia linfocitaria era mayor en células mononucleares totales que en linfocitos. El grupo de Takeuchi y colaboradores (210) también determinó que en pacientes con lupus y vasculitis con lupus, existe una mayor adherencia de linfocitos T a células HUVEC. Esta adherencia es mayor en pacientes con vasculitis y lupus que en pacientes con lupus únicamente (210). Haskard y colaboradores (87) también han demostrado que la adherencia de linfocitos T es mayor en pacientes con AR que en individuos sanos.

En los estudios de adherencia por citofluorometría de flujo no se obtuvieron los resultados esperados. Hay razones para explicar esto. Primordialmente, la técnica por citofluorometría que se diseñó tenía muy probablemente fallas experimentales. La falla más importante fue que se partió de la premisa de que al levantar por medio de tripsina-EDTA los complejos células endoteliales-linfocitos T, éstos permanecerían fijamente adheridos. Esta suposición en teoría es correcta, pero muy probablemente experimentalmente no sucedió así dado que las adherencias linfocitarias a endotelio reflejaban valores netamente inconsistentes, propios de posibles disociaciones moleculares. Posiblemente las condiciones de pH o de temperatura no fueron adecuadas en algún momento de la preparación de los complejos para análisis por FACS. Este argumento explicaría los valores de adherencia de 3 a 6 veces mayores que los observados por microscopía, (siendo posiblemente el resultado de un mayor número de detritus celulares cuantificados por FACS, aunque los experimentos se hayan realizado con una viabilidad celular

mayor a 70%). Por otra parte, no se realizaron los suficientes experimentos para poder estandarizar adecuadamente la técnica. ¿Qué alternativas se pueden tomar para la resolución experimental?

Se deben estudiar detalladamente las constantes de disociación de integrinas o selectinas versus la fuerza con la que se separan los complejos CE-T. Por otra parte, posteriormente hallamos que estudios realizados por Benschop y colaboradores (14) han demostrado que la adherencia de células mononucleares de sangre periférica a HUVEC puede ser cuantificada por citofluorometría de flujo utilizando un método muy específico. Este consiste en lo siguiente; células mononucleares de sangre periférica adherentes a células HUVEC (previamente estimuladas con IFN- γ) en cultivo y en presencia de PMA, se separan por características de dispersión en un citofluorómetro de flujo, y se dirigen anticuerpos monoclonales contra ellas (como anti-ICAM-1, anti-LFA-1, y anti-CD18) (14). Se mide posteriormente el número de células adherentes entre el número de células endoteliales totales para obtener un cociente de inhibición. Es un buen método para discriminar por medio de dispersión dos cosas; i) la población de células mononucleares de las células endoteliales, ii) las diferentes poblaciones celulares de las CMN (linfocitos, monocitos) (14).

La mayoría de los estudios de adherencia linfocitaria a endotelio involucran el uso de células marcadas radioactivamente, el uso de microscopía, o el uso de un contador de partículas (14). Las desventajas de este tipo de estudios, son que se involucran marcadores radioactivos, se limita el tipo celular que puede ser estudiado, y las células tienen que ser purificadas antes de la adherencia.

La participación de moléculas de adhesión en procesos inflamatorios tiene implicaciones tanto en enfermedades reumáticas como en otro tipo de padecimientos, y por lo tanto el uso potencial de estas moléculas en estrategias terapéuticas es de suma importancia.

Ciertos estudios en arteroesclerosis, han demostrado una expresión significativa de ELAM-1 e ICAM-1, así como del complejo principal de histocompatibilidad MHC clase II, HLA-DR/DP, en células endoteliales en la subíntima, en lugares con gran contenido de infiltrado celular (219). Esto ha demostrado que el endotelio arterial juega un papel importante también en el reclutamiento de células

mononucleares en lesiones arteroescleróticas (219). Se ha demostrado *in vitro*, que la molécula p150,95 se expresa de forma importante, junto con CD68, en monocitos/macrófagos y células microgliales de pacientes con esclerosis múltiple y encefalitis (217,218). Otros autores han demostrado (226) que en autopsias de pacientes con esclerosis múltiple existen niveles significativos de las moléculas MHC clase II, ICAM-1, VCAM-1, el activador de plasminógeno de urokinasa, en áreas cerebrales afectadas, mientras que en autopsias de individuos sanos, no se encontró expresión de ICAM-1 y VCAM-1, y muy poca expresión de las otras moléculas. Por lo tanto, se sugiere que dichas moléculas de adhesión juegan un papel importante en la patogénesis de la esclerosis múltiple (226).

Sin embargo, en otro tipo de estudios, la participación de ICAM-1 y ELAM-1 en procesos de adherencia no es tan clara. Por ejemplo, Colden-Stanfield y Ratcliffe (33) intentaron estimular la adherencia de células HL-60 a células endoteliales HUVEC, por un lado con LPS, y por otro, con el virus de influenza; mientras que la expresión de ELAM-1 e ICAM-1 de membrana, se incrementó 78.3 veces y 4.1 veces respectivamente, bajo tratamiento con LPS, el virus de influenza solamente indujo un incremento de 2.6 y 1.4 veces (respectivamente) en la expresión de ELAM-1 e ICAM-1. Aparentemente, la adherencia inducida por este virus no es mediada por las vías de ELAM-1 e ICAM-1 (33).

Estudiando a 110 pacientes con cáncer (cáncer de mama, de ovarios, gastrointestinal y mielomas), Banks, Gearing y colaboradores demostraron, que existen altos niveles solubles de ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1, comparados con individuos sanos (9). Zaifert y Cohen (236) han realizado experimentos *in vitro* con la línea celular de carcinoma humano COLO 205, y han demostrado que bajo estímulo de células HUVEC con TNF- α , o PMA, en presencia del anticuerpo monoclonal BB11 (anti-ELAM-1), la adherencia de las células tumorales se inhibe significativamente. En efecto, se ha determinado que ELAM-1 es el mediador más importante de adherencia a células endoteliales estimuladas con IL-1 en carcinoma de colon (47); Dejana y colaboradores han comprobado, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-ELAM-1 MBr8, en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (ratones "nude"), que el ligando sobre las células endoteliales al cual se adhería ELAM-1 era efectivamente un carbohidrato fucosilado tipo I de Lewis (47). El MBr8 inhibió significativamente vía ELAM-1, la adherencia de células HT29 marcadas radioactivamente a

endotelio vascular (47). En pacientes con sarcoma de Kaposi, también se ha notado una expresión elevada de los niveles de ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1, donde la adherencia de células MOLT-4 y JY a células de Kaposi (con cierta semejanza endotelial) se ve incrementada a través de estas vías (234).

Se ha visto que el tratamiento con oro (120mg intramuscular) disminuye la expresión endotelial de ELAM-1 en el sinovio inflamado de pacientes con AR (37). El tiomalato de oro sódico tiene efectos inhibitorios en la proliferación de células endoteliales y la expresión de HLA-DR IFN- γ -inducida sobre estas células en pacientes con AR (112). Los corticoesteroides son los agentes anti-inflamatorios predominantes en el tratamiento de diversas enfermedades reumáticas, aunque su eficacia aún no ha sido totalmente definida. Ciertos estudios utilizando dexametasona, cortisol y tetrahidrocortisol han mostrado una inhibición en la expresión de ELAM-1 e ICAM-1 en endotelio (38). Así pues, el receptor de glucocorticoide regula (decrementando) la adhesión leucocitaria a endotelio, así como la expresión de las moléculas ELAM-1 e ICAM-1 (38).

Otros compuestos como la bucilamina (sustancia que genera peróxido de hidrógeno), inhibe la adhesión de linfocitos T a células HUVEC, y pudiera ser un agente terapéutico potencial en inflamaciones crónicas como AR (54). Las interacciones entre la IL-8 y las células endoteliales juegan un papel crucial en la habilidad migratoria de células mononucleares hacia sitios de inflamación (48). Las sustancias aurotiomalato, D-penicilamina y sulfasalazina parecen inmunomodular la síntesis del RNAm de IL-8 en células endoteliales.

El tratamiento con hidrocortisona inhibe la producción de IL-8 por parte de las células endoteliales. Sin embargo, no se ha descrito ningún efecto sobre la secreción de IL-8 por parte de la sulfapiridina, la aurnofina, la hidroxicloraquina y el metotrexate (48). En esclerodermia se ha visto que la D-penicilamina interfiere activamente en la función de células T cooperadoras (186). Estudios realizados por Kawakami y colaboradores (113) han demostrado que el lobenzarit bisódico (10 ug/ml) inhibe la respuesta proliferativa, la expresión de HLA-DR y la adherencia de linfocitos T a células HUVEC, sugiriendo que en AR este agente pudiera reducir la angiogénesis y la migración leucocitaria hacia el sinovio (113). Por otra parte ciertas citocinas como la TGF- β inhiben la expresión de ELAM-1 sobre

células endoteliales humanas. Estudios realizados por Gamble y colaboradores han mostrado disminuciones en la expresión endoteliales de ELAM-1 en un 55% en presencia de esta citocina (71). También la elevación en niveles de AMP cíclico inhibe la síntesis endotelial TNF-inducida de ELAM-1 y VCAM-1, más no de ICAM-1 (175). El cloruro de níquel y el cloruro de cobalato son dos agentes que por el contrario inducen la expresión de ICAM-1 VCAM-1 y ELAM-1 en células endoteliales de biopsias de prepucio (79).

Existen péptidos procarióticos como la toxina de pertussis que bloquean la adherencia leucocitaria a selectinas sobre la superficie de células endoteliales y neutrófilos, y a la vez son capaces de incrementar la expresión de la Integrina Mac-1 (185). Estudios realizados por Jasin y colaboradores han demostrado que inyecciones intra-articulares de antígeno capaz de inducir una respuesta inflamatoria aguda en conejos, junto con una inyección del anticuerpo monoclonal anti-CD18, resulta en un decremento significativo del número de células infiltrando el espacio sinovial artrítico después de 24 horas (102). Demostraron que el uso de anticuerpos anti-CD18 no sólo modifica la etapa inicial aguda artrítica, sino que también induce un mejoramiento significativo de la inflamación crónica en este modelo animal de AR (102). Otros investigadores también han contemplado el uso de anticuerpos monoclonales contra moléculas de adhesión como posible tratamiento de enfermedades reumáticas (170). Se ha visto que la adherencia de linfocitos T a fibroblastos y a células endoteliales puede ser bloqueada *in vivo* por medio de irradiación- γ (no interfiriendo con la viabilidad celular o la expresión de LFA-1), al inducir la activación de ADP-ribosiltransferasa (167).

Así pues, las moléculas de adhesión representan un blanco importante de intervención terapéutica en enfermedades reumáticas.

El objetivo que se planteó en este trabajo se cumplió; se comprobó la hipótesis de que pacientes con enfermedades reumáticas presentan una mayor adherencia linfocitaria a endotelio que individuos sanos, tanto en condiciones basales como en condiciones de estímulo. Se comprobó que la adherencia linfocitaria puede ser fuertemente inhibida por medio de anticuerpos monoclonales específicos contra las

moléculas de adhesión ELAM-1 y p150,95, y que por ende, estas vías participan en la adherencia linfocitaria contra endotelio en dichos padecimientos. Es claro entonces que la expresión de ELAM-1 y p150,95 se ve alterada en estos padecimientos. Evidentemente, estos hallazgos no afirman que dicha alteración sea exclusiva de enfermedades reumáticas, o que las moléculas de adhesión estudiadas sean las más importantes en el desarrollo patológico de esclerodermia o vasculitis. Pero los resultados obtenidos nos enseñan que la expresión de estas moléculas de adhesión es crucial en la adherencia linfocitaria a endotelio en inflamaciones crónicas, y que no es igual a lo que sucede en condiciones fisiológicas normales. Estos hallazgos tan solo son un comienzo para entender la participación de ELAM-1 y p150,95 en enfermedades reumáticas, y por supuesto no pretenden resolver los mecanismos que subyacen a dichas enfermedades. Por otra parte, no se apreciaron diferencias de adherencia linfocitaria entre los pacientes con vasculitis y esclerodermia, y esto es un punto crucial que debe esclarecerse en el futuro si se desean entender mejor las diferencias entre las diversas enfermedades reumáticas. No obstante, este estudio ha podido comprobar que no sólo ELAM-1, sino también p150,95 (molécula poco estudiada) participan de manera más importante de lo que uno esperaba en dichos eventos.

Como vías futuras, estos resultados preliminares deben corroborarse estudiando los niveles de RNA mensajero, así como la expresión sobre la superficie celular de dichas moléculas de adhesión en los pacientes considerados.

Con base a las limitaciones señaladas en estos estudios, se pueden hacer las siguientes propuestas experimentales para profundizar en esta línea de investigación:

- i) Ampliar el número de muestras de pacientes y controles (30 muestras por grupo para darle un mayor valor estadístico).
- ii) Poner mayor énfasis en la homogeneización de las poblaciones, a saber, seleccionar pacientes con cuadros clínicos que fueran lo más similar posible (no tanta diversidad en las enfermedades), y asegurarse que ningún paciente estuviera bajo el tratamiento de un medicamento. Aunque esto es difícil de lograr, es posible hacerlo.
- iii) Seleccionar mitógenos cuya acción tanto sobre el endotelio como sobre leucocitos es mejor conocida

que la de PHA, a saber, IL-1, IFN- γ , LPS, o TNF- α .

iv) Evaluar cuál es la fuente de células endoteliales más apropiada para el estudio realizado.

Por ejemplo, de acuerdo con Watson y Pober (227), actualmente existen líneas celulares HUVEC disponibles comercialmente cuyas condiciones de preparación difieren enormemente de las condiciones estándar descritas por Jaffe (100). No todos los cultivos HUVEC son iguales, y la fuente de la cual se obtienen las HUVEC, así como las condiciones experimentales - como por ejemplo el uso de distintos sustratos como gelatina fijada en glutaraldehído para el crecimiento endotelial a largo plazo (200), en las cuales éstas proliferan y afectan de manera importante los resultados experimentales (227). Thornill y Haskard realizaron un estudio comparando la línea celular EA-hy-926 (hibridización entre células HUVEC y la línea epitelial de carcinoma humano A549) con las HUVEC (213). Demostraron que EA-hy-926 tiene un comportamiento similar a las HUVEC (inducción de ELAM-1, entre otras cosas), pero sólo en presencia de TNF, y no de IL-4 o IFN (213). Ciertos estudios han demostrado que mientras que los niveles de RNA mensajero pre- y post-activación, del factor de Steel y del factor Kit se mantienen mucho más altos en células HUVEC que en células HAEC (células de aorta adulta), los niveles de mRNA de ICAM-1 y de ELAM-1 son más bajos en células HUVEC que en células HAEC (27). Weis y colaboradores (228) recomiendan el uso de células HAEC para estudiar el comportamiento de ciertas enfermedades vasculares como arteroesclerosis y vasculitis, utilizando primordialmente células endoteliales obtenidas a partir de HUAEC, es decir de arteria umbilical humana. Otros investigadores (87,141) recomiendan el uso de células endoteliales obtenidas de la microvasculatura de la piel (prepuccios) (DMVEC), ya que dada la naturaleza del tejido, este tipo de endotelio refleja mejor el fenómeno inflamatorio en enfermedades vasculares. Sin embargo, el cultivo de este tipo de células es mucho más difícil de mantener que el de células HUVEC.

El grupo de Abbot, Blake y colaboradores (1) ha desarrollado un método para obtener células endoteliales de la microvasculatura sinovial (SMEC), utilizando perlas magnéticas de poliestireno cubiertas del marcador *Ulex Europeus* encontrando una expresión elevada en los niveles de ELAM-1 y de ICAM-1 en pacientes con AR. Así pues, según la fuente endotelial que se obtenga, uno debe anticipar la

existencia de diferencias muy importantes tanto en la expresión de moléculas de adhesión, como en el comportamiento endotelial.

iv) Explorar otras vías de adherencia importantes tales como ICAM-1/LFA-1, VCAM-1/VLA-4, y sobre todo enfocarse más sobre la molécula CD18 como tal, pues existen ya diversos trabajos que la implican fuertemente en la adherencia linfocitaria elevada que se encuentra en enfermedades reumáticas (14,87,66,67). Por ejemplo, se ha visto que el anticuerpo anti-CD18 inhibe fuertemente la adherencia linfocitaria a HUVEC (30 a 60%) y a DMVEC (45 a 77%) (14,87).

v) Trataría de identificar diferencias en los patrones de adherencia entre linfocitos T, linfocitos B, células NK, macrófagos, y células mononucleares totales en el grupo de pacientes con vasculitis y el grupo de pacientes con esclerodermia.

vi) Poner mayor énfasis sobre la técnica de medición de adherencia por citofluorometría de flujo, en particular aquella propuesta por Benschop (14), ya que es más eficiente (sobre todo en cuestión de tiempo), y más precisa. Sin embargo, sería apropiado acompañarla consistentemente con estudios de microscopía, tratando de establecer una correlación lineal entre las adherencias obtenidas por ambas técnicas.

vii) Investigar con más detalle qué anticuerpos pudiesen utilizarse como controles y si realmente los anticuerpos anti- $\beta 2$ glicoproteína y anti- $\beta 2$ microglobulina son irrelevantes en las interacciones endotelio/leucocito.

Existen otros métodos - como el ensayo de parámetro - para detectar de forma muy sensible la presencia de niveles de ELAM-1 así como de otras moléculas como ICAM-1 y VCAM-1 en suero, plasma, y sobrenadantes de cultivos (182). Este tipo de métodos servirían también para corroborar con mayor precisión los fenómenos observados *in vitro*. Porque es claro que una de las desventajas mayores de este tipo de análisis es que no es posible aplicar los hallazgos *in vitro* a un fenómeno tan complejo como es el fenómeno inflamatorio del padecimiento reumático *in vivo* (21,126,163,237).

En conclusión, este trabajo ha permitido reiterar la importancia que tienen las moléculas de adhesión como lo son la selectina ELAM-1 y la integrina p150,95 en procesos de adherencia linfocitaria en enfermedades reumáticas. Por ende, debemos tomar en cuenta que su participación en un desarrollo inflamatorio es tan importante como el de las citocinas, los anticuerpos autoreactivos, o el mismo sistema de complemento.

VIII. APÉNDICE

* . Fórmulas de corrección - microscopía *

Cálculo del factor de corrección de ajuste de un campo visual al campo completo de un pozo de microplacas de 24 pozos:

$$\text{Diámetro del campo visual} = \frac{\text{Cifra del campo ocular}}{\text{Aumento propio del objetivo}}$$

1) Para el microscopio Zeiss, Cifra del campo ocular: $10x/18 = 18$
Aumento propio del objetivo = $1x (25x)$

2) Para el microscopio Irascope SI-PH, Cifra del campo ocular: $10x/18 = 18$
Aumento propio del objetivo = $1x (25x)$

Diámetro del campo visual = $18/25 = 0.72 \text{ mm} = 720 \mu\text{m}$
Área del campo visual = $\pi (360\mu\text{m})^2 = 407,150.40 \mu\text{m}^2$
Diámetro del pozo = $16 \text{ cm} \therefore \text{Radio} = 0.8 \text{ cm}$
Área del pozo = $\pi (0.8)^2 = 2.01 \text{ cm}^2 = 2.01 \times 10^8 \mu\text{m}^2$

$$\text{Factor de corrección} = \frac{\text{Área de crecimiento del pozo}}{\text{Área del campo visual}}$$

$$\text{Factor de corrección} = \frac{2.01 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{407,150.4 \mu\text{m}^2} = 493.67$$

$$\text{Porcentaje de adherencia} = \frac{\# \text{ promedio de células adherentes por campo}}{\# \text{ Células totales (sembradas inicialmente) / pozo}} \times 493.67 \times 100$$

VIII. APÉNDICE

* . Fórmulas de corrección - microscopía *

Cálculo del factor de corrección de ajuste de un campo visual al campo completo de un pozo de microplacas de 24 pozos:

$$\text{Diámetro del campo visual} = \frac{\text{Cifra del campo ocular}}{\text{Aumento propio del objetivo}}$$

1) Para el microscopio Zeiss, Cifra del campo ocular: $10x/18 = 18$
Aumento propio del objetivo = $1x (25x)$

2) Para el microscopio Irascope SI-PH, Cifra del campo ocular: $10x/18 = 18$
Aumento propio del objetivo = $1x (25x)$

Diámetro del campo visual = $18/25 = 0.72 \text{ mm} = 720 \mu\text{m}$
Área del campo visual = $\pi (360 \mu\text{m})^2 = 407,150.40 \mu\text{m}^2$
Diámetro del pozo = $16 \text{ cm} \therefore \text{Radio} = 0.8 \text{ cm}$
Área del pozo = $\pi (0.8)^2 = 2.01 \text{ cm}^2 = 2.01 \times 10^8 \mu\text{m}^2$

$$\text{Factor de corrección} = \frac{\text{Área de crecimiento del pozo}}{\text{Área del campo visual}}$$

$$\text{Factor de corrección} = \frac{2.01 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{407,150.4 \mu\text{m}^2} = 493.67$$

$$\text{Porcentaje de adherencia} = \frac{\# \text{ promedio de células adherentes por campo}}{\# \text{ Células totales (sembradas inicialmente)/ pozo}} \times 493.67 \times 100$$

* ESTADÍSTICA INTRA-EXPERIMENTAL *

Condición Experimental	CONTROL C6	ESCLERODERMIA EGP9	VASCULITIS VASC10
Cero (sin estímulo)	x = 1.63 DS = 0.0199	x = 4.76 x = 0.770	x = 5.56 DS = 3.08
PHA	x = 6.215 DS = 0.985	x = 24.125 DS = 0.545	x = 19.41 DS = 0.8699
AB	x = 1.345 DS = 0.415	x = 5.33 DS = 0.28	x = 6.355 DS = 2.225
PAB	x = 7.69 DS = 0.29	x = 20.305 DS = 1.805	x = 21.525 DS = 2.695
AP	x = 0.43 DS = 0.06	x = 1.52 DS = 0.0799	x = 3.055 DS = 0.105
PAP	x = 3.125 DS = 0.795	x = 7.305 DS = 0.485	x = 12.325 DS = 5.825
AE	x = 0.285 DS = 0.065	x = 2.165 DS = 0.135	x = 2.01 DS = 0.620
PAE	x = 4.085 DS = 1.455	x = 12.51 DS = 1.45	x = 12.2 DS = 6.01
x = Media; DS = Desviación Estándar			

IX. BIBLIOGRAFÍA

- (1) - Abbot SE, Kaul A, Stevens CR, Blake DR. Isolation and culture of synovial microvascular endothelial cells. Characterization and assesment of adhesion molecule expression. *Arthr. & Rheum.* 35 (401-406). 1992.
- (2) - Airas L, Salmi M, Jalkanen S. Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kDa molecule Involved in lymphocyte adhesion to vascular endothellum. *J. Immunol.* 151:8 (4228-4238). 1993.
- (3) - Albrecht HP, Hiller D, Hornstein OP, et al. Microcirculatory functions in systemic sclerosis: additional parameters for therapeutic concepts? *J. Invest. Dermatol.* 101 (211-5). 1993.
- (4) - Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 110 (1227-1238). 1990.
- (5) - Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and Inflammatory Injury. *FASEB J.* 8:8 (504-512). 1994.
- (6) - Aronson FR, Libby P, Brandon EP, et al. IL-2 rapidly Induces natural killer cell adhesion to human endothelial cells. A potential mechanism for endothelial injury. *J. Immunol.* 141 (158-163). 1988.
- (7) - Ausubel FM, et al. Preparation of human mononuclear cell populations and subpopulations. *Current Protocols In Molecular Biology, Vol 1. Unit 7.1. pp 7.1.1.-7.1.5.* 1989. John Wiley and Sons. Greene/Wiley Interscience Publications.
- (8) - Aziz KE, McCluskey PJ, Montanaro A, Wakefield D. Vascular endothellum and lymphocyte adhesion molecules in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J. Clin. lab. Immunol.* 37:1 (39-49). 1992.
- (9) - Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br. J. Cancer.* 68:1 (122-124). 1993.
- (10) - Bargatze RF, Kurk S, Watts G, Kishimoto TK, Speer CA, Julita MA. In vivo and in vitro functional examination of a conserved epitope of L- and E-selectin crucial for leukocyte-endothelial cell interactions. *J. Immunol.* 152 (5814-5825). 1994.
- (11) - Bellón T, López-Rodríguez C, Rubio MA, Jochems C, Bernabeu C, Corbí AL. Regulated expression of p150,95 (CD11c/CD18; AlphaX/Beta2) and VLA-4 (CD49d/CD29; Alpha4/Beta1) Integrins during myeloid cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 24 (41-47). 1994.
- (12) - Belmont HM, Buyon J, Giorno R, Abramson S. Up-regulation of endothelial cell adhesion molecules characterizes disease activity in systemic lupus erythematosus, the Shwartzman phenomenon revisited. *Arthr. & Rheum.* 37:3 (376-383). 1994.
- (13) - Bender JR, Sadeghi MM, Watson C, Pfau S, Pardi R. Heterogeneous activation thresholds to cytokines in genetically distinct endothelial cells: evidence for diverse transcriptional responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:9 (3994-3998). 1994.

- (14) - Benschop J, De Smet MBM, Bloem AC, Ballieux RE. Adhesion of subsets of human blood mononuclear cells to endothelial cells in vitro, as quantified by flow cytometry. *Scand. J. Immunol.* 36 (793-800). 1992.
- (15) - Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA:* 84 (9328-9242). 1987.
- (16) - Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 243:4895 (1160-1165). 1989.
- (17) - Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 11 (767-804). 1993.
- (18) - Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91 (379-387). 1993.
- (19) - Blann AD, Illingworth K, Jayson MIV. Mechanisms of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *J. Rheumatol.* 20 (1325-1330). 1993.
- (20) - Blue ML, Conrad P, Webb DL, Sarr T, Macaro M. Interacting monocytes and synovocytes induce adhesion molecules by a cytokine-regulated process. *Lymphokine-cytokine.Res.* 12:4 (213-218). 1993.
- (21) - Brady HR. Leukocyte adhesion molecules: potential targets for therapeutic intervention in kidney diseases. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2:2 (171-182). 1993.
- (22) - Brasile L, Kremer JM, Clarke JL, Cerilli J. Identification of an autoantibody to vascular endothelial cell-specific antigens in patients with systemic vasculitis. *Am. J. Med.* 87 (74-80). 1989.
- (23) - Brizzi MF, Garbarino G, Rossi PR, Pagliardi GL, Arduino C, Avanzi GC, Pegoraro L. Interleukin 3 stimulates proliferation and triggers endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 gene activation of human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 91:6 (2887-2892). 1993.
- (24) - Brown KA, Perry ME, Mustapha Y, Rothlein R, Dumonde DC. Immuno-electron microscopic analysis of the distribution of ICAM-1 in human inflammatory tissue. *Agents-Actions.* 38 Spec No: C35-8. 1993.
- (25) - Burrows NP, Molina FA, Terenghi G, Clark PK, Haskard DO, Polak JM, Jones RR. Comparison of cell adhesion molecule expression in cutaneous leukocytoclastic and lymphocytic vasculitis. *J. Clin. Pathol.* 47:10 (939-944). 1994.
- (26) - Butcher EC. Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. *Am. J. Pathol.* 136 (3-11). 1990.
- (27) - Buzby JS, Knoppel EM, Cairo MS. Coordinate regulation of Steel factor, its receptor (Kit), and cytoadhesion molecule (ICAM-1 and ELAM-1) mRNA expression in human vascular endothelial cells of differing origins. *Exp. Hematol.* 22:2 (122-129). 1994.
- (28) - Carson CW, Hunder GG, Kaplan KL, Johnson CM. Detection of circulating endothelial antigen. *J. Rheumatol.* 18:3 (379-383). 1991.
- (29) - Carson CW, Beall LD, Hunder GG, Johnson CM, Newman W. Serum ELAM-1 is increased in vasculitis, scleroderma, and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 20:5 (809-814). 1993.

- (30) - Chapman PT, Jamar F, Harrison AA, Binns RM, Peters AM, Haskard DO. **Noninvasive imaging of E-selectin expression by activated endothelium in urate crystal-induced arthritis.** *Arthr. & Rheum.* 37:12 (1752-1756). 1994.
- (31) - Chin Y-H, Falanga V, Taylor JR, Cai J-P, Bax J. **Adherence of human helper/memory T-cell subsets to psoriatic dermal endothelium.** *J. Invest. Dermatol.* 94 (413-417). 1990.
- (32) - Claman HN, Giorno RC, Seibold JR. **Endothelial and fibroblastic activation in scleroderma. The myth of the "uninvolved skin".** *Arthr. & Rheum.* 34:12 (1495-1502). 1991.
- (33) - Colden-Stanfield M, Ratcliffe D, Cramer EB, Gallin EK. **Characterization of influenza virus-induced leukocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers.** *J. Immunol.* 151:1 (310-321). 1993.
- (34) - Corbi AL, Miller LJ, O'Connor K, Larson RS, Springer TA. **cDNA cloning and complete primary structure of the α subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150,95.** *EMBO J.* 6:13 (4023-4028). 1987.
- (35) - Corbi-López AL. **Integrinas leucocitarias: subfamilia Beta 2. Estructura y función.** *Adhesinas o Integrinas en Reumatología; XXI Congreso Mexicano de Reumatología y las Primeras Jornadas Iberoamericanas.* (11-15). 9 a 13 de Febrero 1993.
- (36) - Cotran RS. **Endothelial Cells. Chapter 23.** In *The Inflammatory Response. Textbook of Rheumatology, Vol II, 3d Ed.* 1989. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. WB Saunders Co. pp 389-415.
- (37) - Corkill MM, Kirkham BW, Haskard DO, Barbatis C, Gibson T, Panayi GS. **Gold treatment of rheumatoid arthritis decreases synovial expression of the endothelial leukocyte adhesion receptor ELAM-1.** *J. Rheumatol.* 18:10 (1453-1460). 1991.
- (38) - Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissman G. **A mechanism for the inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of ELAM-1 and ICAM-1.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (9991-9995). 1992.
- (39) - Cronstein BN, Weissman G. **The adhesion molecules of inflammation.** *Arthr. & Rheum.* 36:2 (147-157). 1993.
- (40) - Damle NK, Klussman K, Dietsch MT, Mohagheghpour N, Aruffo A. **GMP-140 (P-selectin/CD62) binds to chronically stimulated but not resting CD4+ T-lymphocytes and regulates their production of pro-inflammatory cytokine.** *Eur. J. Immunol.* 22 (1789-1793). 1992.
- (41) - Damle NK, Klussman K, Leytze G, Aruffo A, Linsley PS, Ledbetter JA. **Costimulation with Integrin ligands Intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4+ T lymphocytes.** *J Immunol.* 151:5 (2368-2379). 1993.
- (42) - D'Cruz DP, Houssiau FA, Ramirez G, Baguley E, et al. **Antibodies to endothelial cells in systemic lupus erythematosus: a potential marker for nephritis and vasculitis.** *Clin. Exp. Immunol.* 85:2 (254-261). 1991.
- (43) - De Fourgerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. **Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1.** *J. Exp. Med.* 174 (253-267). 1991.

- (44) - De Fourgerolles AR, Springer TA. Intercellular Adhesion Molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175 (185-190). 1992.
- (45) - De Fourgerolles AR, Klickstein LB, Springer TA. Cloning and expression of Intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J. Exp. Med.* 177 (1187-1192). 1993.
- (46) - De Fourgerolles AR, Qin X, Springer TA. Characterization of the function of Intercellular adhesion molecule ICAM-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J. Exp. Med.* 179:2 (619-629). 1994.
- (47) - Dejana E, Martin-Padura I, Lauri D, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type I carbohydrate chain. *Lab. Invest.* 66:3 (324-330). 1992.
- (48) - Deleuran B, Kristensen M, Paludan K, Zachariae C, Larsen CG, Zachariae E, Thestrup-Pedersen K. The effect of second-line antirheumatic drugs on interleukin-8 mRNA synthesis and protein secretion in human endothelial cells. *Cytokine.* 4:5 (403-409). 1992.
- (49) - Del Papa N, Conforti G, Gambini D, La Rosa L, Tincani A, D'Cruz D, Khamashta M, Hughes GRV, Balestrieri G, Meroni PL. Characterization of the endothelial surface proteins recognized by anti-endothelial antibodies in primary and secondary autoimmune vasculitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 70:3 (211-216). 1994.
- (50) - Diamond MS, García-Aguilar J, Bickford JK, Corbí AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J. Cell. Biol.* 120:4 (1031-1043). 1993.
- (51) - Doukas J, Pober JS. Lymphocyte-mediated activation of cultured endothelial cells. CD4+ T cells inhibit EC class II MHC expression despite secreting IFN-gamma and increasing EC class I MHC and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Immunol.* 145:4 (1088-1098). 1990.
- (52) - Drenk F, Deicher HRG. Pathophysiological effects of endothelial cytotoxic activity derived from sera of patients with progressive systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 15 (468-474). 1988.
- (53) - Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Ann. Rev. Immunol.* 9 (27-66). 1991.
- (54) - Eguchi K, Kawakami A, Ida H, Nakashima, Yamashita I, Sakai M, Shimada H, Terada K, Fukuda T, Ishimaru T, et al. Bucillamine inhibits T cell adhesion to human endothelial cells. *J. Rheumatol.* 19:7 (1045-1050). 1992.
- (55) - El Gabalawy H, Wilkins J. Beta 1 (CD29) integrin expression in rheumatoid synovial membrane: an immunohistologic study of distribution patterns. *J. Rheumatol.* 20:2 (231-237). 1993.
- (56) - Elices MJ, Tamraz S, Tollefson V, Vollger LW. The integrin VLA-4 mediates leukocyte recruitment to skin inflammatory sites *in vivo*. *Clin. Exp. Rheumatol* 11 (Suppl.8). (S77). 1993.
- (57) - Epperson DE, Pober JS. Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J. Immunol.* 153 (5402-5412). 1994.

- (58) - Fairburn K, Kunaver M, Wilkinson LS, Cambridge G, Haskard D, Edwards JCW. **Intercellular adhesion molecules in normal synovium.** *Br. J. Rheumatol.* 32 (302-306). 1993.
- (59) - Fawcett J, Holness CLL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, Simmons DL. **Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes.** *Nature.* 360 (481-484). 1992.
- (60) - Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, et al. **Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity.** *Ann. Rheum. Dis.* 52 (272-277). 1993.
- (61) - Fischer A. **Régulation et modulation thérapeutique de l'adhésion des lymphocytes T.** *Pathol. Biol. (Paris).* 40:8 (789-92). 1992.
- (62) - Fischer C, Thiele HG, Hamann A. **Lymphocyte-endothelial interactions in inflamed synovia: involvement of several adhesion molecules and integrin epitopes.** *Scand. J. Immunol.* 38 (158-166). 1993.
- (63) - FitzGerald O, Soden M, Yanni G, Robinson R, Breshnihan B. **Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis.** *Ann. Rheum. Dis.* 50:11 (792-796). 1991.
- (64) - Filpo RM, Cardon T, Foulet A, Hachulla E, Duquesnoy B, Delcambre B, Janin A. **L'expression du TNF alpha et des molécules d'adhésion constitue-t-elle un marqueur d'évolutivité de la vascularité rhumatoïde?** *Rev. Med. Interne.* 14:10 (1018). 1993.
- (65) - Frampton G, Jayne DRW, Perry GJ, Lockwood CM, Camron JS. **Autoantibodies to endothelial cells and neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis.** *Clin. Exp. Immunol.* 82 (227-232). 1990.
- (66) - Freemont AJ, Jones CJP, Bromley M, Andrews P. **Changes in vascular endothelium related to lymphocyte collections in disease synovia.** *Arthr. & Rheum.* 26 (1427-1433). 1983.
- (67) - Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF, Collins T. **Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation.** *Am. J. Pathol.* 143:3 (725-737). 1993.
- (68) - Fujita H. **Molecular biology of adhesion molecules- structure, expression and function of ICAM-1 and ELAM-1.** *Nippon Rinsho.* 51:6 (1643-1649). 1993.
- (69) - Galéa P, Lebranchu Y, Thibault G, Bardos P. **Interleukin 4 and Tumour Necrosis Factor α induce different adhesion pathways in endothelial cells for the binding of peripheral blood lymphocytes.** *Scand. J. Immunol.* 36 (575-585). 1992.
- (70) - Galocha B, López D, López de Castro JA. **Clonal heterogeneity in LFA-3 and ICAM-1 requirement for lysis by alloreactive T lymphocytes.** *J Immunol.* 150:5 (1653-1662). 1993.
- (71) - Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA. **Transforming growth-factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells.** *J. Immunol.* 150:10 (4494-4503). 1993.
- (72) - García de Vicuña R, Humberá A, Postigo AA, López-Elzaurdia C, De Landázuri MO, Sánchez-Madrid F, Laffón A. **VLA family in rheumatoid arthritis: evidence for in vivo regulated adhesion of synovial fluid T cells to fibronectin through VLA-5 integrin.** *Clin. Exp. Immunol.* 88:3 (435-441). 1992.

- (73) - García de Vicuña R, Humbria A, Díaz-González F, Laffón A. Adhesión leucocitaria al endotelio vascular: bases para la migración a la membrana sinovial inflamada. *Rev. Esp. Reumatol.* 19 (388-398). 1992.
- (74) - Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today.* 14:10 (506-512). 1993.
- (75) - Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim SM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothellum mediated by GMP-140. *Nature.* 343 (757-760). 1990.
- (76) - Gerritsen ME, Niedbala MJ, Szczepanski A, Carley WW. Cytokine activation of human macro- and microvessel-derived endothelial cells. *Blood-Cells.* 19:2 (325-339; discussion, 340-2). 1993.
- (77) - Gerritsen ME, Kelley KA, Ligon G, Perry CA, Shen CP, Szczepanski A, Carley WW. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthr. & Rheum.* 36:5 (593-602). 1993.
- (78) - Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J.* 7 (523-532). 1993.
- (79) - Goebeler M, Meinardus-Hager G, Roth J, Goerdts S, Sorg C. Nickel chloride and cobalt chloride, two common contact sensitizers, directly induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM-1) by endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 100:6 (759-765). 1993.
- (80) - González-Amaro R. Moléculas de adhesión celular y células del sistema inmune. *Adhesinas o Integrinas en Reumatología; XXI Congreso Mexicano de Reumatología y las Primeras Jornadas Iberoamericanas.* (5-7). 9 a 13 de Febrero 1993.
- (81) - Gorski A. The role of cell adhesion molecules in inflammation. *Immunol. Today.* 15:6 (251-255). 1994.
- (82) - Graber N, Gopal TV, Wilson D, et al. T cell bind to cytokine-activated endothelial cells via a novel, inducible sialoglycoprotein and endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 145 (819-830). 1990.
- (83) - Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson CB, Fox DA, Stoolman LM. Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. *J. Clin. Invest.* 91:6 (2609-2619). 1993.
- (84) - Guinan EC, Smith BR, Doukas JT, et al. Vascular endothelial cells enhance T cell responses by markedly augmenting IL-2 concentrations. *Cell. Immunol.* 118 (166-177). 1989.
- (85) - Hale LP, Martin ME, McCollum DE, Nunley JA, Springer TA, Singer KH, Haynes BF. Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment. *Arthr. & Rheum.* 32 (22). 1989.
- (86) - Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, Shakoor Z, Mayall S, Noble G, McCarthy D. A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J. Immunol. Methods.* 146 (219-228). 1992.

- (87) - Haskard DO, Cavender D, Fleck RM, Sontheimer R, Ziff M. Human dermal microvascular endothelial cells behave like umbilical vein endothelial cells in T-cell adhesion studies. *J. Invest. Dermatol.* 88:3. (340-344). 1987.
- (88) - Haskard DO, Cavender D, Maliakkal D, Ziff M. T-cell adhesion to endothelial cells in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 9 (33-37). 1989.
- (89) - Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 8 (365-400). 1990.
- (90) - Herrmann K, Heckmann M, Kulozik M, Haustein UF, Krieg T. Steady-state mRNA levels of collagens I, III, fibronectin, and collagenase in skin biopsies of systemic sclerosis patients. *J. Invest. Dermatol.* 97 (219-222). 1991.
- (91) - Hughes CCW, Savage COS, Pober JS. The endothelial cell as a regulator of T-cell function. *Immunol. Rev.* 117 (85-102). 1990.
- (92) - Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48 (549-554). 1987.
- (93) - Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69 (11-25). 1992.
- (94) - Ichikawa Y, Shimizu H, Yoshida M, Takaya M, Arimori S. Accessory molecules expressed on the peripheral blood or synovial fluid T lymphocytes from patients with Sjögren's syndrome or rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:5 (447-454). 1992.
- (95) - Ishikawa T, Imura A, Tanaka K, Shirane H, Okuma M, Uchiyama T. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 mediate adult T-cell leukemia cell adhesion to endothelial cells. *Blood.* 82:5 (1590-1598). 1993.
- (96) - Ihn H, Fujimoto M, Sato S, Kikuchi K, Igarashi A, Soma Y, Takehara K. Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with localized scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31:4 (591-595). 1994.
- (97) - Ikuta S, Kirby JA, Shenton BK, Givan AL, Lennard TW. Human endothelial cells: effect of TNF-alpha on peripheral blood mononuclear cell adhesion. *Immunology.* 73:1 (71-76). 1991.
- (98) - Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minck CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52 (2745-2756). 1973.
- (99) - Jaffe EA. The role of blood vessels in homeostasis. Vascular function in homeostasis. Chapter 139, Section 8. 1322-1337. *Pathologic Basis of Disease. 5th Edition.* Robbins Ed. 1974. WB Saunders Co.
- (100) - Jaffe EA. Culture of human endothelial cells. *Transplantation Proc.* 12:3. S1. (49-51). 1980.
- (101) - Janssen BA, Luqmanii RA, Gordon C, Hemingway IH, Bacon PA, Gearing AJ, Emery P. Correlation of blood levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 with disease activity in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Br. J. Rheumatol.* 33:12 (1112-1116). 1994.
- (102) - Jasin HE, Lightfoot E, David LS, Rothlein R, Faanes RB, Lipsky PE. Amelioration of antigen-induced arthritis treated with monoclonal antibodies to leukocyte adhesion molecules. *Arthr. &*

Rheum. 35 (541-549). 1992.

(103) - Jiménez SA. Cellular immune dysfunction and the pathogenesis of scleroderma. *Semin. Arthr. Rheum.* 13 (Suppl.1) (104-113). 1983.

(104) - Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthr. & Rheum.* 36:2 (137-146). 1993.

(105) - Jutila MA, Borg EL, Kishimoto TK, Picker LJ, Bargatze RF, Bishop DK, Orosz CG, Wu NW, Butcher EC. Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils and monocytes: role of homing receptors and other adhesion molecules. *Transplantation.* 48 (727-731). 1989.

(106) - Jutila MA. Role of the changes in the vascular endothelium in chronic inflammation. *Clin. Transplant.* 8:3.2 (304-307). 1994.

(107) - Kahaleh MB. Vascular disease in scleroderma. Endothelial T lymphocyte-fibroblast interactions. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 16:1 (53-72). 1990.

(108) - Kahaleh MB, Yin T. Enhanced lymphocyte-endothelial cell interaction in scleroderma. *Arthr. & Rheum.* 33S (S63). 1990.

(109) - Kannagi R. Cell adhesion mediated by ELAM-1 and carbohydrate determinants. *Gan To Kagaku Ryoho.* 20:3 (338-347). 1993.

(110) - Kansas GS, Ley K, Munro JM, Tedder TF. Regulation of leukocyte rolling and adhesion to high endothelial venules through the cytoplasmic domain of L-selectin. *J. Exp. Med.* 177:3 (833-838). 1993.

(111) - Kashiwado T, Oppenheimer-Marks N, Ziff M. T cell inhibitor secreted by macrophages and endothelial cells. *Clin Immunol. Immunopathol.* 53 (137-150). 1989.

(112) - Kawakami A, Eguchi K, Migita K, Nakao H, et al. Inhibitory effects of gold sodium thiomalate on the proliferation and interferon-gamma induced HLA-DR expression in human endothelial cells. *J. Rheumatol.* 17:4 (430-435). 1990.

(113) - Kawakami A, Eguchi K, Ueki Y, Migita K, et al. Effects of lobenzarit disodium on human endothelial cells. Loberazil disodium inhibits proliferative response, HLA-DR antigen expression, and T cell adherence towards endothelial cells. *Arthr. & Rheum.* 34:3 (296-303). 1991.

(114) - Kim DS, Lee KY. Serum soluble E-selectin levels in Kawasaki disease. *Scand. J. Rheumatol.* 23:5 (283-286). 1994.

(115) - Kimball JW. Introduction to Immunology. 3d Ed. Macmillan Publishing Co. 1990. pp 1-523.

(116) - Kishimoto TK, O'Connor K, Lee A, Roberts TM, Springer TA. Cloning of the β subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell.* 48 (681-690). 1987.

(117) - Klieniewski J, Donaldson VH. Endothelial cells produce a substance that inhibits contact activation of coagulation by blocking the activation of Hageman factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (198-202). 1993.

- (118) - 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.* 64:3 (313-320). 1991.
- (119) - Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology.* 61:5-6 (239-246). 1993.
- (120) - Koch ae, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N. Vascular endothelium growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 152:8 (4149-4156). 1994.
- (121) - Kubes P. Polymorphonuclear leukocyte-endothelium interactions: a role for proinflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71:1 (88-97). 1993.
- (122) - Kraling BM, Jimenez SA, Sorger T, Maul GG. Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from the adult human dermis and from skin biopsies of patients with systemic sclerosis. *Lab. Invest.* 71:5 (745-754). 1994.
- (123) - Krzesicki RF, Fleming WE, Winterowd GE, Hatfield CA, Sanders ME, Chin JE. T lymphocyte adhesion to human to human synovial fibroblasts. Role of cytokines and the interaction between intercellular adhesion molecule-1 and Cd11a/CD18. *Arthr. & Rheum.* 34: 1245
- (124) - Laffón-Roca A, García de Vicuña R, Humberia A, Postigo AA, Corbí AL, De Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 88:2 (546-552). 1991.
- (125) - Laffón-Roca A. Moléculas de adhesión: características estructurales y funcionales. *Rev. Esp. Reumatol.* 19 (368-377). 1992.
- (126) - Laffón-Roca A. Papel de las moléculas de adhesión celular en la patogenia de la artritis reumatoide. *Adhesinas o Integrinas en Reumatología; XXI Congreso Mexicano de Reumatología y las Primeras Jornadas Iberoamericanas.* (15-18). 9 a 13 de Febrero de 1993.
- (127) - Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Marchisio PC. The role of Integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity. *J. Cell. Biol.* 112:3 (479-490). 1991.
- (128) - Larson RS, Corbí AL, Berman L, Springer T. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J. Cell. Biol.* 108:2 (703-712). 1989.
- (129) - Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science.* 258. 1992.
- (130) - Lau CS, McLaren M, Hanslip J, Kerr M, Belch JJ. Abnormal plasma fibrinolysis in patients with rheumatoid arthritis and impaired endothelial fibrinolytic response in those complicated by vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* 52:9 (643-649). 1993.
- (131) - Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from a prerequisite for adhesion through Integrins. *Cell.* 65 (859-873). 1991.
- (132) - Lee ML, To SS, Cooper A, Jones M, Schrieber L. Augmented lymphocyte binding to cultured

endothellum in psoriasis. *Clin. Exp. Immunol.* 91:3 (346-350). 1993.

(133) - LeRoy EC. **A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis).** *Ann. Rheum. Dis.* 51:2 (286-288). 1992.

(134) - Lindman BJ, Noreen HJ, Geller RL, Dalmaso AP, Bach FH, Platt JL. **The role of cell-surface glycoproteins in the activation of endothelial cells by antibody and complement.** *Transpl. Proc.* 24:2 (586-587). 1992.

(135) - Lindsley HB, Smith DD, Cohick CB, Koch AE, David LS. **Proinflammatory cytokines enhance human synovocyte expression of functional intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1).** *Clin. Immunol. Immunopathol.* 68:3 (311-320). 1993.

(136) - Loeser RF. **Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins.** *Arthr. & Rheum.* 36:8 (1103-1110). 1993.

(137) - Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. **Inflammatory roles of P-selectin.** *J. Clin. Invest.* 92 (559-570). 1993.

(138) - Lundgren-Akerlund E, Olofsson AM, Berger E, Arfors KE. **CD11b/CD18-dependent polymorphonuclear leucocyte interaction with matrix proteins in adhesion and migration.** *Scand. J. Immunol.* 37 (569-574). 1993.

(139) - Majewski S, Hunzelmann N, Johnson JP, Jung C, Mauch C, Ziegler-Heitbrock HW, Riethmuller G, Krieg T. **Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the skin of patients with systemic scleroderma.** *J. Invest. Dermatol.* 97:4 (667-671). 1991.

(140) - Mantovani A, Russolino F, Dejana E. **Cytokine regulation of endothelial cell function.** *FASEB J.* 6 (2591-2599). 1992.

(141) - Marks RM, Czerniecki M, Penny R. **Human dermal microvascular endothelial cells: an improved method for tissue culture and a description of some singular properties in culture.** *In vitro Cell. Develop. Biol.* 21:11 (627-635). 1985.

(142) - Mason JC, Kapahi P, Haskard DO. **Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus - lack of correlation with levels of circulating vascular adhesion molecule-1.** *Arthr. & Rheum.* 36:4 (519). 1993.

(143) - Mayes MD, Wooley PH, Whalen J, *et al.* **Lymphocyte subsets and mitogen responses in scleroderma - correlation with disease severity.** *Arthr. & Rheum.* 33S (S63). 1990.

(144) - Mazure G, Jayawardene SA, Perry JD, McCarthy D, Macey MG, Dumonde DC, Brown KA. **Abnormal binding properties of blood monocytes in rheumatoid arthritis.** *Agents-Actions.* 38 Spec No: C41-3. 1993.

(145) - McEver RP. **Leukocyte-endothelial cell interactions.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4 (840-849). 1992.

(146) - Mebius RE, Watson SR. **L- and E-selectin can recognize the same naturally occurring ligands on high endothelial venules.** *J. Immunol.* 151:6 (3252-3260). 1993.

(147) - Meunier L, Bohjanen K, Voorhees JJ, Cooper KD. **Retinoic acid upregulates human Langerhans**

- cell antigen presentation and surface expression of HLA-DR and CD11c, a beta 2 integrin critically involved in T cell activation. *J. Invest. Dermatol.* 103:6 (775-779). 1994.
- (148) - Michl J, Qiu Q-Y, Kuere HM. Homing receptors and addressins. *Curr. Opin. Immunol.* 3 (373-382). 1991.
- (149) - Moreas JR, Stastny P. A new antigen system expressed in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 60 (449-454). 1977.
- (150) - Moy JN, Thomas LL, Whisler LC. Eosinophil major basic protein enhances the expression of neutrophil CR3 and p150,95. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:4 (598-606). 1993.
- (151) - Needleman BW. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 on the fibroblasts of scleroderma patients. *Arthr. & Rheum.* 33 (1847-1851). 1990.
- (152) - Needleman BW. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 4:6 (862-868). 1992.
- (153) - Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC II, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 247 (1219-1222). 1990.
- (154) - Oen K, Danell G, Stewart S, Wilkins J, Tazumi K, Jacobson K. Adhesion of peripheral blood lymphocytes of children with arthritis to human umbilical vein endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 95:3 (415-423). 1994.
- (155) - Palacios-Boix A, Alarcón-Segovia D. Antibodies to endothelial cells: new clues for the study of vascular damage in the autoimmune diseases. *Cervera R, Ed. Antibodies to endothelial cells and vascular damage. 1 Ed. Boca Ratón: CRC Press, (1-15). 1994.*
- (156) - Palkama T, Majuri ML, Mattila P, Hurme M, Renkonen R. Regulation of endothelial adhesion molecules by ligands binding to the scavenger receptor. *Clin. Exp. Immunol.* 93 (353-360). 1993.
- (157) - Pall AA, Savage CO. Mechanisms of endothelial cell injury in vasculitis. *Springer Semin. Immunopathol.* 16:11 (23-37). 1994.
- (158) - Pall AA, Adu D, Drayson M, Taylor CM, Richards NT, Michael J. Circulating soluble adhesion molecules in systemic vasculitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 9:7 (770-4). 1994.
- (159) - Pardi R, Bender JR. Signal transduction requirements for the generation of CD4+ and CD8+ T-cell responses to human allogeneic microvascular endothelium. *Circ. Res.* 69:5 (1269-1279). 1991.
- (160) - Pardi R, Inverardi L, Bender JR. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol. Today.* 13:6 (224-230). 1992.
- (161) - Pearson JD. Endothelial Cell Biology. *Radiology:* 179 (9-14). 1991.
- (162) - Pearson JD. The endothelium: its role in scleroderma. *Ann. Rheum. Dis.* 50 (1829-1835). 1991.
- (163) - Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Pérez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x. *Science.* 250 (1130-1132). 1990.

- (164) - Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature*: 349 (796-798). 1991.
- (165) - Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Ann. Rev. Immunol.* 10 (561-591). 1992.
- (166) - Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LWMM. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J. Immunol.* 150:3 (1105-1121). 1993.
- (167) - Piela-Smith TH, Aune T, Aneiro L, Nuveen E, Korn JH. Impairment of lymphocyte adhesion to cultured fibroblasts and endothelial cells by γ -irradiation. *J. Immunol.* 148:1 (41-46). 1992.
- (168) - Pigott R, Needham LA, Edwards RM, Walker C, Power C. Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leukocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 147:1 (130-135). 1991.
- (169) - Pitzalis C. Adhesion and migration of inflammatory cells. *Clin. Exp. Rheumatol.* 11 (Suppl.8) (S71). 1993.
- (170) - Pitzalis C, Choy E, Kingsley G. Monoclonal antibody therapy in rheumatic diseases. *Presse Med. (France)*. 23:11 (532-539). 1994.
- (171) - Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*. 50 (537-544). 1990.
- (172) - Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* 70 (427-451). 1990.
- (173) - Pober JS, Doukas J, Hughes CC, Savage CO, Munro JM, Cotran RS. The potential role of vascular endothelium in immune reactions. *Hum. Immunol.* 28:2 (258-262). 1990.
- (174) - Pober JS, Cotran RS. Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. *Adv. Immunol.* 50 (261-302). 1991.
- (175) - Pober JS, Slowik MR, De Luca LG, Ritchie AJ. Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 150:11 (5114-5123). 1993.
- (176) - Pomerat CM, Slick WC. Isolation and growth of endothelial cells in tissue culture. *Nature*. 198 (859-861). 1963.
- (177) - Postlethwaite AE. Early immune events in scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 16:1 (125-137). 1990.
- (178) - Postlethwaite AE. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 5:6 (766-772). 1993.

- (179) - Postigo AA, García-Vicuña R, Díaz-González F, Arroyo AG, De Landazuri MO, Chi-Rosso G, Lobb RR, Laffon A, Sánchez-Madrid F. Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Clin. Invest.* 89:5 (1445-1452). 1992.
- (180) - Postigo AA, Teixidó J, Sánchez-Madrid F. The $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *Research in Immunology. Forum of adhesion molecules and their clinical implications: endothelial-leukocyte interactions.* 1993.
- (181) - Poubelle PE, Grassi J, Pradelles P, Marceau F. Pharmacological modulation of Interleukin 1 production by cultural endothelial cells from umbilical veins. *Immunopharmacology.* 19:2 (121-130). 1990
- (182) - New Parameter Assays. For convenient, sensitive and reproducible measurements of soluble VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin (ELAM-1) in serum, plasma, and culture fluids. *R&D Systems Publication.* 1994.
- (183) - Cytokines and adhesion molecules. Interdependence, overlap, and similarity. *R&D Systems.* 1994.
- (184) - Robertson CR, McCallum RM. Changing concepts in pathophysiology of the vasculitides. *Curr. Opin. Rheumatol.* 6:1 (3-10). 1994.
- (185) - Rozdzinski E, Burnette WN, Jones T, Mar V, Tuomanen E. Prokaryotic peptides that block leukocyte adherence to selectins. *J. Exp. Med.* 178:3 (917-924). 1993.
- (186) - Rosada M, Fiocco U, De Silvestro G, et al. Effect of D-penicillamine on the T cell phenotype in scleroderma. Comparison between treated and untreated patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 11 (143-148). 1993.
- (187) - Rossiter H, van Reijssen F, Muddle GC, Kalthoff F, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Picker LJ, Kupper TS. Skin-disease-related T cells bind to endothelial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *Eur. J. Immunol.* 24 (205-210). 1994.
- (188) - Rudnika L, Majewski S, Blaszyk M, Skienzielowska A, Makiela B, Skopinska M, Jablonska S. Adhesion of peripheral blood mononuclear cells to vascular endothelium in patients with systemic sclerosis. *Arthr. & Rheum.* 35 (771-775). 1992.
- (189) - Ruohslati E. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87 (1-5). 1991.
- (190) - Sacristán Rock C, Palacios Boix A. Patrones de adhesión linfocitaria en pacientes con enfermedades vasculares autoinmunes. *Abstr. Revista Mexicana de Reumatología.* 10:1 (7). 1995.
- (191) - Sako D, Chang X-J, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, Cumming DA, Larsen GR. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 75 (1179-1186). 1993.
- (192) - Salmi M, Jalkanen S. A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science.* 257:5075 (1407-1409). 1992.
- (193) - Sánchez-Madrid F, Corbí AL. Leukocyte Integrins: structure, function and regulation of their activity. *Sem. Cell Biol.* 3 (199-210). 1992.

- (194) - Sánchez-Madrid F. **Integrinas $\beta 1$ (VLA)**. *Adhesinas o Integrinas en Reumatología; XXI Congreso Mexicano de Reumatología y las Primeras Jornadas Iberoamericanas*. (8-10). 9 a 13 de Febrero 1993.
- (195) - Savage Co; Hughes CC, Pepinsky RB, Wallner BP, Freedman AS, Pober JS. **Endothelial cell lymphocyte function-associated antigen-3 and an unidentified ligand act in concert to provide costimulation to human peripheral blood CD4+ T cells**. *Cell. Immunol.* 131:7 (150-163). 1991.
- (196) - Savage CO, Cooke SP. **The role of the endothelium in systemic vasculitis**. *J. Autoimmun.* 6:2 (237-249). 1993.
- (197) - Sfikakis PP, Tesar J, Baraf H, Lipnick R, Klipple G, Tsokos GC. **Circulating adhesion molecule-1 in patients with systemic sclerosis**. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 68:1 (88-92). 1993.
- (198) - Shimizu Y, Shaw S, Graber N, Venkat Gopal T, Horgan KJ, Van Seventer GA, Newman W. **Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1**. *Nature*: 349 (799-802). 1991.
- (199) - Silber A, Newman W, Reinman KA, Hendricks E, Walsh D, Ringler DJ. **Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation**. *Lab. Invest.* 70:2 (163-175). 1994.
- (200) - Smeets EF, Von Asmuth EJ, Van der Linden CJ, Leeuwenberg JF, Buurman WA. **A comparison of substrates for human umbilical vein endothelial cell culture**. *Biotech. Histochem.* 67:4 (241-250). 1992.
- (201) - Smith CW. **Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation**. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71:1 (76-87). 1993.
- (202) - Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. **Regulation of vascular Integrins**. *Blood.* 81:11 (2827-2843). 1993.
- (203) - Sollberg S, Peltonen J, Uitto J, Jimenez SA. **Elevated expression of $\beta 1$ and $\beta 2$ Integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset**. *Arthr. & Rheum.* 35:3 (290-298). 1992.
- (204) - Somer T. **Thrombo-embolic and vascular complications in vasculitic syndromes**. *Eur. Heart. J.* 14. Suppl K. (24-29). 1993.
- (205) - Somersalo K, Tarkkanen J, Patarroyo M, Sakseli E. **Involvement of $\beta 2$ -Integrins in the migration of human natural killer cells**. *J. Immunol.* 149:2 (590-598). 1992.
- (206) - Springer TA. **Adhesion receptors of the immune system**. *Nature.* 346 (425-434). 1990.
- (207) - Stuhlmeier KM, Csizmadia V, Cheng Q, Winkler H, Bach FH. **Selective inhibition of E-selectin, ICAM-1, and VCAM in endothelial cells**. *Eur. J. Immunol.* 24 (2186-2190). 1994.
- (208) - Swerlick RA, Lawley TJ. **Role of microvascular endothelial cells in inflammation**. *J. Invest. Dermatol.* 100 (111S-115S). 1993.
- (209) - Takeda I, Kaise S, Nishimaki T, Kasukawa R. **Soluble P-selectin in the plasma of the patients with connective tissue diseases**. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105:2 (128-134). 1994.

- (210) - Takeuchi T, Amano K, Sekine H, Koide J, Abe T. **Upregulated expression and function of Integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis.** *J. Clin. Invest.* 92 (3008-3016). 1993.
- (211) - Takahashi H, Söderström K, Nilsson E, Kiessling R, Patarroyo M. **Integrins and other adhesion molecules on lymphocytes from synovial fluid and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients.** *Eur. J. Immunol.* 22 (2879-2885). 1992.
- (212) - Tamatani T, Kuida K, Watanabe T, Koike S, Miyasaka M. **Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. III. Characterization of the LECAM-1 (L selectin)-dependent adhesion pathway in rats.** *J. Immunol.* 150:5 (1735-1745). 1993.
- (213) - Thornhill MH, Li J, Haskard DO. **Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926.** *Scand. J. Immunol.* 38 (279-286). 1993.
- (214) - Tiisala S, Majuri ML, Carpen O, Renkonen R. **Enhanced ICAM-1-dependent adhesion of myelomonocytic cells expressing increased levels of beta 2 integrins and CD43.** *Scand. J. Immunol.* 39:3 (249-256). 1994.
- (215) - Toyama-Sorimachi N, Miyake K, Miyasaka M. **Activation of CD44 induces ICAM-1/LFA-1-independent, Ca^{2+} , Mg^{2+} -independent adhesion pathway in lymphocyte-endothelial cell interaction.** *Eur. J. Immunol.* 23 (439-446). 1993.
- (216) - Ueda T, Rieu P, Brayer J, Arnaout MA. **Identification of the complement IC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (Cd11b/CD18).** *Proc. Natl. Acad. USA.* 91:22 (19680-10684). 1994.
- (217) - Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R. **Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen presenting cells.** *J. Leukoc. Biol.* 56:6 (732-740). 1994.
- (218) - Ulvestad E, Williams K, Mork S, Antel J, Nyland H. **Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro.** *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:5 (492-501). 1994.
- (219) - Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. **Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions.** *Am. J. Pathol.* 141:6 (1427-1433). 1992.
- (220) - Van der Zee JM, Heurkens AH, van der Voort EA, Daha MR, Breedveld FC. **Characterization of anti-endothelial antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis.** *Clin. Exp. Rheumatol.* 9:6 (589-594). 1991.
- (221) - Van Dinther Janssen AC, Horst E, Koopman G, Newmann W, Scheper RJ, Meijer CJ, Pals ST. **The VLA-4/VCAM-1 pathway is involved in lymphocyte adhesion to endothelium in rheumatoid synovium.** *J. Immunol.* 147:12 (4207-4210). 1991.
- (222) - Veale D, Yanni G, Rogers S, Barnes L, Breshnihan B, Fitzgerald O. **Reduced synovial membrane macrophage numbers, ELAM-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis.** *Arthr. & Rheum.* 36:7 (893-900). 1993.
- (223) - Von Asmuth EJ, Leeuwenberg JF, Ceska M, Buurman WA. **LPS and cytokine-induced endothelial cell IL-6 release and ELAM-1 expression, involvement of serum.** *Eur. Cytokine. Netw.* 2:4 (291-297).

1991.

(224) - Von Asmuth EJ, Smeets EF, Ginsel LA, Onderwater JJ, Leeuwenberg JF, Buurman WA. Evidence of endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 22:10 (2519-2526). 1992.

(225) - Wang CR, Liu MF, Tsai RT, Chuang CY, Chen CY. Circulating intercellular adhesion molecules-1 and autoantibodies including anti-endothelial cell, anti-cardiolipin, and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with vasculitides. *Clinical Rheumatology.* 12:3 (375-380). 1993.

(226) - Washington R, Burton J, Todd RF 3d, Newman W, Dragnovic L, Dore-Duffy P. Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 35:1 (89-97). 1994.

(227) - Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R, Pober JS. Variability among human umbilical vein endothelial cultures. *Science.* 268 (447-448). 1995.

(228) - Weis JR, Sun B, Rodgers GM. Improved method of human umbilical arterial endothelial cell culture. *Thrombosis Res.* 61. (171-173). 1991.

(229) - Welder CA, Lee DH, Takei F. Inhibition of cell adhesion by microspheres coated with recombinant soluble intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 150:6 (2203-2210). 1993.

(230) - Wellicome SM, Kapahi P, Mason JC, Lebranchu Y, Yarwood H, Haskard DO. Detection of a circulating form of vascular cell adhesion molecule-1: raised levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 92:3 (412-418). 1993.

(231) - Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology. 2d Ed. Churchill Livingstone. 1988. pp 1-348.*

(232) - Williams TJ, Hellewell PG. Endothelial cell biology. Adhesion molecules involved in microvascular inflammatory response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146 (S45-S50). 1992.

(233) - Wilkinson LS, Edwards JCW, Poston RN, Haskard DO. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in normal and inflamed synovial. *Lab. Invest.* 68 (82-88). 1993.

(234) - Yang J, Yuelin X, Cheng Z, Kelly Hagan M, Lawley T, Offermann MK. Regulation of adhesion molecule expression in Kaposi's Sarcoma cells. *J. Immunol.* 152 (361-373). 1994.

(235) - Ylanne J, Chen Y, O'Toole TE, Loftus JC, Takada Y, Ginsberg MH. Distinct functions of integrin alpha and beta subunit cytoplasmic domains in cell spreading and formation of focal adhesions. *J. Cell Biol.* 122:1 (223-233). 1993.

(236) - Zaifert K, Cohen MC. COLO 205 utilizes E-selectin to adhere to human endothelium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 68:1 (51-56). 1993.

(237) - Ziff M. Role of the endothelium in chronic inflammatory synovitis. *Arthr. & Rheum.* 34 (1345-1352). 1991.