

INDICADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN SÍNDROME CUTÁNEO RADIONDUCIDO (SCR) POR PRÁCTICAS DE RADIOLOGÍA INTERVENCIONISTA

Molinari A.¹, Portas M.², Rossini A.¹; Michelin S.¹; Dubner D.¹

¹ Autoridad Regulatoria Nuclear,
² Hospital de Quemados del GCBA

RESUMEN

Las lesiones radioinducidas en piel pueden tener severas secuelas, disminuyendo la calidad de vida de personas expuestas accidentalmente, constituyendo también motivo de preocupación en ámbitos de la radioterapia y radiología intervencionista.

El síndrome cutáneo radioinducido (SCR) se basa en una combinación de procesos inflamatorios y alteración de la proliferación celular, cuya evolución depende de varios factores.

En el marco de un acuerdo entre el Hospital de Quemados GCBA y la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN), se encuentra en ejecución un protocolo para el diagnóstico y tratamiento del SCR. Ligado al mismo se desarrolla este estudio cuyo objetivo es identificar biomarcadores del proceso inflamatorio, y su utilidad como indicador de la evolución y la respuesta de los pacientes al tratamiento terapéutico.

La expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y β 1-Integrina en granulocitos y linfocitos, así como cambios en subpoblaciones de linfocitos T y el nivel plasmático de Proteína C Reactiva (PCR), fueron evaluados en 15 pacientes con SCR por prácticas de radiología intervencionista.

Se observa un significativo aumento de la expresión de β 1-Integrina en linfocitos de pacientes con lesiones grado 3-4 de acuerdo al sistema RTOG/EORTC, en buena correlación con la evolución del paciente. Asimismo revela una tendencia al aumento de su expresión en granulocitos en el mismo grupo.

El análisis de subpoblaciones linfocitarias demuestra una alteración en la homeostasis de los linfocitos T.

Los niveles de PCR se comportan como indicadores del proceso inflamatorio agudo.

Los parámetros analizados en combinación con otros indicadores de inflamación, podrían ser utilizados como potenciales marcadores para el seguimiento del proceso de inflamación radioinducida, así como disponer de un mayor conocimiento radiopatológico de la respuesta de los tejidos normales en escenarios de exposición radiológica accidental, permitiendo aportar información adicional al médico tratante para guiar el tratamiento terapéutico en forma personalizada.

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome cutáneo radioinducido (SCR) es el término usado para describir los efectos de las radiaciones ionizantes sobre la piel, en la cual se ve comprometida esencialmente su función como barrera física e inmunológica. Puede presentarse en etapas secuenciales en forma aguda, dependiendo fundamentalmente de la dosis recibida (eritema, flictenas, descamación seca y húmeda), seguida o no por lesiones crónicas (necrosis, ulceración, cambio en la pigmentación, fibrosis), disminuyendo la calidad de vida de personas expuestas accidentalmente y constituyendo también motivo de preocupación en ámbitos de la radioterapia y radiología intervencionista [1].

¹ E-mail del Autor. amolinari@arn.gob.ar

El SCR se basa en una combinación de complejos procesos inflamatorios y alteración de la proliferación celular, donde el daño tardío refleja una falla de la regeneración del tejido funcional por la desregulación radioinducida del proceso normal de cicatrización.

El reclutamiento de leucocitos de sangre circulante es decisivo en el inicio y progresión de la reacción inflamatoria. Numerosos pasos en la cascada de reclutamiento y extravasación son orquestados por moléculas de adhesión expresadas por leucocitos y células endoteliales. Por otra parte, una alteración crónica de la homeostasis del sistema inmune ha sido descrita en sobrevivientes a exposiciones accidentales, siendo descritas anomalías funcionales y cuantitativas en linfocitos T y B [2,3].

Como se ha establecido anteriormente, el proceso es secuencial y progresivo, pero la evolución puede variar de paciente a paciente, dependiendo de muchos factores, entre ellos la susceptibilidad genética y co-morbilidades presentes. De allí la necesidad de disponer de biomarcadores pronósticos y evolutivos para el SCR [4].

El objetivo de este estudio es examinar algunos aspectos de la respuesta inmunoinflamatoria en pacientes con lesiones cutáneas producidas por exposición en prácticas de radiología intervencionista. El uso de técnicas de radiología intervencionista, guiadas fluoroscópicamente se ha incrementado, sobre todo en los últimos años. Procedimientos complejos con prolongados tiempos de exposición han elevado el número de pacientes con efectos radioinducidos en piel, tanto agudos como tardíos.

Se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y $\beta 1$ Integrina, así como cambios en subpoblaciones de linfocitos T y el nivel plasmático de Proteína C Reactiva (PCR). Se analizó la potencial aplicabilidad como indicadores de la respuesta inflamatoria en el SCR y su relación con la evolución del paciente.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Pacientes

Existe un acuerdo firmado entre el Hospital de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires (HQGCBA) y la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) desde el año 1997, donde el Comité de Radiopatología (integrado por profesionales de ambas instituciones) lleva a cabo actividades relacionadas a dosimetría, diagnóstico y tratamiento de pacientes con Síndrome Cutáneo Radioinducido (SCR). Entre los años 1997 y 2014 el Comité de Radiopatología del HQGCBA evaluó 248 pacientes con SCR.

Para este estudio se seleccionaron 15 pacientes sometidos a procedimientos de radiología intervencionista que presentaron lesiones cutáneas tempranas y tardías, e ingresaron al HQGCBA entre los años 2011 y 2014. Se incluyeron pacientes de ambos sexos y en un rango de edades de 43-84 años. Se consideraron como efectos tardíos los aparecidos luego de 3 meses del procedimiento radiológico y la gravedad de las lesiones fue clasificada de acuerdo al sistema RTOG/EORTC.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del HQGCBA y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

Adicionalmente se analizaron 7 muestras de sangre periférica de personas no sobre expuestas a radiaciones ionizantes a modo de control.

2.2 Toma de muestras

De cada paciente se extrajeron 3 ml de sangre venosa en tubos de colección con EDTA (Vacutainer, BD). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el procesado de la muestra por un período no mayor a 24 horas.

2.3 Citometría de Flujo

La expresión de las moléculas ICAM1 y Beta1-Integrina se midieron por reacción con anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano ICAM1 conjugado con FITC (Chemicon) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-Integrina-Beta1-humana CD29 conjugado con FITC (Chemicon). Para ambas moléculas la determinación se realizó tanto en linfocitos como en granulocitos.

La relación Linfocitos T CD4+ / Linfocitos T CD8+ se determinó por marcación de los linfocitos con los anticuerpos monoclonales anti CD4 y anti CD8 conjugados con marcadores de fluorescencia, usando el Kit Tritest (BectonDickinson) en sangre.

Luego de la lisis de eritrocitos con Solución Facs Lysing (BectonDickinson), las muestras fueron analizadas en un citómetro FACSCalibur (BectonDickinson) usando el programa computacional CellQuest Pro.

Conjuntamente con el estudio de las muestras extraídas de pacientes irradiados se analizaron muestras de controles sanos como valores de referencia.

2.4 Análisis de Proteína C Reactiva (PCR)

El nivel de PCR se midió en plasma con un ensayo turbidimétrico Full Range CRP (Randox).

2.5 Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre los niveles de ICAM1, Beta-Integrina y PCR, para todos los grupos, fue determinada por el test t de Student.

Las subpoblaciones linfocitarias (TRITEST) fueron analizadas de acuerdo a los ensayos no paramétricos, Kruskal-Wallis, seguido por Mann-Whitney para dos grupos.

En todos los casos la significancia estadística fue establecida a $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Las muestras fueron clasificadas de acuerdo al sistema RTOG/EORTC según el grado de toxicidad de la lesión en piel (Grado 1 a 4, siendo 4 el de mayor gravedad). En la figura 1 se ilustran dos lesiones, evaluadas en este trabajo, que fueron clasificadas en diferentes grupos según su grado de toxicidad.



Figura 1 – A) Lesión clasificada como Grado 1-2; B) Lesión clasificada como Grupo 3-4 según sistema RTOG/EORTC.

A fin de evaluar la expresión de Beta 1-Integrina en linfocitos y granulocitos se construyeron los siguientes Grupos de estudio: A) todas las muestras estudiadas, B) muestras de los pacientes que exhibieron Grado 1-2 al momento de la toma, y C) muestras de los pacientes que exhibieron Grado 3-4 al momento de la toma. Los niveles de Beta 1-Integrina fueron expresados como Índice Medio de Fluorescencia (IMF) tanto en granulocitos como en linfocitos de pacientes con lesiones cutáneas radioinducidas.

Para linfocitos se observó una mayor expresión de β 1-Integrina cuando se los comparó con los niveles de expresión del grupo control (Figura 2). Esta diferencia fue estadísticamente significativa tanto para todo el grupo en estudio (Grupo A), como para las muestras correspondientes a Grado 3-4 de las lesiones (Grupo C), con $p = 0,0207$ y $p = 0,0114$ respectivamente.

Para granulocitos los niveles de Beta Integrina fueron similares, excepto para las muestras de Grado 1-2 (Grupo B de estudio) donde fue significativamente menor al nivel del grupo control, $p = 0,0116$ (Figura 3).

La expresión de ICAM reveló niveles de expresión similares tanto en linfocitos, como en granulocitos (datos no mostrados).

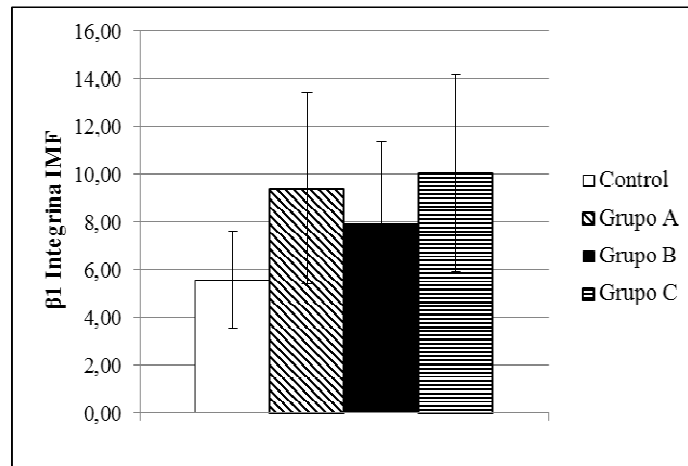


Figura 2 - Niveles de Beta1-Integrina expresada como Índice Medio de Fluorescencia (IMF) en linfocitos de pacientes con lesiones cutáneas radioinducidas. Valores representados: Media \pm DS.

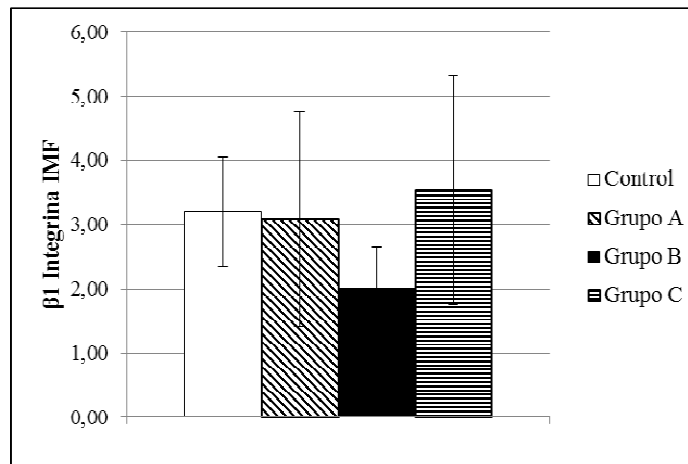


Figura 3 - Niveles de Beta-Integrina expresada como Índice Medio de Fluorescencia (IMF) en granulocitos de pacientes con lesiones cutáneas radioinducidas. Valores representados: Media \pm DS.

A 8 de los pacientes se les evaluó la expresión de Beta 1-Integrina en linfocitos en función a la respuesta al tratamiento terapéutico. En todos los casos se observó una variación de su expresión a lo largo del tiempo (Figura 4), que se correlacionó con la evolución de las lesiones. En el mismo gráfico puede observarse que, para algunos pacientes, la expresión de $\beta 1$ Integrina en linfocitos llegó a niveles que se encontraron dentro del límite de confianza del 95% correspondiente a la media de expresión del grupo control. En la figura 5 se muestran las lesiones de 3 pacientes a los que se les realizó el seguimiento a lo largo del tiempo, en diferentes momentos de la curva.

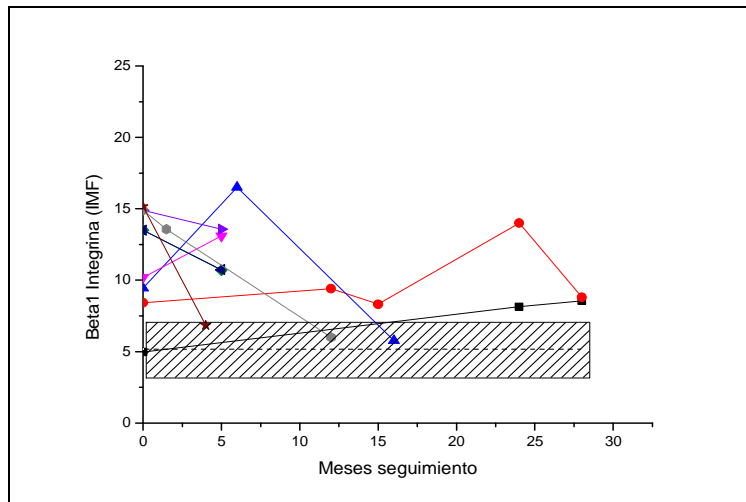


Figura 4 - Niveles de Beta1-Integrina en linfocitos en función del tiempo, expresada como Índice Medio de Fluorescencia (MFI).



Figura 5 – A, B, C) Estado de la lesión de 3 pacientes en diferentes momentos de la curva de $\beta 1$ Integrina en el tiempo.

La determinación por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos T mostró una disminución de la relación $CD4^+ / CD8^+$ en pacientes (Grupo A: Mediana 0,98, rango intercuartilo 0,78-1,90) respecto del grupo control (Mediana 1,39, rango intercuartilo 1,02-1,72). Esta observación no alcanzó significancia estadística.

Se observó una distorsión en la frecuencia de precursores tímicos $CD4-CD8-$ (Dobles negativos, DN) y $CD4+CD8+$ (Dobles positivos, DP) en sangre periférica de los pacientes analizados (Figura 6). La diferencia fue significativa entre el nivel de DN del grupo control y el grupo de pacientes con lesiones cutáneas radioinducidas ($p < 0,05$).

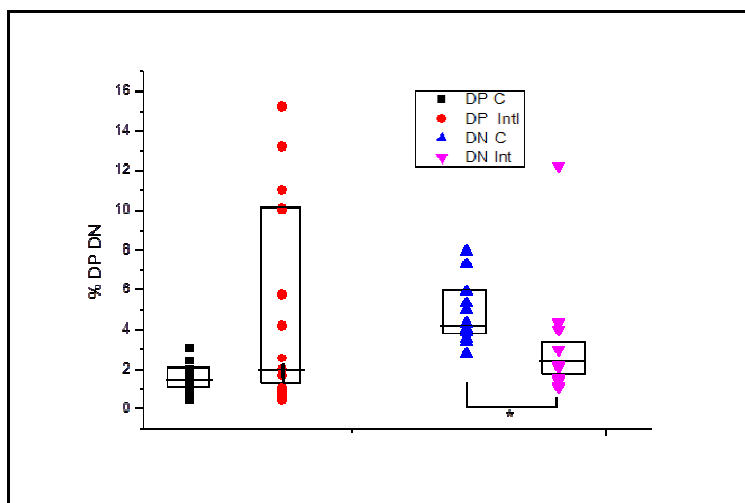


Figura 6 - Porcentaje de precursores tímicos doble positivos y dobles negativos en los grupos de pacientes con lesiones cutáneas radioinducidas y sin lesiones (grupo control).

DPc: Doble Positivo control; Dnc: Doble negativo control; DPIntl: Doble positivo pacientes intervencionismo; DNIntl: Doble negativo pacientes intervencionismo. Valores representados: Mediana y rango intercuartilo.

Los niveles de PCR se midieron en muestras de plasma de los pacientes sometidos a intervencionismo y se dividieron en 2 grupos de estudio. El Grupo: Agudos, se compuso por muestras de pacientes que presentaban lesiones agudas (o se encontraban en una crisis de reagudización al momento de la toma de la muestra); y el Grupo: Crónicos, se estableció con las muestras de los pacientes que manifestaron lesiones crónicas no reagudizadas al momento de la toma de la muestra. Como puede observarse en la figura 7, el valor medio de PCR para el Grupo Agudos fue significativamente mayor que para el Grupo Crónicos ($p < 0,05$).

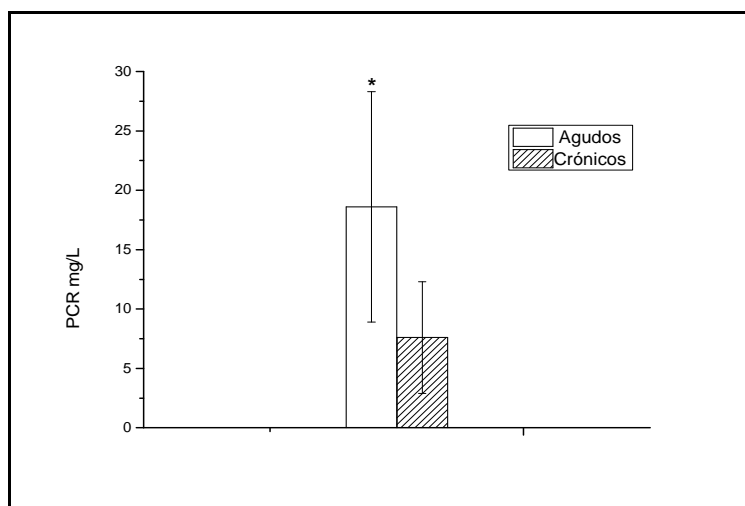


Figura 7- Niveles de Proteína C Reactiva (PCR) en plasma, expresados en mg/L. Valores representados: Media \pm DS.

3. DISCUSION

Numerosas evidencias respaldan el rol clave de las moléculas de adhesión asociadas a leucocitos y endotelio, en la disfunción vascular y daño a tejidos asociados a una amplia variedad de enfermedades inflamatorias. En el contexto del daño radioinducido donde el endotelio vascular es un blanco crítico en la respuesta tisular, cambios en la expresión de moléculas de adhesión acompañan el reclutamiento temprano de neutrófilos en el marco del proceso inflamatorio agudo y la infiltración tisular de linfocitos en las fases inflamatorias subaguda y crónica [2]. La $\beta 1$ Integrina es la principal integrina expresada por linfocitos T en reposo y linfocitos B, mientras que ICAM media la adhesión de linfocitos y monocitos, pero su expresión está regulada por células endoteliales.

Nosotros observamos una expresión significativamente aumentada de $\beta 1$ Integrina en linfocitos de los pacientes con SCR respecto de un grupo control. El análisis dentro del grupo de pacientes, mostró una mayor expresión en aquellos que presentaban lesiones de mayor gravedad, grado 3-4, respecto de aquellos con SCR grado 1-2.

La determinación de PCR, un marcador de fase inflamatoria aguda, reveló niveles plasmáticos significativamente aumentados en aquellos pacientes en etapa aguda o crónica pero en fase de reagudización respecto de aquellos pacientes con efectos crónicos.

Comparativamente, la expresión de $\beta 1$ Integrina en los pacientes con SCR grado 3-4 se mantuvo elevada aun en aquellos pacientes con efectos crónicos, revelándose como un posible parámetro de seguimiento del particular proceso inflamatorio radioinducido en los pacientes más comprometidos.

Al analizar las subpoblaciones de linfocitos T, no se encontraron cambios significativos en la relación de porcentajes de linfocitos T CD4+/ TCD8+, aunque una tendencia al decrecimiento de la misma se observó en el grupo de pacientes estudiados. Estas células derivan de precursores que migran de la médula ósea al timo donde se produce el proceso de selección y maduración, pero una pequeña fracción de precursores CD4+CD8+ (DP) y CD4-CD8- (DN) pueden encontrarse en sangre periférica. Hay evidencias que demuestran un aumento de su frecuencia en sangre en varios desórdenes inflamatorios [6].

Nuestros datos muestran patrones diferentes de estos subconjuntos linfocitarios en los pacientes respecto de una población control. Esto sugiere una perturbación en la homeostasis de los linfocitos T, aunque el rol jugado en el daño radioinducido es todavía en gran parte desconocido.

4. CONCLUSION

Los parámetros analizados en combinación con otros indicadores de inflamación, podrían ser utilizados como potenciales marcadores para el seguimiento del proceso de inflamación radioinducida, así como disponer de un mayor conocimiento radiopatológico de la respuesta de los tejidos normales en escenarios de exposición radiológica accidental, permitiendo

aportar información adicional al médico tratante para guiar el tratamiento terapéutico en forma personalizada.

5. REFERENCIAS

1. Scout, AG., Cummings, RJ., Judge, JL. et al. “ Interleukin-12 preserves the cutaneous Physical and Immunological Barrier after Radiation Exposure”, *Rad Res* **183**, 72-81 (2015).
2. François, A., Milliat, F., Guipaud, O., Benderitter, M., “Inflammation and Immunity in Radiation damage to the Gut Mucosa”, *Biomed Res Int*, **2013**, 123241 (2013).
3. UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. Effects of Ionizing Radiation, UNSCEAR 2006 Report, Vol II, Annex D. United Nations , New York (2009).
4. Guipaud, O., “Serum and Plasma Proteomics and its Possible use as Detector and Predictor of Radiation Disease”, *Adv Exp Med Biol*. **990**, 61-86 (2013).
5. Kriegstein, C.F., Granger, D.N., “Adhesion Molecules and their role in vascular disease *Am J Hyp* , **14** 445 (2001).
6. Parel, Y., Aurrand-Lions , M., Scheja, A., et al. “Presence of CD4+CD8+ double positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis.”, *Arthritis Rheum* **56**, 3459 (2007).