

31



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE CITOCINAS EN MEDULA OSEA  
DE PACIENTES CON LINFOMA NO HODGKIN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**NANCY MUÑOZ HERNANDEZ**

ASESORES: M. EN C. ERASMO MARTINEZ CORDERO  
M.I.B.B. DIANA E. AGUILAR LEON



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS

Estudio de citocinas en médula ósea de pacientes con linfoma  
no Hodgkin

que presenta la pasante: Nancy Muñoz Hernández  
con número de cuenta 9107072-2 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Marzo de 2001

PRESIDENTE Dr. Marco A. Vega López

VOCAL M. en C. Erasto Martínez Cordero

SECRETARIO Dr. Víctor M. Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Ladislao Palomar Morales

## *AGRADECIMIENTOS*

*A LOS ASESORES:*

*M. EN C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO  
M.I.B.B. DIANA E. AGUILAR LEÓN*

*QUIENES DIRIGIERON Y APORTARON SUS CONOCIMIENTOS  
Y EXPERIENCIA EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.*

*A LOS PROFESORES:*

*MARCO A. VEGA LÓPEZ  
VICTOR M. ZENDEJAS BUITRÓN  
ANGEL G. MARTÍNEZ SOSA  
LADISLAO PALOMAR MORALES*

*POR SUS VALIOSAS SUGERENCIAS EN LA REVISIÓN DE  
ESTA TESIS.*

Trabajo realizado en el Laboratorio de Biología Celular y Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología (INC).

Colaborador: Dr. Juan Labardini Méndez, INC.

## **CONTENIDO GENERAL**

	<b>PÁG.</b>
<b>I. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS</b>	<b>V</b>
<b>II. LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VI</b>
<b>III. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>IV. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
-HEMATOPOYESIS	3
-CITOCINAS Y HEMATOPOYESIS	6
-LINFOMA NO HODGKIN	14
-UTILIDAD DE LA RETROTRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) EN EL ESTUDIO DEL RNA <sub>m</sub> DE LAS CITOCINAS	15
<b>V. ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
<b>VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>18</b>
<b>VII. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>VIII. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
-OBJETIVO GENERAL	19
-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>IX. HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
<b>X. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
-GRUPOS DE ESTUDIO	20
-OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA	21
-DETECCIÓN DEL RNA <sub>m</sub> DE LAS CITOCINAS	23

	<b>PÁG.</b>
<i>EXTRACCIÓN DE RNA DE CÉLULAS TOTALES DE MÉDULA ÓSEA</i>	23
<i>SÍNTESIS DE cDNA POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)</i>	25
<i>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA CITOCINAS</i>	26
-ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
-CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA	31
<b>XI. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>XII. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>XIII. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>XIV. ANEXO 1</b>	<b>54</b>
- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	54
<i>FUNDAMENTO</i>	54
- RETROTRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	54
<i>FUNDAMENTO</i>	54
<b>XV. ANEXO 2</b>	<b>56</b>
- REACTIVOS Y SOLUCIONES	56
<b>XVI. REFERENCIAS</b>	<b>60</b>

## I. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	<b>PÁG.</b>
<b>FIGURA 1.</b> MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS. ÁRBOL HEMATOPOYÉTICO	5
<b>FIGURA 2A.</b> PRINCIPALES CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS. LINAJE MIELOIDE	9
<b>FIGURA 2B.</b> PRINCIPALES CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS LINAJE LINFOIDE	10
<b>CUADRO 1.</b> SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLÉOTIDOS ESPECÍFICOS PARA CITOCINAS Y $\beta$ -ACTINA	29
<b>CUADRO 2.</b> ESTUDIO PRELIMINAR DE LA PRESENCIA DEL RNA <sub>m</sub> DE LAS CITOCINAS EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON LNH	32
<b>CUADRO 3.</b> EXPRESIÓN DEL RNA <sub>m</sub> DE IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ Y TGF- $\beta$ EN MÉDULA ÓSEA DE INDIVIDUOS SANOS (GRUPO A)	37
<b>CUADRO 4.</b> EXPRESIÓN DEL RNA <sub>m</sub> DE IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ Y TGF- $\beta$ EN MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON LNH (GRUPO B)	38
<b>FIGURA 3.</b> GRÁFICA COMPARATIVA DE LA EXPRESIÓN DEL RNA <sub>m</sub> DE IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ Y TGF- $\beta$ ENTRE INDIVIDUOS SANOS (GRUPO A) Y PACIENTES CON LNH (GRUPO B)	42
<b>FIGURA 4.</b> CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LOS AMPLIFICADOS OBTENIDOS MEDIANTE RT-PCR	43
<b>FIGURA 5.</b> ESQUEMA DEL SISTEMA DE RT-PCR	55

## II. LISTA DE ABREVIATURAS

**A:** adenina

**BALT:** tejido linfoide asociado a bronquios

**cbp:** cuanto baste para...

**CD:** conjunto de antígenos de diferenciación (cluster of differentiation)

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementario

**C:** citosina

**CSF:** factor estimulante de colonias

**CTH:** célula totipotencial hematopoyética

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**dNTP:** dinucleótido trifosfato

**dT:** oligonucleótido de timinas

**DTT:** ditrotreitol

**EBV:** virus de Epstein Barr

**ELISA:** ensayo inmunoabsorbido ligado a Enzimas (ensayo inmunoenzimático)

**EPO:** eritropoyetina

**G:** guanina

**G-CSF:** CSF de granulocitos

**GM-CSF:** CSF de granulocitos monocitos

**HGF:** factor de crecimiento hematopoyético

**HTLV-1:** virus de la leucemia/linfoma de células T del adulto-1

**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma

**IgA:** inmunoglobulina A

**IgD:** inmunoglobulina D

**IgE:** inmunoglobulina E

**IgG:** inmunoglobulina G

**IgM:** inmunoglobulina M

**Kda:** kilodaltones

**IL:** interleucina

**LAK:** asesina activada por linfocinas

**LBu:** linfoma de Burkitt

**LIF:** factor inhibidor de leucemia

**LLA:** leucemia linfoide aguda

**LLC:** leucemia linfoide crónica

**LMA:** leucemia mieloides aguda

**LNH:** linfoma no Hodgkin

**LTc:** linfocito T citotóxico

**LTH:** linfocito T cooperador

$\mu\text{g}$ : microgramo

$\mu\text{l}$ : microlitro

**M:** molar

**MALT:** tejido linfoide asociado a mucosas

**M-CSF:** CSF de monocitos

**MiH:** microambiente inductivo hematopoyético

**MIP-1 $\alpha$ :** proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa

**MIP-1 $\beta$ :** proteína inflamatoria de macrófagos 1-beta

**ml:** mililitro

**mM:** milimolar

**MM:** mieloma múltiple

**MO:** médula ósea

**MP:** marcadores de peso molecular

**ND:** no determinado

**nm:** nanómetros

**NK:** asesina natural

**PAB:** amortiguador de fosfatos con albúmina

**pb:** pares de bases

**PBS:** amortiguador de fosfatos  
**RNA<sub>m</sub>:** ácido ribonucleico mensajero  
**RT:** retrotranscripción  
**RT-PCR:** retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa  
**SCF:** factor de la célula madre  
**SNC:** sistema nervioso central  
**SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
**SP:** sangre periférica  
**T:** timina  
**TAE:** tris-acetato-EDTA  
**TBE:** tris-borato-EDTA  
**Tc:** linfocito T citotóxico  
**TCR:** receptor de la célula T  
**TH:** linfocito T cooperador  
**TGF- $\beta$ :** factor transformante del crecimiento-beta  
**T<sub>m</sub>:** temperatura media de alineamiento  
**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral-alfa  
**UFB:** unidad formadora de brotes  
**UFC:** unidad formadora de colonias  
**UFB-E:** UFB eritroides  
**UFB-Meg:** UFB de megacariocitos  
**UFC-Bas:** UFC de basófilos  
**UFC-BI:** UFC de blastos  
**UFC-E:** UFC de eritrocitos  
**UFC-EG:** UFC de eritrocitos/granulocitos  
**UFC-EMeg:** UFC de eritrocitos/megacariocitos  
**UFC-Eos:** UFC de eosinófilos  
**UFC-G:** UFC de granulocitos  
**UFC-GEMM:** UFC de granulocitos/eritrocitos/ monocitos/megacariocitos

**UFC-GM:** UFC de granulocitos/monocitos  
**UFC-L:** UFC linfoides  
**UFC-LB:** UFC de linfocitos B  
**UFC-LGG:** UFC de linfocitos grandes granulares  
**UFC-LM:** UFC linfoide/mieloide  
**UFC-LT:** UFC de linfocitos T  
**UFC-M:** UFC de monocitos

### III. RESUMEN

La presencia de citocinas tanto estimulantes como inhibitoras en el microambiente de la médula ósea (MO) es esencial para controlar la proliferación y diferenciación de las células progenitoras y precursoras hematopoyéticas, que dan origen a las células sanguíneas funcionales

El linfoma no Hodgkin (LNH) es una neoplasia hematológica que afecta principalmente a las células linfoides B y T, las cuales pierden en mayor o menor grado su capacidad de diferenciación y escapan de los mecanismos que regulan el crecimiento celular.

Aunque se ha demostrado que algunas citocinas participan en la proliferación de las células neoplásicas en LNH y se han encontrado niveles incrementados tanto en sangre periférica (SP) como en ganglios linfáticos, se desconoce si existen anomalías en cuanto a la producción de citocinas en la MO y si éstas pueden afectar el desarrollo de los progenitores linfoides predisponiéndolos a la neoplasia.

En el presente trabajo se estudió, mediante retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la expresión del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de algunas de las principales citocinas supresoras de la hematopoyesis como interleucina-10 (IL-10), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en células totales de MO de 19 individuos clínicamente sanos pertenecientes al programa de trasplante de MO, los cuales constituyeron el grupo control, y 20 pacientes con diagnóstico oncológico definitivo de LNH correspondiente a cualquiera de sus diferentes tipos histológicos y sin tratamiento

previo. También se determinó la expresión del RNAm del factor transformante del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en 15 controles y 15 pacientes mediante la misma técnica.

Se encontró que, a diferencia del grupo control, los pacientes con LNH no presentaron el RNAm de TNF- $\alpha$  ( $p= 0.001$ ) y TGF- $\beta$  ( $p= 0.001$ ). En cambio, no se observó una diferencia significativa en la presencia del RNAm de IL-10 e IFN- $\gamma$  entre ambos grupos.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren la existencia de alteraciones en la producción del RNAm de citocinas inhibitoras en el microambiente de la MO de los pacientes con LNH, lo que podría ocasionar: a) un desarrollo anormal de los progenitores linfoides, b) un desbalance de los mecanismos hematopoyéticos que regulan el crecimiento celular y c) escape de las células anormales en la MO a la apoptosis. Todo ello puede contribuir a la transformación neoplásica de las células linfoides en LNH.

## IV. INTRODUCCIÓN

### HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis (*hemato*: sangre, *poiesis*: formación) se define como el proceso de generación de las células sanguíneas en el cual, por influencia del microambiente, una célula madre totipotencial hematopoyética (CTH) sufre una serie de cambios concatenados que inician con su autoduplicación, seguidos de diferenciación, maduración, y finalmente la producción de elementos sanguíneos funcionales (figura 1).<sup>60, 64</sup>

En el humano adulto la hematopoyesis está confinada a la médula ósea (MO) de los huesos planos como las vértebras, costillas, esternón, pelvis, clavículas, escápulas, porciones proximales extremas del húmero, fémur, cráneo y mandíbulas.<sup>60</sup>

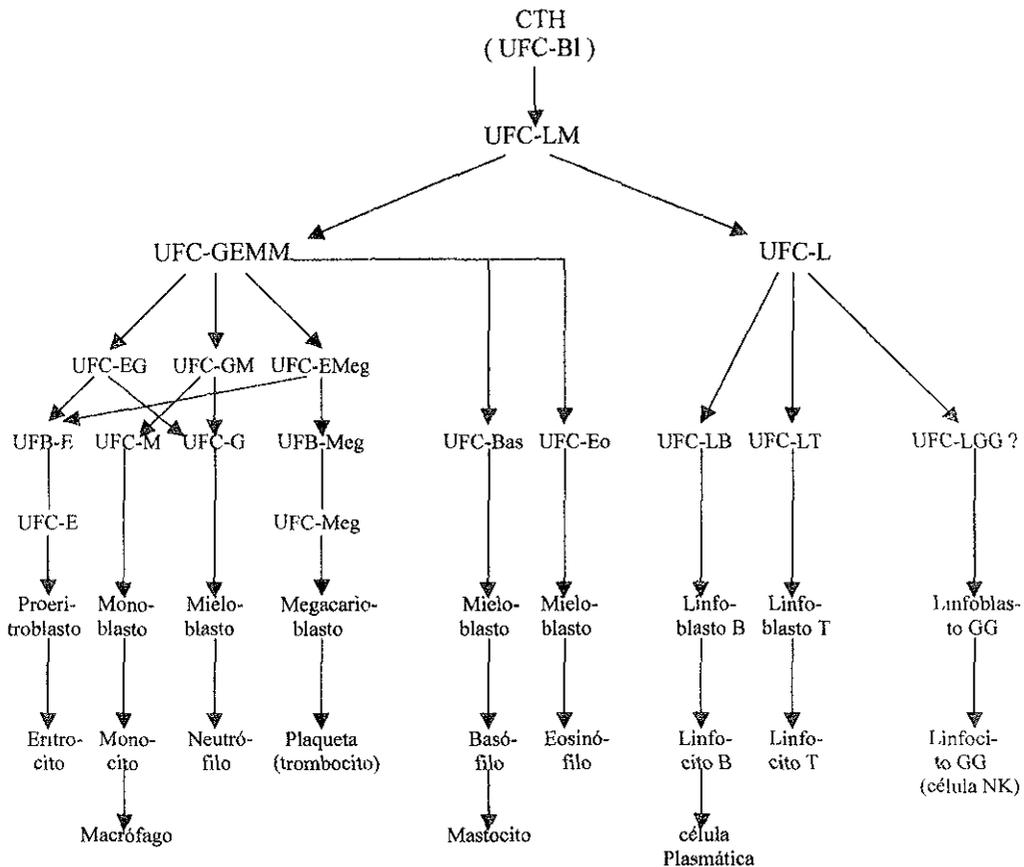
Para que la hematopoyesis se lleve a cabo de manera efectiva es necesario que exista la acción recíproca entre células madre y el estroma que, además de tener un papel de soporte, constituye el microambiente inductivo hematopoyético (MIH).

El MIH es un complejo heterogéneo de células y sus respectivos productos que mantiene y regula el crecimiento de la CTH. Consta de una estructura formada por redes de sinusoides o conductos vasculares que están separados del estroma intersinusoidal, donde ocurre la hematopoyesis, y de su luz por una delgada capa luminal de células endoteliales, una membrana basal y células reticulares adventiciales que construyen una matriz esponjiforme tridimensional al emitir prolongaciones citoplasmáticas y sintetizar fibras de reticulina formando, junto con los fibroblastos, el andamiaje para las células hematopoyéticas en vías de desarrollo.<sup>1, 4, 29, 35, 60, 63, 80</sup>

Las proteínas como colágena (tipos I, III, IV y VI), laminina, fibronectina y proteoglicanos forman parte del entramado que permite el alojamiento de la CTH y su progenie en el estroma y están involucradas en la presentación de citocinas y en la diferenciación celular.<sup>4</sup>

Las células accesorias maduras como NK (*Natural Killer*), monocitos y linfocitos B y T participan en la formación del MIH al secretar citocinas y factores de crecimiento, además de mantener interacciones célula-célula con los precursores en desarrollo.<sup>4, 64</sup>

La hematopoyesis *in vivo* está altamente compartimentalizada. La producción de células sanguíneas a partir de la célula madre ocurre dentro del estroma y su distribución no es al azar, sino que forman colonias o "nichos" de células de un linaje en particular, lo que hace suponer que los progenitores y precursores están expuestos a influencias reguladoras o microambientes con características específicas que difieren en su capacidad para promover de forma preferencial ya sea la autorrenovación de la célula madre o su compromiso diferencial en alguno de los linajes sanguíneos. Las características de cada uno de los posibles tipos de microambientes no han sido bien definidas pero indudablemente los factores de crecimiento y otras citocinas, tanto estimulantes como inhibitoras, están involucrados en este fenómeno.<sup>79, 80</sup>



CTH= célula totipotencial hematopoyética. UFC= unidad formadora de colonias. UFB= unidad formadora de brotes. BI= blastos. LM= linfoide-mieloide. GEMM= granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos. L= linfoide EG= eritrocitos, granulocitos. E= eritrocitos. M= monocitos. G= granulocitos. Meg= megacariocitos. Bas= basófilos. Eo= eosinófilos. LB= linfocitos B. LT= linfocitos T. LGG= linfocitos grandes granulares

**FIGURA 1. MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS. ÁRBOL. HEMATOPOYÉTICO**

## CITOCINAS Y HEMATOPOYESIS

La presencia de las citocinas en el microambiente de la MO es esencial para controlar los procesos de diferenciación, maduración, sobrevivencia y proliferación de las células madre y su progenie. Pueden ser endógenas o exógenas. Las primeras son producidas en el microambiente medular por células estromales y linfohematopoyéticas e incluyen varias interleucinas (IL) y factores estimulantes de colonias (CSF). Las exógenas llegan a la MO a través de la sangre arterial y provienen de células maduras (como linfocitos, monocitos y NK) que han sido activadas en otros tejidos. <sup>27, 35, 50, 57, 64, 79, 80</sup>

Aunque las citocinas forman un grupo heterogéneo de moléculas glicosiladas, comparten características y actividades biológicas, entre ellas su bajo peso molecular (menos de 80 Kda) y su actividad a concentraciones muy bajas (de  $10^{-9}$  a  $10^{-15}$  M). Pueden ser producidas por una gran variedad de células en diversos lugares del organismo, ya sea de forma constitutiva o después de la estimulación celular, y actuar sobre diferentes tipos celulares (pleiotropía). Sus efectos generalmente son locales, actúan de manera autocrina o paracrina y solo algunas, que están presentes normalmente en cantidades detectables en la sangre, tienen acciones endocrinas como el factor transformante del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), eritropoyetina (EPO), el factor de células madre (SCF) o ligando c-kit y el CSF de monocitos (M-CSF). Además pueden modular la expresión de sus propios receptores o los de otras citocinas sobre la misma célula, lo que permite establecer un mecanismo de retroalimentación positivo. Generalmente regulan más de una línea celular y muestran efecto aditivo, antagónico o sinérgico con otros factores de

crecimiento. Su unión a receptores de membrana específicos sobre las células hematopoyéticas determinan la respuesta de proliferación, maduración o muerte celular. <sup>1, 27, 36, 74, 77, 80</sup>

En la actualidad se han descrito más de 20 citocinas que actúan de forma compleja y concertada en interacciones que regulan finamente el proceso hematopoyético e incluyen: CSFs, ILs, factores de necrosis tumoral (TNFs), interferones (IFNs), TGFs, entre otras. Los CSFs y algunas ILs participan como reguladores positivos, el TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  poseen efectos predominantemente negativos. Otras como la IL-2 y la IL-4 realizan ambas funciones. Tal dualidad y la inclinación hacia la estimulación o la inhibición dependen del estado de desarrollo, maduración y diferenciación de las células blanco, además de la presencia de otros factores en el microambiente. <sup>51, 57, 80</sup>

Las citocinas que tienen acción directa sobre alguna (s) célula (s) en particular suelen agruparse como factores tipo 1 e incluyen a la IL-3 y CSF de granulocitos/monocitos (GM-CSF). Los factores tipo 2 son aquellos que sinergizan con los CSFs pero que por ellos mismos no poseen una actividad estimulante de colonias intrínseca como son IL-4, IL-5, IL-6 e IL-11. Los factores tipo 3 como la IL-1 y la IL-2 pueden regular la hematopoyesis indirectamente al inducir la liberación de CSFs por sus respectivas células productoras. <sup>30</sup>

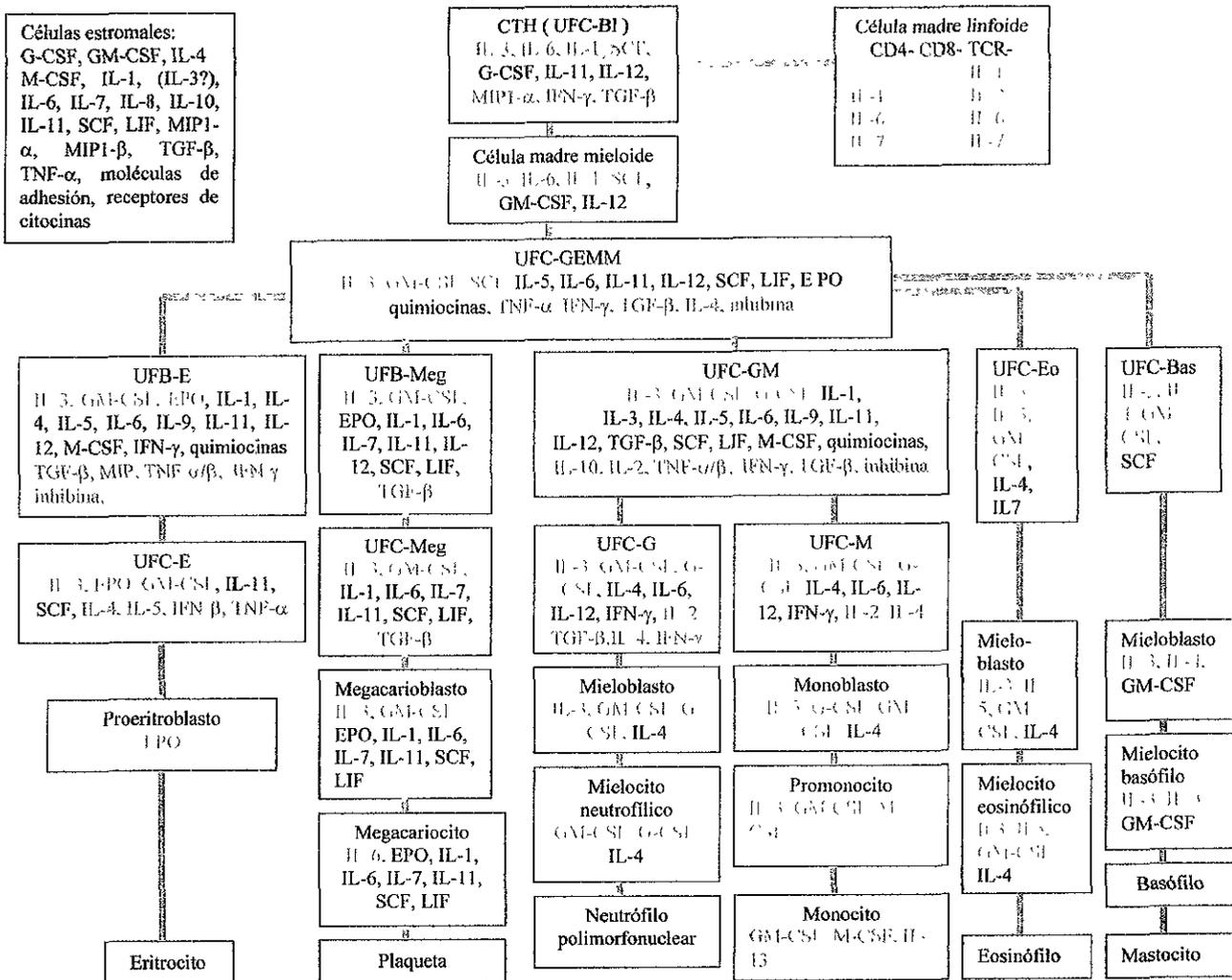
A su vez, en cada linaje celular influyen factores y citocinas clave que actúan preferentemente en los estados: temprano, intermedio o tardío de la hematopoyesis, lo que establece una jerarquía en sus funciones. <sup>46, 57, 80</sup>

Las citocinas de acción temprana tienen mayor impacto sobre progenitores potenciales multilinaje más proliferativos y se ha visto que son necesarios para la sobrevivencia y proliferación inicial, además de que pueden modular la respuesta a otros factores de crecimiento relacionados con el compromiso hacia un linaje en particular. También pueden actuar sinérgicamente y favorecer la entrada de las células madre y progenitoras al ciclo celular, estimulando su división. Como ejemplo puede mencionarse a la IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-6 y G-CSF cuyos receptores se han encontrado expresados sobre las células madre maduras y primitivas murinas, mientras que los progenitores más avanzados se unen específicamente a IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL-6 e IL-1 $\alpha$ .<sup>46, 49, 57</sup>

Los factores de acción intermedia como GM-CSF, G-CSF, IL-3 e IL-4, pueden estimular la proliferación de progenitores multipotenciales pero solamente después de que han entrado a su ciclo celular.<sup>57</sup>

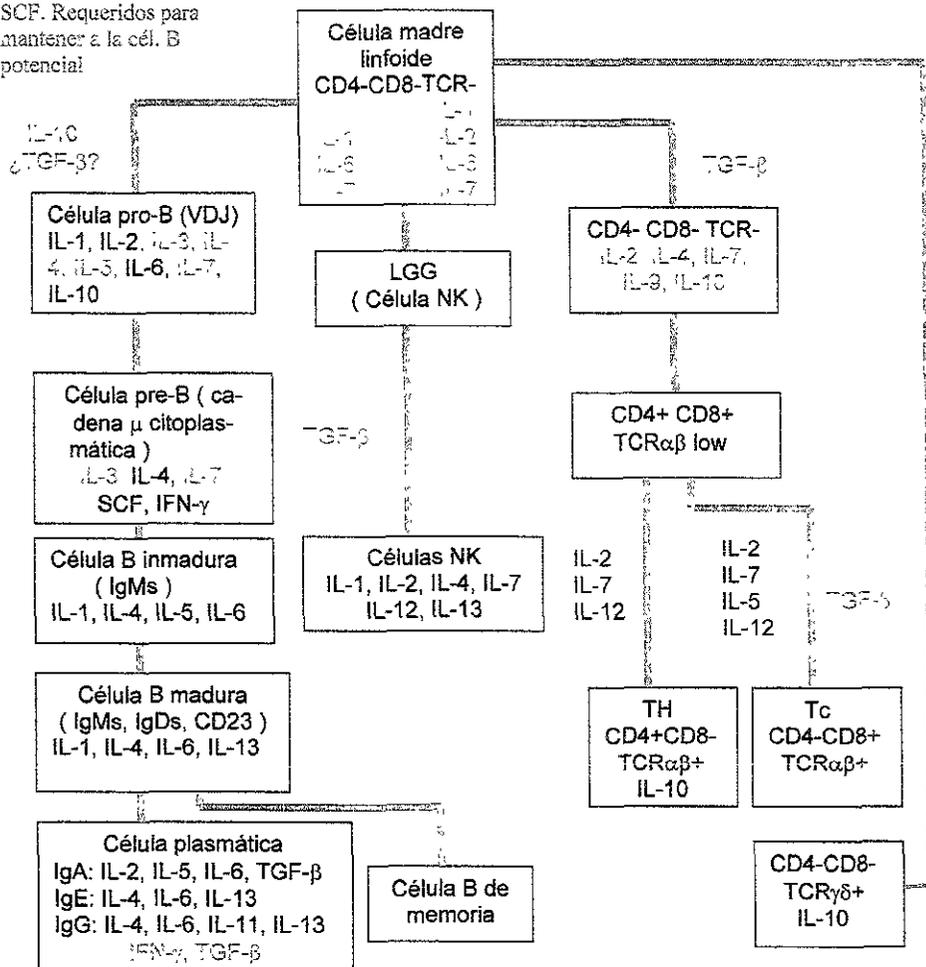
Por su parte, los factores de acción tardía actúan sobre la diferenciación terminal, expresión fenotípica y funcionalidad final de los progenitores comprometidos. Entre ellas se encuentran: EPO, IL-9, M-CSF, G-CSF e IL-5.<sup>27, 46, 61, 75</sup>

Los principales reguladores que actúan a lo largo de la ontogenia de los diferentes linajes mieloides y linfoides se presentan en la figura 2A y 2B, respectivamente.



**FIGURA 2A. PRINCIPALES CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS. LINAJE MIELOIDE**

IL-6, IL-11, IL-12, G-CSF, SCF. Requeridos para mantener a la cél. B potencial



- Factores reguladores más importantes
- Factores con actividad estimulante *in vitro*
- Factores con actividad reguladora negativa

**FIGURA 2B. PRINCIPALES CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS. LINAJE LINFOIDE**

Las figuras 2A y 2B fueron obtenidos de: Horst, I. 1995 Dictionary of cytokines. Editorial VCH Verlagsgesellschaft mbH Germany. pp 313-321

Como ya se mencionó, el estroma participa activamente en la regulación de la hematopoyesis estable al producir varias citocinas de manera constitutiva en bajas concentraciones, tal es el caso del M-CSF, SCF, proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, IL-11, IL-15, e IL-17. Otras citocinas como el G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, IL-12, IFN- $\gamma$  e inhibina parecen no estar presentes de manera constitutiva, sino que son expresadas como respuesta a un estímulo específico y forman parte de la regulación autocrina o paracrina de la hematopoyesis inducible. Algunas como la IL-2, IL-5, IL-9 e IL-12, que no han sido detectadas en MO de individuos normales, poseen la capacidad de inducir la síntesis de otros reguladores.<sup>1, 4, 17, 26, 27, 30, 53, 58</sup>

Se ha propuesto que diversos factores inhibidores pueden suprimir selectivamente la proliferación de las células hematopoyéticas e inducir la muerte celular. Dentro del grupo de las citocinas supresoras más importantes se encuentran la IL-10, el TNF- $\alpha$ , el IFN- $\gamma$  y el TGF- $\beta$ .<sup>30, 43, 51</sup>

Aunque la IL-10 posee actividades inmunoestimulantes, se ha caracterizado principalmente por ser un factor inmunosupresor. Inhibe la síntesis de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por los linfocitos T cooperadores tipo 1 (TH1). A su vez, el IFN- $\gamma$  bloquea la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por los linfocitos TH2.<sup>1, 25, 27, 30, 54, 74</sup>

La IL-10 también deprime la síntesis de citocinas inflamatorias producidas por los macrófagos como GM-CSF, CSF de granulocitos (G-CSF), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  y, por lo tanto, interfiere con el crecimiento de la UFC-GM, lo que la señala como un modulador negativo indirecto de la hematopoyesis.<sup>27, 56</sup>

Sin embargo, la IL-10 también puede inhibir directamente la proliferación de células T, la secreción de IL-2 y bloquear el crecimiento de células pro-B CD19<sup>+</sup> pero no el de las pro-B CD19<sup>-</sup>.<sup>78, 81</sup>

Por otra parte, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  parecen ser inhibidores específicos de ciertos linajes. Ambos pueden actuar sinérgicamente para suprimir el crecimiento de la UFB-E, UFC-GEMM y UFC-GM.<sup>9</sup>

No obstante, el TNF- $\alpha$  es un regulador bidireccional de la hematopoyesis, sus acciones estimulantes las lleva a cabo de manera indirecta sobre las células progenitoras muy primitivas CD34<sup>++</sup> CD38<sup>-</sup> al inducir activamente la producción de factores de crecimiento hematopoyéticos como G-CSF y GM-CSF provenientes de fibroblastos, la expresión de los receptores para IL-3 y GM-CSF e incrementar, en conjunto con la IL-3, la resistencia a los efectos inhibidores ejercidos por el TGF- $\beta$ , pero no por IFN- $\gamma$ .<sup>14, 33, 39, 72</sup>

Los efectos inhibidores de TNF- $\alpha$  ocurren de manera directa a través de sus dos receptores identificados en humanos y ratones. El receptor de 55 Kda media los efectos antiproliferativos de TNF- $\alpha$  sobre células progenitoras maduras murinas actuando a altas concentraciones y disminuyendo la expresión de receptores para CSFs que habían sido previamente estimulados por G-CSF y otros reguladores derivados de células accesorias. En contraste, la unión de TNF- $\alpha$  a su receptor de 75 Kda inhibe la proliferación de células progenitoras más inmaduras.<sup>15, 32</sup>

Por su parte, el IFN- $\gamma$  es un inhibidor selectivo de células CD34<sup>++</sup> CD38<sup>-</sup> pero no de células progenitoras más maduras CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> e incluso puede tener

efectos estimulantes en la mielopoyeisis temprana al actuar en conjunto con la IL-3 y tener nuevamente efectos negativos sobre células más maduras.<sup>14,71</sup>

Estudios recientes indican que una sobreexpresión de IFN- $\gamma$  en timo y MO provoca una reducción en las células del linaje B en ambos sitios, además de bazo y nódulos linfoides, así como un incremento en los timocitos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>.<sup>85</sup>

El TGF- $\beta$  es la citocina supresora que ha recibido mayor atención por su habilidad para ejercer efectos inhibidores directos sobre las células madre primitivas CD34<sup>++</sup> CD38<sup>-</sup> impidiendo su salida de la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, mientras que funciona como factor estimulante sobre células más maduras.<sup>4, 51, 57</sup>

Siendo el más potente supresor endógeno de la proliferación celular, el TGF- $\beta$  actúa como señal negativa autocrina en linfocitos B y T e inhibe la acción de señales positivas, principalmente las mediadas por IL-2, también suprime la expresión del receptor de IL-1 en células hematopoyéticas.<sup>30, 51, 57</sup>

El incremento en la sobrevivencia de los progenitores primitivos en respuesta a G-CSF, IL-1, IL-6 e IL-11 es fuertemente contrarrestado por el TGF- $\beta$  y la reducción en la viabilidad promovida por SCF y factor de crecimiento hematopoyético (HGF) en presencia de TGF- $\beta$  está asociada a un incremento en la apoptosis.<sup>34,73</sup>

También inhibe el crecimiento de células NK *in vivo*, la UFC-GM, la síntesis de factores estimulantes como IL-3, GM-CSF y el crecimiento celular inducido por M-CSF; en particular, afecta a la UFC-GEMM y la actividad anti-tumoral mediada por la IL-2 y células LAK.<sup>30</sup>

## LINFOMA NO HODGKIN

Los linfomas no Hodgkin (LNH) constituyen el más grande y heterogéneo grupo de neoplasias que afectan el sistema linfático e inmune. Se caracterizan por una proliferación de linfocitos malignos B o T detenidos en diversas etapas de su maduración.<sup>22, 70</sup>

A diferencia de lo que ocurre en las leucemias, caracterizadas por el predominio de precursores linfoides y mieloides inmaduros conocidos como blastos y una afectación inicial en MO, en los LNH las transformaciones neoplásicas residen primordialmente en los ganglios linfáticos superficiales y profundos, pudiendo diseminarse por vía hematógena a zonas extraganglionares donde exista tejido linfático, principalmente hígado y bazo, así como tejido linfático asociado a mucosas (MALT) en el aparato gastrointestinal (principalmente intestino delgado, estómago, anillo de Waldeyer) y tejido linfático asociado a bronquios (BALT) en el aparato respiratorio (amígdalas y pulmones).

En fases avanzadas el LNH llega incluso a infiltrar otros tejidos como MO y sistema nervioso central (SNC). En ocasiones el tumor puede inicialmente comprometer alguno de estos sitios extraganglionares, incluyendo mama y piel, y posteriormente propagarse de manera imprevisible hacia ganglios linfáticos vecinos o distantes. De lo anterior se deriva que el linfoma es la manifestación maligna del tejido linfático y puede llegarse a considerar como una enfermedad sistémica a medida que avanza y no como una enfermedad localizada que afecta solamente a los ganglios linfáticos.<sup>31, 64</sup>

Aunque el LNH es el tumor más común en pacientes con edades comprendidas entre los 20 y 40 años generalmente afecta a los que tienen más de

50 y rara vez se diagnostica durante el primer año de vida. La incidencia cada vez va en aumento, afectando primordialmente al varón. Las variaciones de frecuencia pueden depender de las características étnicas.<sup>31, 38, 70</sup>

Los LNH se clasifican, con base en la agresividad clínica, como de bajo, intermedio y alto grado de malignidad y se caracterizan por presentar poblaciones de células neoplásicas homogéneas y un patrón histológico que puede ser folicular, nodular o difuso.<sup>37</sup>

Los subtipos histopatológicos están determinados por el tipo de células que predominan, lo cual permite clasificarlos morfológicamente; más del 90% de los linfomas proceden de una población monoclonal de células B, el porcentaje restante pertenece a células T.<sup>31, 37, 38</sup>

La etiología de los LNH es desconocida, actualmente se ha visto un incremento en la frecuencia de linfomas relacionados a una deficiencia básica o desregulación del sistema inmunológico lo cual puede ser un factor importante y predisponente en la aparición del tumor.<sup>44</sup>

## UTILIDAD DE LA RETROTRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) EN EL ESTUDIO DEL RNAm DE LAS CITOCINAS

La expresión génica se refiere a un proceso biológico que se inicia desde la activación de la transcripción de un gen y concluye con la generación de una proteína madura que tiene una acción determinada y que participa en la actividad biológica, formando parte de la expresión fenotípica de la célula.<sup>7</sup>

El análisis de la expresión génica se realiza a través de la determinación de algunos de los productos de este proceso, como es la proteína, que es el producto final de la expresión, o bien el ácido ribonucleico mensajero (RNAm) que es el producto intermediario entre el gen y la proteína.<sup>7</sup>

Aunque en la mayoría de los casos existe una estrecha correlación entre la presencia del RNAm y su traducción en la proteína, la presencia del RNAm no garantiza que éste ocurra.<sup>3,7</sup>

Algunas metodologías que permiten saber si dicho proceso se ha llevado a cabo consisten en detectar y/o cuantificar la proteína de interés empleando anticuerpos específicos dirigidos contra ella. Como ejemplo puede mencionarse el ensayo inmunoenzimático conocido como ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).<sup>7</sup>

Por su parte, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ácido desoxirribonucleico (DNA) (ver anexo 1), o bien, se puede partir de un molde que contenga DNA complementario (cDNA), es decir, RNAm que ha sido previamente copiado a cDNA por la enzima transcriptasa reversa. El empleo de uno u otro molde dependerá del interés del investigador. Cuando la finalidad es amplificar el fragmento de un gen, particularmente intrones, se utiliza como sustrato el DNA extraído de los cromosomas. En cambio, cuando se pretende estudiar la expresión de un gen a través de detectar la presencia del RNAm, se parte del cDNA; en cuyo último caso la técnica se denomina retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).<sup>3,7</sup>

Como parte inicial de un proyecto de investigación más amplio, el presente trabajo tiene como finalidad conocer si el RNAm de algunas de las citocinas inhibitoras más importantes de la hematopoyesis, como IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , está presente en las células totales obtenidas de aspirados de MO de pacientes con LNH.

Dado que las células estromales de la MO producen, en condiciones fisiológicas normales, éstas y otras citocinas de manera constitutiva en bajas concentraciones, el empleo de la RT-PCR es de gran utilidad, ya que su alta sensibilidad y especificidad permiten la amplificación de bajas concentraciones de moléculas de RNAm.<sup>3,7</sup>

## V. ANTECEDENTES

En un trabajo preliminar, utilizando la técnica de RT-PCR, se estudió la presencia del RNAm de algunas citocinas con función inhibitora de la hematopoyesis como IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en la MO de 4 individuos clínicamente sanos (grupo control) y 5 pacientes con LNH sin tratamiento previo. Ninguno de los pacientes presentó el RNAm de la IL-10, a diferencia del grupo control ( $p= 0.047$ ). Se observó una ligera tendencia, aunque no estadísticamente significativa, en cuanto a la ausencia del RNAm del TNF- $\alpha$  y el de IFN- $\gamma$  en el grupo de LNH.<sup>18</sup>

Como parte inicial de un proyecto de investigación más amplio, el presente trabajo tiene como finalidad conocer si el RNAm de algunas de las citocinas inhibitoras más importantes de la hematopoyesis, como IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , está presente en las células totales obtenidas de aspirados de MO de pacientes con LNH

Dado que las células estromales de la MO producen, en condiciones fisiológicas normales, éstas y otras citocinas de manera constitutiva en bajas concentraciones, el empleo de la RT-PCR es de gran utilidad, ya que su alta sensibilidad y especificidad permiten la amplificación de bajas concentraciones de moléculas de RNAm.<sup>3,7</sup>

## **V. ANTECEDENTES**

En un trabajo preliminar, utilizando la técnica de RT-PCR, se estudió la presencia del RNAm de algunas citocinas con función inhibitora de la hematopoyesis como IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en la MO de 4 individuos clínicamente sanos (grupo control) y 5 pacientes con LNH sin tratamiento previo. Ninguno de los pacientes presentó el RNAm de la IL-10, a diferencia del grupo control ( $p= 0.047$ ). Se observó una ligera tendencia, aunque no estadísticamente significativa, en cuanto a la ausencia del RNAm del TNF- $\alpha$  y el de IFN- $\gamma$  en el grupo de LNH.<sup>18</sup>

Con el fin de ampliar esta investigación, se realizó el presente trabajo captando un mayor número de controles y pacientes en los cuales se determinó el RNAm de las mismas citocinas, incluyéndose además la del TGF- $\beta$ .

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se requiere conocer la expresión del RNAm de las citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  en MO de individuos sanos y de pacientes con LNH.

## **VII. JUSTIFICACIÓN**

El conocimiento de las complejas interacciones que se llevan a cabo entre los reguladores positivos y negativos y las células progenitoras en el microambiente de la MO, ha sido la base para explicar por qué las anomalías en la producción de citocinas observadas en algunas neoplasias hematológicas como las leucemias, favorecen la progresión de la enfermedad.

Algunos investigadores señalan que el efecto neto de la sobrevivencia y autorrenovación de las células neoplásicas puede estar relacionado con el incremento en la producción de factores estimulantes, la deficiente producción de factores inhibidores o una combinación de ambos, lo que podría alterar la hematopoyesis y conducir a la aparición de neoplasias hematológicas.

Con el fin de ampliar esta investigación, se realizó el presente trabajo captando un mayor número de controles y pacientes en los cuales se determinó el RNAm de las mismas citocinas, incluyéndose además la del TGF- $\beta$ .

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se requiere conocer la expresión del RNAm de las citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  en MO de individuos sanos y de pacientes con LNH.

## **VII. JUSTIFICACIÓN**

El conocimiento de las complejas interacciones que se llevan a cabo entre los reguladores positivos y negativos y las células progenitoras en el microambiente de la MO, ha sido la base para explicar por qué las anomalías en la producción de citocinas observadas en algunas neoplasias hematológicas como las leucemias, favorecen la progresión de la enfermedad.

Algunos investigadores señalan que el efecto neto de la sobrevivencia y autorrenovación de las células neoplásicas puede estar relacionado con el incremento en la producción de factores estimulantes, la deficiente producción de factores inhibidores o una combinación de ambos, lo que podría alterar la hematopoyesis y conducir a la aparición de neoplasias hematológicas.

Con el fin de ampliar esta investigación, se realizó el presente trabajo captando un mayor número de controles y pacientes en los cuales se determinó el RNAm de las mismas citocinas, incluyéndose además la del TGF- $\beta$ .

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se requiere conocer la expresión del RNAm de las citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  en MO de individuos sanos y de pacientes con LNH.

## **VII. JUSTIFICACIÓN**

El conocimiento de las complejas interacciones que se llevan a cabo entre los reguladores positivos y negativos y las células progenitoras en el microambiente de la MO, ha sido la base para explicar por qué las anomalías en la producción de citocinas observadas en algunas neoplasias hematológicas como las leucemias, favorecen la progresión de la enfermedad.

Algunos investigadores señalan que el efecto neto de la supervivencia y autorrenovación de las células neoplásicas puede estar relacionado con el incremento en la producción de factores estimulantes, la deficiente producción de factores inhibidores o una combinación de ambos, lo que podría alterar la hematopoyesis y conducir a la aparición de neoplasias hematológicas.

En el LNH se desconoce si existen alteraciones en la producción de citocinas supresoras que controlan directa o indirectamente el crecimiento y funciones de los progenitores hematopoyéticos en la MO y si éstas afectan el desarrollo temprano de las células linfáticas B y T predisponiéndolas a la neoplasia.

Por lo anterior, se propuso determinar la presencia del RNAm de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  mediante RT-PCR en pacientes con LNH. Los resultados obtenidos pueden contribuir a la comprensión de algunos de los mecanismos que podrían estar involucrados en la patogenia de esta enfermedad y apoyar estudios subsecuentes en el campo de las neoplasias hematológicas.

## **VIII. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la presencia del RNAm de algunas de las principales citocinas inhibitoras en la MO de pacientes con LNH mediante un método de alta sensibilidad y especificidad como la RT-PCR.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar la expresión del RNAm de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , y TGF- $\beta$  en células totales de MO de individuos sanos (grupo control) y pacientes con LNH mediante RT-PCR.

En el LNH se desconoce si existen alteraciones en la producción de citocinas supresoras que controlan directa o indirectamente el crecimiento y funciones de los progenitores hematopoyéticos en la MO y si éstas afectan el desarrollo temprano de las células linfáticas B y T predisponiéndolas a la neoplasia.

Por lo anterior, se propuso determinar la presencia del RNAm de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  mediante RT-PCR en pacientes con LNH. Los resultados obtenidos pueden contribuir a la comprensión de algunos de los mecanismos que podrían estar involucrados en la patogenia de esta enfermedad y apoyar estudios subsecuentes en el campo de las neoplasias hematológicas.

## **VIII. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la presencia del RNAm de algunas de las principales citocinas inhibidoras en la MO de pacientes con LNH mediante un método de alta sensibilidad y especificidad como la RT-PCR.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar la expresión del RNAm de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , y TGF- $\beta$  en células totales de MO de individuos sanos (grupo control) y pacientes con LNH mediante RT-PCR.

2. Realizar un análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de pacientes con LNH en cuanto a la presencia del RNAm de estas citocinas

## **IX. HIPÓTESIS**

En los pacientes con LNH pueden existir cambios en la expresión del RNAm de las citocinas en la MO en comparación con individuos sanos.

## **X. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **GRUPOS DE ESTUDIO**

Para el estudio se incluyeron los siguientes grupos:

Grupo A (grupo control): 19 individuos clínicamente sanos (10 hombres y 9 mujeres) pertenecientes al programa de trasplante de MO del Centro Médico La Raza, que no recibieron factores estimulantes para la producción de células hematopoyéticas antes del aspirado.

Grupo B: 20 pacientes (10 mujeres y 10 hombres), seleccionados por el hematólogo, con diagnóstico oncológico definitivo de LNH correspondientes a cualquiera de sus diferentes tipos histológicos y sin tratamiento previo. Los pacientes fueron estudiados por el Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología (INC) y su diagnóstico se confirmó mediante estudios clínicos, de laboratorio y de gabinete.

2. Realizar un análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de pacientes con LNH en cuanto a la presencia del RNAm de estas citocinas.

## **IX. HIPÓTESIS**

En los pacientes con LNH pueden existir cambios en la expresión del RNAm de las citocinas en la MO en comparación con individuos sanos.

## **X. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **GRUPOS DE ESTUDIO**

Para el estudio se incluyeron los siguientes grupos:

Grupo A (grupo control): 19 individuos clínicamente sanos (10 hombres y 9 mujeres) pertenecientes al programa de trasplante de MO del Centro Médico La Raza, que no recibieron factores estimulantes para la producción de células hematopoyéticas antes del aspirado.

Grupo B: 20 pacientes (10 mujeres y 10 hombres), seleccionados por el hematólogo, con diagnóstico oncológico definitivo de LNH correspondientes a cualquiera de sus diferentes tipos histológicos y sin tratamiento previo. Los pacientes fueron estudiados por el Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología (INC) y su diagnóstico se confirmó mediante estudios clínicos, de laboratorio y de gabinete.

2. Realizar un análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de pacientes con LNH en cuanto a la presencia del RNAm de estas citocinas.

20

## **IX. HIPÓTESIS**

En los pacientes con LNH pueden existir cambios en la expresión del RNAm de las citocinas en la MO en comparación con individuos sanos.

## **X. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **GRUPOS DE ESTUDIO**

Para el estudio se incluyeron los siguientes grupos:

Grupo A (grupo control): 19 individuos clínicamente sanos (10 hombres y 9 mujeres) pertenecientes al programa de trasplante de MO del Centro Médico La Raza, que no recibieron factores estimulantes para la producción de células hematopoyéticas antes del aspirado.

Grupo B: 20 pacientes (10 mujeres y 10 hombres), seleccionados por el hematólogo, con diagnóstico oncológico definitivo de LNH correspondientes a cualquiera de sus diferentes tipos histológicos y sin tratamiento previo. Los pacientes fueron estudiados por el Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología (INC) y su diagnóstico se confirmó mediante estudios clínicos, de laboratorio y de gabinete.

Tanto a los individuos sanos como a los pacientes con LNH se les solicitó su consentimiento para la donación de las muestras de MO y su inclusión en el protocolo, siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki.<sup>83</sup>

## OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA

Se obtuvo un aspirado de MO de cada uno de los individuos sanos y de los pacientes con LNH mediante una punción de la cresta ilíaca bajo condiciones de esterilidad.

Las muestras se transportaron en hielo desde el lugar de la toma hasta el Laboratorio de Biología Celular y Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en donde fueron procesadas, siempre bajo condiciones de esterilidad.

El aspirado de MO se vertió en un tubo cónico estéril de polipropileno de 50 ml y se centrifugó a 504 x g a 4°C durante 5 minutos (BECKMAN GS-GR). El botón celular se resuspendió y lavó con solución amortiguadora de fosfatos con albúmina al 0.5% (PAB) estéril a pH 7.35. Se centrifugó a 504 x g a 4°C durante 5 minutos.

El sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió suavemente; se agregó solución hipotónica estéril con cloruro de amonio (solución de lisis) a pH de 7.4 para eliminar los eritrocitos de la muestra. Se agitó en el vórtex por 5 segundos e incubó por 10 minutos a 4°C. Se centrifugó a 504 x g a 4°C durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió y se lavó con PAB estéril. Se mezcló suavemente y se centrifugó a 504 x g a 4°C durante 5 minutos.

Después de eliminar el sobrenadante, el botón se resuspendió ligeramente y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril a pH de 7.35. Se mezcló suavemente y se centrifugó a 504 x g a 4°C durante 5 minutos.

Las células totales así obtenidas se resuspendieron en el volumen necesario de PBS estéril y se homogeneizaron perfectamente.

Posteriormente se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer (MARLENFIELD, GERMANY) empleando un colorante de exclusión vital. Para ello se tomaron 20 µl de la suspensión celular y se mezclaron con 20 µl de azul tripano estéril a una concentración de 0.02%. Se tomó el volumen necesario para llenar la cámara de Neubauer y se observó en un microscopio óptico (CARL ZEISS) con el objetivo de 10x. El conteo celular se realizó en los 4 cuadrantes grandes de las esquinas indicados para leucocitos o glóbulos blancos.

Para calcular el número de células por ml se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\text{No. de cél. contadas} / \text{No. de cuadrantes}) \times \text{Factor} = \text{No. de células} \times 10^4 / \text{ml dilución}$$

La viabilidad celular se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{No. de células vivas en los cuadrantes contados} \times 100}{\text{No. total de células en los cuadrantes contados}}$$

Aquellas muestras que presentaron una viabilidad celular menor al 80% fueron eliminadas del estudio.

Se hizo un ajuste a  $1 \times 10^6$  células totales para extraer el RNA. Cuando estas células no fueron procesadas enseguida se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$  (REVCO) hasta utilizarlas.

## DETECCIÓN DEL RNAm DE LAS CITOCINAS

### *EXTRACCIÓN DE RNA DE CÉLULAS TOTALES DE MÉDULA ÓSEA*

La extracción de RNA a partir de las células totales de la MO se realizó mediante el método de isotiocianato de guanidina empleando el reactivo de Trizol (GIBCO-BRL), el cual permite romper las células e inactivar las ribonucleasas simultáneamente.<sup>16, 47, 67, 89</sup>

Para ello se adicionó 1 ml de Trizol por cada  $1 \times 10^6$  células. El paquete celular se resuspendió y homogeneizó pipeteando varias veces para disgregarlo completamente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Por cada ml de Trizol se adicionaron 0.2 ml de cloroformo (MERCK) enfriado previamente a 4°C. La mezcla se agitó de forma vigorosa y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a  $20,000 \times g$  a 4°C durante 15 minutos (microcentrífuga EPPENDORF 5417R).

Después de la centrifugación la mezcla se separó en una fase orgánica cloroformo-fenol inferior de color rojo, la cual contenía al DNA y las proteínas, una interfase y una fase acuosa superior incolora que contiene el RNA. Esta última se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y estéril de 1.5 ml.

El RNA se precipitó de la fase acuosa adicionando un volumen de alcohol isopropílico (MERCK) enfriado previamente a 4°C. Se adicionó también 1  $\mu$ l de glicógeno (grado Biología Molecular, BOHERINGER). Se mezcló suavemente por inversión e incubó a  $-20^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y se centrifugó a  $20,000 \times g$  a 4°C durante 10 minutos. El RNA precipitado formó un botón blanco unido firmemente a las paredes o al fondo del tubo eppendorf. El sobrenadante se retiró y el botón de RNA se resuspendió suavemente en etanol (MERCK) al 75% (v/v) enfriado previamente a 4°C. Se centrifugó a  $20,000 \times g$  a 4°C durante 10 minutos. El

sobrenadante se retiró y el botón se secó con un sistema de condensación (SAVANT). Posteriormente se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de agua tratada con dietil pirocarbonato (SIGMA CHEMICAL Co) al 0.1%, estéril (agua-DEPC) y se incubó a 70°C por 10 minutos para linearizar el RNA.

Para cuantificar la concentración del RNA total se disolvió 1  $\mu\text{l}$  de la suspensión en 1 ml de agua destilada y se determinaron las lecturas mediante un equipo comercial (GENE QUANT, Pharmacia Biotech) a las absorbancias de 260 y 280 nanómetros (nm), pudiéndose obtener así la pureza y concentración del RNA como sigue:

Pureza= Absorbancia a 260 nm / Absorbancia a 280 nm. Óptima  $\geq 1.5$

Concentración de RNA total: (Absorbancia a 260 nm) X (40)=  $\mu\text{g}$  de RNA/ $\mu\text{l}$

Se procedió a verificar la integridad del RNA constitutivo (subunidades 18s y 28s) a través de un gel de agarosa (Ultrapura grado electroforesis, GIBCO-BRL) al 1% (p/v). Para ello se homogeneizaron 5  $\mu\text{l}$  de RNA total con 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador de carga a pH de 8.0. El gel se corrió en una cámara horizontal submarina (HE 33, HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS) con amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE 1X) a pH de 8.0 y a 100 volts durante 45 minutos.

Al terminar este tiempo, las bandas de RNA se revelaron mediante una tinción con bromuro de etidio (SIGMA CHEMICAL, Co) a una concentración de 0.001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 5 minutos y se analizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Mighty Bright, HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS). La presencia de las bandas 18s y 28s bien definidas indicó un RNA íntegro. Se tomó una impresión

fotográfica del gel con una cámara Polaroid DS 34 y se procedió a sintetizar el cDNA.

### *SÍNTESIS DE cDNA POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)*

Para sintetizar el cDNA a partir del RNA extraído se realizó el procedimiento con la enzima transcriptasa reversa.<sup>47</sup>

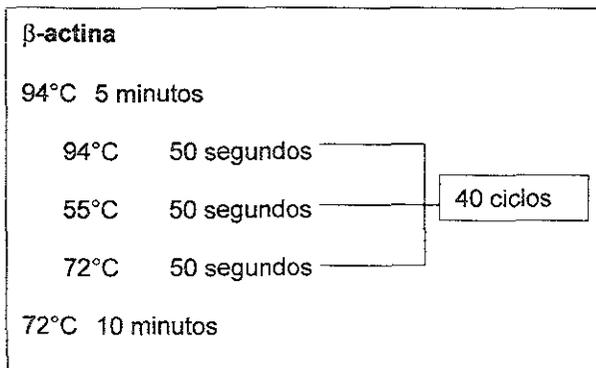
En un tubo eppendorf nuevo y estéril de 0.5 ml se mezclaron 5 µg de RNA total, 0.5 µg de oligonucleótido de timinas [Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (GIBCO-BRL)] y agua-DEPC estéril cuanto baste para (cbp) 12 µl. La mezcla se incubó a 70°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionó lo siguiente: amortiguador first strand 1X [ Tris-HCl 250 mM, (pH de 8.3), KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM] (GIBCO-BRL), ditroitreitol (DTT) 0.01 M (GIBCO-BRL) y dNTP 0.5 mM. Todo ésto a concentración final en un volumen total de 20 µl. Se mezcló e incubó a 42°C por 2 minutos. Se agregaron 200 Unidades (U) de la enzima transcriptasa inversa Super Script II (GIBCO-BRL). Se mezcló brevemente y se incubó a 42° C durante 50 minutos. Para detener la actividad de la enzima, se incubó la mezcla a 70°C durante 15 minutos y se colocó inmediatamente a 4°C.

Una vez obtenido el cDNA, el RNA restante se eliminó adicionando 1 U de RNasa H (GIBCO-BRL) e incubando a 37°C durante 20 minutos. El cDNA sintetizado se almacenó a -70°C hasta su empleo para el PCR. Todas las incubaciones necesarias para sintetizar el cDNA se realizaron en un termociclador (PERKIN ELMER) programado con las temperaturas requeridas.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA CITOCINAS

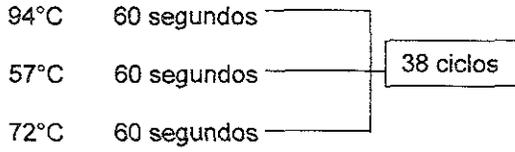
Se realizó la determinación de las citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  y el gen constitutivo de  $\beta$ -actina empleado como control interno de la síntesis del cDNA y de la reacción de PCR. Este paso se efectuó a partir del cDNA obtenido por RT y se amplificó mediante PCR.<sup>47</sup>

En un tubo eppendorf nuevo y estéril de 0.2 ml se mezclaron los siguientes reactivos: amortiguador de PCR 1X [Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM] (GIBCO-BRL), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (GIBCO-BRL), dinucleótidos trifosfato (dNTPs) 0.6 mM (GIBCO-BRL), oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada una de las citocinas y  $\beta$ -actina (cuadro 1), todos a una concentración de 3 mM, 2  $\mu$ l de cDNA blanco, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (GIBCO-BRL); todo esto a concentración final, así como agua-DEPC estéril cbp 25  $\mu$ l. Una vez mezclado se adicionaron 25  $\mu$ l de aceite mineral (SIGMA). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MINICYCLER MJ RESEARCH). El equipo se programó de la siguiente forma:



**IL-10**

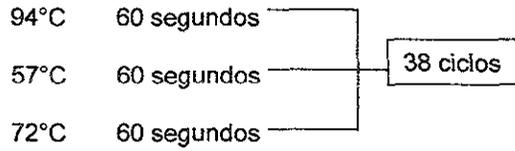
94°C 7 minutos



72°C 7 minutos

**TNF- $\alpha$**

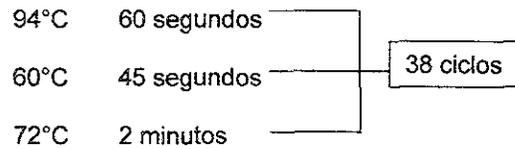
94°C 7 minutos



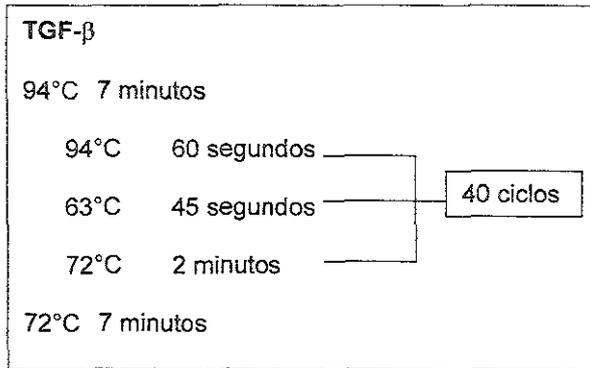
72°C 7 minutos

**IFN- $\gamma$**

94°C 7 minutos



72°C 7 minutos



Para obtener las condiciones óptimas de la temperatura media de alineamiento ( $T_m$ ) para cada par de oligonucleótidos se empleó la siguiente fórmula:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (T + A) + 4 (G + C)$$

Cada experimento incluyó un control positivo (PCR con cDNA de cada citocina) y uno negativo (reactivos de PCR sin cDNA).

Para valorar la presencia del fragmento amplificado, se realizó un gel de acrilamida al 12%. Ésto se hizo mezclando 5  $\mu\text{l}$  del producto con 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador de carga y como referencia se empleó 1  $\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular (MP) [100 pares de bases (pb), 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , GIBCO-BRL]. El corrimiento se llevó a cabo con el amortiguador de Tris-Boratos-EDTA 1X (TBE 1X) a pH de 8.0, manteniendo un voltaje constante de 100 volts durante 2 horas, en una cámara vertical (BIO-RAD Mini-Protean II).

Una vez transcurrido el tiempo, la presencia de bandas se manifestó mediante tinción con sales de plata (KIT de BIO-RAD). El gel fue analizado con un programa de computadora (Kodak).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el RT-PCR y el tamaño del producto de amplificación se describen en el cuadro 1.

**CUADRO 1. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA CITOCINAS Y  $\beta$ -ACTINA**

Citocinas y $\beta$ -Actina	Secuencia Sentido	Secuencia antisentido	Tamaño del producto amplificado
IL-10	5'AAATTTGGTTCTAGGCCGGG3'	5'GAGTACAGGGGCATGATATC3'	263 pb
TNF- $\alpha$	5'ACAAGCCTGTAGCCCATGTT3'	5'AAAGTAGACCTGCCCAGACT3'	427 pb
IFN- $\gamma$	5'GCAGAGCCAAATTGTCTCCT3'	5'ATGCTCTTCGACCTCGAAAC3'	290 pb
TGF- $\beta$	5'CCAGTGGACATCAACGGGTT3'	5'GCAGGAGCGCACGATCATGT3'	300 pb
$\beta$ -ACTINA	5'GGTCTCAAACATGATCTGGG3'	5'GGGTCAGAAGGATTCTATG3'	245 pb

El diseño de los oligonucleótidos sentido y antisentido fue realizado con base en la secuencia completa de su cDNA obtenida del Gene Bank, cuya dirección en internet es:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/quit/cleotide & list\\_uids 002049058dopt=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/quit/cleotide&list_uids=002049058dopt=)

Gene Bank

Con la ayuda de un programa de computadora se localizaron dos secuencias (sentido y antisentido) de 20 nucleótidos que no se encontraran en ningún otro cDNA y que no fueran complementarias entre sí o consigo mismas,

para evitar la formación de estructuras secundarias y de dímeros de oligonucleótidos.

El tamaño del fragmento flanqueado por los oligonucleótidos no debe ser mayor de 3000 pb para no exceder la capacidad de la polimerasa para la extensión.

Cabe mencionar que además del empleo de oligonucleótidos sentido y antisentido para cada una de las citocinas estudiadas, existen otras técnicas que aseguran la especificidad del producto amplificado a través de la caracterización y análisis fino de las bandas, como es la hibridación con sondas específicas marcadas, la secuenciación nucleotídica y el uso de enzimas de restricción que reconocen y cortan sitios con una determinada secuencia en el DNA, seguido por la electroforesis en gel.

Todas las condiciones de reacción empleadas en este estudio para la detección del RNAm de las citocinas por RT-PCR fueron previamente estandarizadas y la calidad y funcionamiento de las soluciones, reactivos, enzimas y oligonucleótidos fue también comprobada antes de realizar el ensayo.

En el Anexo 1 se mencionan los fundamentos de las técnicas. En el Anexo 2 se anotan con detalle todos los reactivos y soluciones empleadas en la metodología.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba no paramétrica exacta de Fisher tomando en cuenta un  $\alpha$  igual o menor a 0.05 como valor significativo.<sup>68</sup>

## CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para calcular el tamaño de la muestra en la fase inicial de esta investigación se tomaron como base los resultados que se obtuvieron en el trabajo preliminar (cuadro 2 ) y se aplicó la siguiente fórmula:<sup>19</sup>

$$n = \left[ \frac{ \{ Z_{\alpha} \sqrt{2\pi c (1 - \pi c)} - Z_{\beta} \sqrt{\pi p (1 - \pi p) + \pi c (1 - \pi c)} \} }{ \{ \pi p - \pi c \} } \right]^2$$

donde:

$n$  = número necesario de individuos en cada grupo (A y B).

$Z_{\alpha}$  = 1.96, es el valor de Z de dos colas relacionado con la hipótesis nula. Este valor se obtiene de una tabla de áreas bajo la curva normal.

$Z_{\beta}$  = valor de la cola inferior relacionado con la hipótesis alternativa. Este valor se define por el investigador antes de la prueba. Para una  $Z_{\beta}$  de 0.90 el valor de la cola inferior es de -1.28

$\pi c$  = proporción en el grupo control de individuos sanos que expresan el RNAm de una determinada citocina.

$\pi p$  = proporción en el grupo de pacientes con LNH (grupo problema) que expresan el RNAm de una determinada citocina.

**CUADRO 2. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA PRESENCIA DEL RNAm DE LAS CITOCINAS EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON LNH**

	CITOCINAS		
	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
<b>Individuos sanos (Grupo I) (n= 4)</b>	3 / 4	2 / 4	3 / 4
<b>Pacientes con LNH (Grupo II) (n= 5)</b>	0 / 5	0 / 5	1 / 5
<b>Valor de p *</b>	0.047	NS	NS

\* Prueba exacta de Fisher. NS= No significativo

## XI. RESULTADOS

En un experimento preliminar se determinó de manera cualitativa, mediante la técnica de RT-PCR, la expresión del RNAm de IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células totales de MO. <sup>18</sup>

Los individuos que fueron sometidos al estudio se dividieron en dos grupos:

Grupo I (grupo control): 4 individuos clínicamente sanos del programa de trasplante de MO.

Grupo II: 5 pacientes con LNH sin tratamiento previo.

Los resultados que se obtuvieron (cuadro 2) sugirieron la presencia de alteraciones en la expresión del RNAm de las citocinas con actividad reguladora negativa de la hematopoyesis en la MO de los pacientes con LNH.

Por lo anterior, se decidió realizar una segunda fase del trabajo calculando previamente el tamaño de la muestra con lo cual fuera posible confirmar si existían o no tales anomalías.

A partir de los resultados del estudio preliminar se obtuvieron las proporciones, tanto del grupo control ( $\pi_c$ ) como del grupo de pacientes con LNH ( $\pi_p$ ), que expresaron el RNAm de una determinada citocina. De esta manera, empleando una  $Z_{\alpha} = 1.96$ ,  $Z_{\beta} = -1.28$  y  $\alpha = 0.05$  se obtuvo que el número de individuos mínimo necesario en ambos grupos (I y II) para obtener una mayor validez estadística fue: IL-10= 6, TNF- $\alpha$ = 17 e IFN- $\gamma$ = 13.

Para realizar el presente estudio, a los 4 individuos sanos que ya se tenían se sumaron 15 más formando el grupo A (n= 19) y 15 pacientes con LNH sin tratamiento previo se sumaron a los 5 anteriores para constituir el grupo B (n= 20).

De esta manera se trató de abarcar el número de muestras necesarias para cada citocina.

Los nuevos integrantes de cada grupo fueron sometidos a la detección del RNAm de las citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en este ensayo, en donde además se adicionó la determinación del RNAm de TGF- $\beta$ .

La edad de los individuos control osciló entre los 27 y 66 años con un promedio de 57.78 años. La edad de los pacientes se encontró entre los 17 y los 85 años con un promedio de 53.5 años.

Los resultados de las citocinas fueron obtenidos usando un estándar de 38 y 40 ciclos de PCR.

Todas las muestras sometidas al estudio, tanto del grupo A como del grupo B fueron positivas para  $\beta$ -actina, lo cual nos permitió comprobar que la síntesis de cDNA y la reacción de PCR fueron adecuadas.

Los resultados de la expresión individual del RNAm de cada una de las citocinas en los individuos sanos se muestran en el cuadro 3 y en los pacientes con LNH en el cuadro 4.

Al analizar la expresión del RNAm de las citocinas por grupo se encontró lo siguiente:

Grupo A:

\* El promedio de edad de las mujeres sanas (n=9) fue de 54.4 años y el de los hombres (n=10) de 51.3 años.

\* No se presentaron variaciones importantes en la presencia individual del RNAm de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  en el grupo control (58, 42, 37 y 53% de los casos respectivamente) (cuadro 3), datos que indican que la presencia del RNAm de estos reguladores en la MO de los individuos sanos se encuentra relativamente en equilibrio.

\* La presencia simultánea del RNAm de 2 o más citocinas fue detectada en el 63% de los individuos sanos.

\* Las diferencias en la expresión del RNAm en los individuos control relacionadas con la edad o el sexo no fueron estadísticamente significativas.

Grupo B:

\* El promedio de edad de los pacientes del sexo femenino (n=10) fue de 56.3 años y del sexo masculino (n=10) de 50.7 años

\* La expresión individual del RNAm de TNF- $\alpha$  (n= 20) y de TGF- $\beta$  (n= 15) fue negativa en el 100% de los pacientes, en ambos casos (cuadro 4).

\* De los 20 pacientes, el 55% presentó el RNAm de IL-10 y el 30% el de IFN- $\gamma$ . Solo el 15% presentó ambos RNAm.

\* La expresión del RNAm de más de 2 citocinas no ocurrió en ninguno de los casos.

\* Las diferencias en la expresión del RNAm de las citocinas relacionadas con la edad o el sexo no fueron estadísticamente significativas.

\* Se observa una ligera tendencia, no significativa ( $p=NS$ ), en los pacientes del sexo femenino a no presentar el RNAm de IFN- $\gamma$  en comparación con el sexo masculino, lo cual podría deberse a que el promedio de edad de ellas es mayor que el de los hombres (5.6 años). Este fenómeno no ocurre en el grupo control donde también el promedio de edad de las mujeres es 3.1 años más que el de los varones

**CUADRO 3. EXPRESIÓN DEL RNAm DE IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  Y TGF- $\beta$  EN MÉDULA ÓSEA DE INDIVIDUOS SANOS (GRUPO A)**

Control No.	Sexo F: Fem. M: Masc.	Edad (años)	$\beta$ -actina	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
1	M	63	+	+	+	-	+
2	F	48	+	-	+	-	+
3	F	52	+	-	+	-	+
4	F	66	+	+	+	+	+
5	M	44	+	-	+	+	+
6	M	36	+	-	-	-	-
7	M	59	+	-	-	-	-
8	M	58	+	+	-	+	+
9	F	63	+	-	-	-	-
10	F	55	+	+	+	+	-
11	F	39	+	+	-	-	+
12	M	65	+	+	-	-	-
13	M	49	+	+	-	-	+
14	F	47	+	+	-	-	-
15	M	59	+	-	-	-	-
16 ✓	F	64	+	-	-	+	ND
17 ✓	M	27	+	+	+	+	ND
18 ✓	M	53	+	+	-	+	ND
19 ✓	F	56	+	+	+	-	ND
Total			19 / 19	11 / 19	8 / 19	7 / 19	8 / 15
<b>Positivos (%)</b>			<b>100</b>	<b>58</b>	<b>42</b>	<b>37</b>	<b>53</b>

ND: No determinado

Presencia de 2 o más citocinas= 12/19 (63%)

(✓) individuos sanos del estudio preliminar

**CUADRO 4. EXPRESIÓN DEL RNAm DE IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  Y TGF- $\beta$  EN MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON LNH (GRUPO B)**

Paciente No.	Sexo F:Fem. M:Masc.	Edad (años)	Diagnóstico Histológico	$\beta$ -actina	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
1	F	76	LNH difuso de células grandes inmunofenotipo T	+	+	-	-	-
2 *	M	54	LNH difuso folicular de células pequeñas	+	-	-	+	ND
3 *	F	29	LNH difuso de células grandes inmunofenotipo T	+	-	-	-	ND
4	M	38	LNH difuso de células pequeñas inmunofenotipo B	+	+	-	-	-
5	M	45	LNH en cuerpo gástrico	+	+	-	+	-
6	F	60	LNH cutáneo de células T ( micosis fungoide )	+	-	-	-	-
7	M	36	LNH difuso de células grandes	+	+	-	-	-
8	M	49	LNH de células grandes inmunofenotipo B	+	+	-	-	-
9 *	F	36	LNH angiocéntrico	+	-	-	-	ND
10	F	85	LNH difuso de células pequeñas inmunofenotipo B	+	+	-	+	-
11	M	52	LNH de células grandes tipo sarcoma inmunoblástico	+	-	-	-	-
12	F	66	LNH difuso de células grandes intestinal difuso no inmunoblástico	+	+	-	-	-

Paciente No.	Sexo F:Fem. M:Masc.	Edad (años)	Diagnóstico Histológico	$\beta$ -actina	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	TGF- $\beta$
13	M	73	LNH difuso de células grandes inmunofenotipo B	+	+	-	-	-
14 *	F	58	LNH inmunoblástico	+	-	-	-	ND
15	F	37	LNH difuso de células grandes inmunofenotipo B	+	+	-	-	-
16	F	57	LNH difuso de células grandes y pequeñas hendidas, angiocéntrico	+	+	-	-	-
17	M	17	LNH de células grandes inmunofenotipo T, tipo sarcoma inmunoblástico	+	-	-	+	-
18	M	69	LNH no clasificable	+	-	-	+	-
19 *	F	59	LNH folicular de células pequeñas	+	-	-	-	ND
20	M	74	LNH cutáneo difuso de células grandes inmunofenotipo T	+	+	-	+	-
Total				20 / 20	11 / 20	0 / 20	6 / 20	0 / 15
<b>Positivos (%)</b>				<b>100</b>	<b>55</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>0</b>

ND: No determinado

Presencia de 2 o más citocinas= 3 / 10 (15%)

(\* )= Pacientes del estudio preliminar

Al realizar el análisis comparativo de la expresión individual del RNAm de cada una de las citocinas entre los grupos A y B se encontró lo siguiente:

El RNAm de TNF- $\alpha$  no se detectó en ninguno de los casos del grupo B (0%) (cuadro 4) pero sí en 8 de los 19 individuos control (42%) (cuadro 3), lo que señala una importante diferencia entre ambos grupos. Además, esta diferencia resultó estadísticamente significativa tomando en cuenta tanto los 19 sujetos control del grupo A y los 20 pacientes del grupo B ( $p= 0.001$ ) o bien analizando solamente los resultados obtenidos en el nuevo estudio (15 controles y pacientes 15) ( $p= 0.008$ ). Por lo anterior podemos señalar que, a diferencia de lo ocurrido con la IL-10, la tendencia del RNAm de TNF- $\alpha$  de encontrarse ausente en los pacientes con LNH se mantuvo en ambos experimentos, incluso al incrementar el tamaño de la muestra.

Por lo que respecta al TGF- $\beta$ , su RNAm fue determinado solamente en los 15 pacientes y los 15 controles que se incluyeron en la segunda fase del trabajo. No se detectó la presencia del amplificado en ninguno de los 15 casos del grupo B (cuadro 4) pero sí en 8 de los 15 individuos sanos (53%) (cuadro 3). La clara diferencia mostrada en la expresión del RNAm de TGF- $\beta$  entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa ( $p= 0.001$ ).

Contrario a lo observado en el primer ensayo (cuadro 2), la diferencia en la presencia del RNAm de IL-10 entre el grupo control y el grupo de LNH no se mantuvo al incrementar el tamaño de la muestra ( $p= NS$ ), ya que fue expresado en

11 de los 19 individuos control (58%) (cuadro 3) y en 11 de los 20 pacientes (55%) cuadro 4).

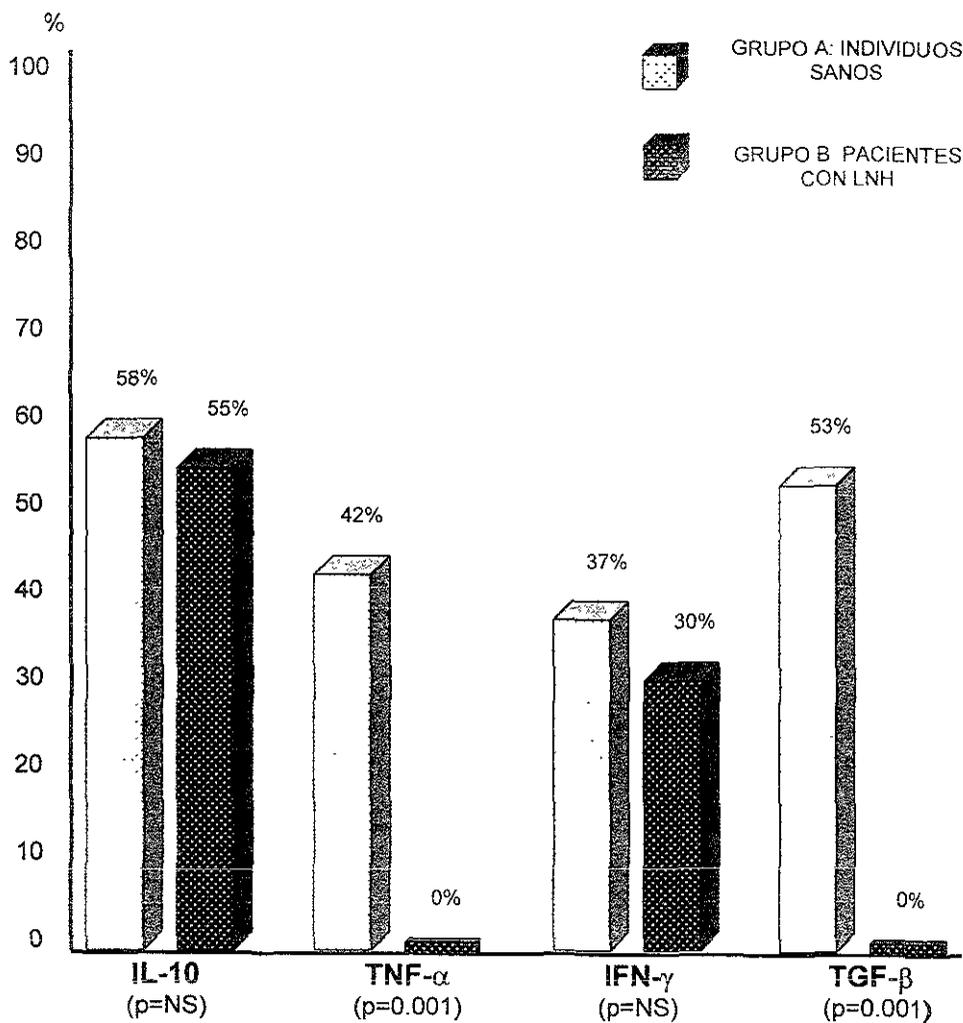
Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al RNAm de IFN- $\gamma$  , puesto que se encontró en 7 de los 19 controles estudiados (37%) (cuadro 3) y en 6 de los 20 pacientes (30%) (cuadro 4). Estos resultados concuerdan con los reportados en el estudio preliminar.

Al comparar la expresión simultánea del RNAm de 2 o más citocinas entre el grupo control (63%) y el grupo de LNH (15%) se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.002$ ).

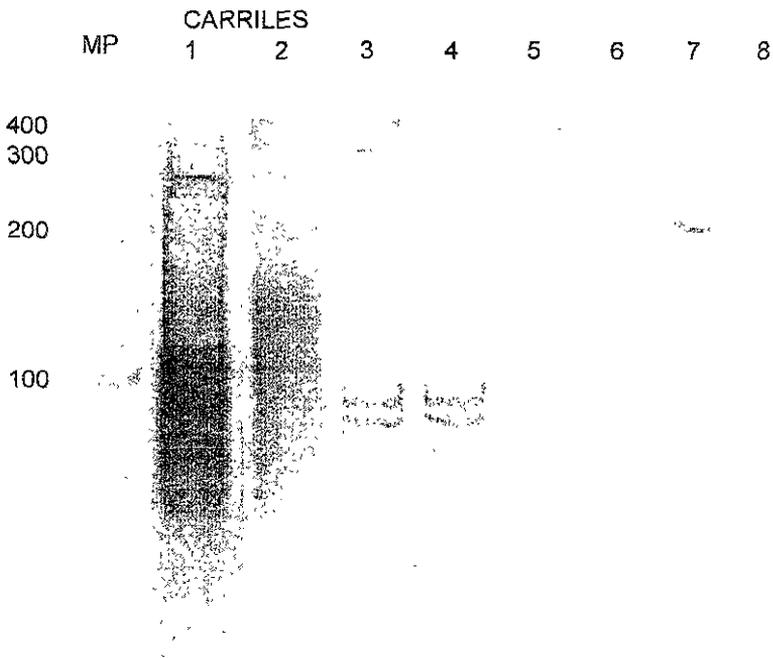
Entre los individuos control y los pacientes del sexo femenino se observaron diferencias importantes en la expresión del RNAm del TNF- $\alpha$  ( $p=0.01$ ) y en la del TGF- $\beta$  ( $p=0.05$ ), mientras que entre los controles y los pacientes del sexo masculino solo se presentó en el TGF- $\beta$  ( $p=0.03$ ).

Las diferencias en la expresión del RNAm de cada una de las citocinas entre el grupo control y el grupo de LNH se aprecian en la figura 3

En la figura 4 se muestra un gel representativo en donde puede observarse el corrimiento característico del segmento amplificado específico para cada citocina.



**FIGURA 3. GRÁFICA COMPARATIVA DE LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE IL-10, TNF-α, IFN-γ Y TGF-β ENTRE INDIVIDUOS SANOS (GRUPO A) Y PACIENTES CON LNH (GRUPO B)**



Carril MP: Marcadores de peso molecular para DNA en pares de bases ( pb ); carriles 1 y 2 muestras positiva y negativa para IFN- $\gamma$ ; carriles 3 y 4: muestras positiva y negativa para TGF- $\beta$ ; carriles 5 y 6: muestras positiva y negativa para TNF- $\alpha$ ; y carriles 7 y 8: muestras positiva y negativa para IL-10.

Los carriles 3 y 4 muestran 2 bandas por debajo de los 100 pb debidas a un exceso de dNTP usados en la reacción de PCR.

**FIGURA 4. CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LOS AMPLIFICADOS OBTENIDOS MEDIANTE RT-PCR**

## XII. DISCUSIÓN

En neoplasias hematológicas como las leucemias y los mielomas, la alteración en la producción de citocinas en MO, tanto estimulantes como inhibitoras ha sido relacionada con el origen y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en otras malignidades como los linfomas el estudio de estos factores se ha limitado a ganglios linfáticos y sangre periférica (SP).<sup>2, 41, 62</sup>

Esta investigación se realizó con el objetivo de detectar la existencia de anomalías en la presencia del RNAm de citocinas específicamente inhibitoras (IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ ) en MO de pacientes con LNH en comparación con un grupo de individuos sanos, mediante una técnica altamente sensible como el RT-PCR.

El TNF- $\alpha$  es producido de forma constitutiva en la MO de los sujetos sanos como ha sido demostrado por otros autores, lo cual concuerda con los resultados presentados en este trabajo.<sup>17</sup>

En la hematopoyesis normal, el TNF- $\alpha$  inhibe directamente la proliferación de los progenitores pluripotenciales y favorece de la misma forma el crecimiento y la diferenciación de las células pre-B a linfocitos B maduros.<sup>74</sup>

Por otra parte, se ha reportado su participación como factor de crecimiento de blastos en leucemia mieloide aguda (LMA) y su expresión en tumores de pacientes con LNH, empleando inmunohistoquímica y RT-PCR. También se han encontrado niveles elevados en el suero de pacientes con MM y LNH.<sup>23, 45, 48, 65, 82,</sup>

En cambio, otros investigadores han mencionado que el TNF- $\alpha$  posee un efecto inhibitor del crecimiento *in vivo* tanto en la MO normal como de pacientes leucémicos, en cuyo último caso el TNF- $\alpha$  induce la fragmentación del DNA y la muerte de las células malignas por apoptosis.<sup>10, 27</sup>

La ausencia del RNAm de esta citocina en la MO de pacientes con LNH indica que la proteína no está siendo producida lo que podría contribuir a la proliferación descontrolada de los progenitores pluripotenciales, afectar la diferenciación de las células B (las cuales se multiplican por la influencia temprana de factores como IL-10 e IL-4) y alterar los mecanismos inmunológicos que inducen la apoptosis en los precursores linfoides anormales.

En lo que respecta al TGF- $\beta$ , el RNAm fue encontrado en más de la mitad de los controles y estuvo ausente en todos los casos de LNH, lo cual indica que la proteína tampoco está siendo producida en la MO de los pacientes.

Reportes anteriores han mencionado que dicha citocina es expresada normalmente en la MO de sujetos sanos, lo que se confirmó en este estudio, donde además se observó una mayor tendencia hacia su expresión en comparación con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .<sup>17</sup>

El TGF- $\beta$  es de vital importancia en el control de la hematopoyesis normal. Posee acciones inhibitoras sobre la célula hematopoyética primitiva y los progenitores como UFC-GEMM, UFB-Meg, UFC-Meg, UFC-G y UFB-E. En la población linfóide, bloquea los efectos proliferativos de la IL-2 sobre la UFC-LT y probablemente la UFC-LB. También puede inducir la apoptosis en varios sistemas celulares, incluyendo linfocitos B humanos.<sup>30, 64, 73</sup>

Aunque anteriormente no se habían reportado evidencias semejantes a las encontradas en este trabajo, existen diversos estudios que sustentan la participación de TGF- $\beta$  en diversas patologías tumorales; por ejemplo en la leucemia linfocítica aguda (LLA) y la LMA inhibe el crecimiento de precursores de células B malignas induciendo la apoptosis y produciendo un bloqueo del crecimiento favorecido por G-CSF.<sup>13, 62, 76</sup>

En cambio no tiene un efecto similar en las células B CD5<sup>+</sup> de leucemia linfocítica crónica (LLC) que además de producir TGF- $\beta$ , disminuyen la expresión de sus receptores y presentan una respuesta anormal a la inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis *in vitro* por esta citocina. Otras evidencias incluyen la presencia de niveles séricos elevados en MM y la detección, mediante RT-PCR, del RNAm en células pre-B y células B maduras neoplásicas en linfomas humanos y plasmocitomas murinos.<sup>8, 40-42, 55</sup>

En LNH la ausencia de TGF- $\beta$  en la MO podría estar involucrada en: a) la inhibición de la apoptosis de precursores "anormales" que pudieran estar presentes, favoreciendo su proliferación y b) al ser el TGF- $\beta$  un supresor importante de la síntesis de la mayoría de las citocinas liberadas por linfocitos y macrófagos, su falta provocaría, en parte, una producción descontrolada de los reguladores positivos en la MO lo que conduciría a la proliferación excesiva de progenitores y precursores hematopoyéticos; por ejemplo un nivel elevado de IL-2 puede estimular la sobreproducción de precursores linfocíticos.

Se ha demostrado que las células neoplásicas de LNH sintetizan TGF- $\beta$  *in vitro*, con lo cual inhiben la generación de las células T citotóxicas (Tc) contribuyendo al desarrollo del tumor. Además, la llegada de este factor por vía

sanguínea hasta la MO podría bloquear la inducción de las actividades de las células NK y LAK por parte de la IL-2 y la síntesis del RNAm de citocinas inhibitoras como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , sin embargo la ausencia del TGF- $\beta$  constitutivo o endógeno parece indicar la presencia de otros factores en el microambiente que bloquean su síntesis.<sup>1, 4, 8, 27, 74</sup>

El IFN- $\gamma$  es otro de los inhibidores específicos de la hematopoyesis normal en humanos, particularmente en las fases iniciales de la diferenciación de los progenitores primitivos.<sup>9, 30, 71, 72, 85</sup>

En condiciones patológicas como la LLC se ha resaltado la participación del IFN- $\gamma$  como un inhibidor de la muerte por apoptosis de los linfocitos B malignos CD5<sup>+</sup> *in vitro*.<sup>12</sup>

En contraste, dicha citocina detiene el crecimiento de células Daudi derivadas de linfoma de Burkitt (LBu) y su acción conjunta con TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  inhibe la proliferación *in vitro* de líneas celulares derivadas de mieloma humano e hibridomas/plasmocitomas murinos.<sup>66, 84</sup>

También se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  media la fagocitosis de células B malignas de LNH por macrófagos activados.<sup>21</sup>

Estos hallazgos podrían orientar la interpretación de los resultados obtenidos hacia dos vertientes:

a) La presencia de IFN- $\gamma$  en MO de pacientes con LNH media la actividad fagocítica de los macrófagos sobre las células o sus precursores con elevado potencial neoplásico, los cuales no son posiblemente detectados por la sólo observación de su morfología, en cuyo caso el IFN- $\gamma$  sería un factor

indicativo de la respuesta del sistema inmune por detener la proliferación de células malignas o que pueden posteriormente convertirse en tumorales.

b) El IFN- $\gamma$  en LNH, de manera semejante a lo que ocurre en LLC, inhibe la apoptosis de linfocitos malignos. <sup>12</sup>

Cabe aclarar que la presencia del RNAm de IFN- $\gamma$  en la MO de los controles y los pacientes no garantiza el que la proteína esté siendo producida por las células estromales y accesorias, por lo que cualquier interpretación que pudiera darse a los resultados obtenidos en este trabajo debe ser sustentada o comprobada en posteriores investigaciones donde se incluya, además de la detección del RNAm, la determinación de la proteína mediante técnicas que utilicen anticuerpos monoclonales como en ELISA.

Aunado a lo anterior, la banda correspondiente al amplificado de IFN- $\gamma$  de los controles y los pacientes que la presentaron fue débilmente positiva en la mayor parte de los casos, lo que hace necesario particularizar en su estudio.

Por otra parte, no se encontró una diferencia significativa en la expresión del RNAm de IL-10 entre los grupos estudiados. Al ser un importante factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos B humanos, es razonable su hallazgo en la MO de individuos sanos, como ha sido reportado por otros autores empleando RT-PCR. <sup>17</sup>

El interés del estudio de esta citocina en LNH se debió a que posee efectos inhibidores en el sistema inmunológico y en la hematopoyesis, además de las varias evidencias reportadas acerca de su presencia en el suero de pacientes con LNH asociada al virus Epstein Barr (EBV). <sup>6, 8</sup>

El empleo de RT-PCR ha revelado un incremento en la producción de IL-10 en tumores linfocíticos de origen B, lo que sugiere un mecanismo de evasión por el cual las células neoplásicas suprimen la respuesta inmune celular al inhibir la producción de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por los linfocitos TH1 y la activación de linfocitos Tc, células NK y células LAK implicadas en la respuesta antitumoral, contribuyendo a la progresión del linfoma. <sup>1, 8, 27, 74</sup>

Lo anterior también ocurre en pacientes infectados con el virus de la leucemia/linfoma de células T del adulto-1 (HTLV-1), en algunas líneas celulares de LBU transformadas y no transformadas por el EBV y en células B infectadas con el mismo virus provenientes de enfermos con SIDA. <sup>5, 11, 24, 52</sup>

Si bien está claro que la IL-10 participa en el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos por los hallazgos encontrados en suero y células tumorales, los datos que aquí se reportan sugieren que no parece ocurrir lo mismo en MO. Sin embargo, de manera semejante a lo que ocurre con el IFN- $\gamma$ , no se sabe si el RNAm está siendo traducido a proteína y en que proporción.

De ser así, es posible que en los individuos sanos la IL-10 producida por el estroma (endógena) participa como un factor de crecimiento de las células pro-B, mientras que en el LNH la IL-10 producida por las células neoplásicas podría llegar a la MO a través de la SP e inhibir la síntesis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  así como la producción de la IL-2 implicada en el desarrollo de células mieloides (como UFC-GM) y linfoides (UFC-LB, UFC-LT) y en la síntesis de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  por células NK. <sup>59</sup>

Al analizar la expresión individual del RNAm de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10, en ambos grupos se observó una mayor frecuencia en la de IL-10 en comparación con la del IFN- $\gamma$ . En cambio hubo una total polarización hacia la falta del RNAm de TNF- $\alpha$  en LNH, a diferencia del grupo control. Si el RNAm de estas citocinas está siendo traducido a proteína, es probable que el IFN- $\gamma$  producido sea capaz de bloquear la síntesis de la IL-10 endógena en algunos casos (pacientes 2, 17 y 18), sin embargo la falta de TNF- $\alpha$  en los mismos estaría señalando la presencia de otros factores que bloquean su síntesis, entre ellos posiblemente la IL-10 y el TGF- $\beta$  de origen neoplásico. Ambas parecen no afectar al IFN- $\gamma$ .

Por otra parte, aun cuando el promedio de años de los individuos control y los pacientes es muy semejante y la edad podría ser un factor involucrado con la ausencia del RNAm de IFN- $\gamma$  en las mujeres con LNH, la heterogeneidad que existe en la edad de los integrantes de cada grupo no permite asegurar si ésta influye o no en la expresión del RNAm de las citocinas, por lo que se sugiere realizar otros estudios empleando un mayor número de muestras tanto de individuos sanos como de pacientes de la misma edad y sexo.

Es importante tener en cuenta que la presencia del RNAm de una misma citocina en los dos grupos estudiados no significa que produzcan una cantidad igual de estas moléculas, por lo que no basta con detectar el RNAm sino que además es necesario investigar la concentración en que se encuentra o que tanto se expresa y que cantidad se traduce efectivamente en proteína. Por ejemplo, si el RNAm de IL-10 o IFN- $\gamma$  está tanto en las células de la MO de los individuos sanos como en

las de los pacientes, la proteína puede ser producida en el primer grupo y no en el segundo o viceversa, o bien en ambos, situación que debe ser investigada mediante otras técnicas como la RT-PCR competitiva, que permite detectar y cuantificar el RNAm de interés, y el ensayo inmunoenzimático o ELISA, que permite determinar la concentración de la proteína formada.

### XIII. CONCLUSIONES

1) El empleo de la técnica de RT-PCR fue de gran utilidad en la detección del RNAm de las citocinas inhibitoras IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  en la MO de los individuos sanos y los pacientes con LNH.

2) No obstante, la presencia del RNAm de los reguladores negativos no garantiza que se traducirá en proteína, lo cual es una limitante del trabajo, por lo que se requiere el empleo de otras técnicas, como RT-PCR competitiva y ELISA, que permitan detectar y determinar la concentración del RNAm así como la concentración de la proteína que se produce respectivamente.

3) De ser así, el hallazgo de dos o más citocinas inhibitoras en más de la mitad de los individuos sanos indicaría que su presencia es importante para regular la hematopoyesis normal y que las alteraciones en la producción de los reguladores negativos TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  en la MO de los pacientes con LNH podría ocasionar: a) un desarrollo anormal de las células progenitoras, b) una respuesta aberrante de las células anormales a la apoptosis y c) la desregulación de los mecanismos que controlan la proliferación celular.

4) Debido a la heterogeneidad que existe en la edad de los individuos control y los pacientes, se sugiere realizar otras investigaciones empleando individuos sanos y pacientes con la misma edad y sexo que permitan saber con seguridad como influyen estos dos factores es la expresión del RNAm de las citocinas.

## XIV. ANEXO 1

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

#### FUNDAMENTO

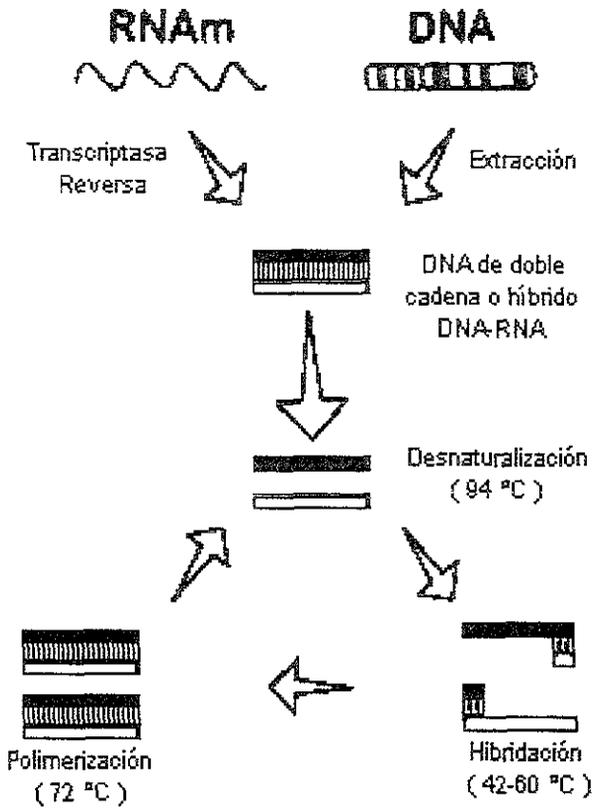
El PCR es un proceso bioquímico *in vitro* cuyo principio es la amplificación enzimática de un fragmento o secuencia de DNA específico flanqueado por oligonucleótidos.<sup>7,20</sup>

La duplicación de las cadenas individuales de DNA es realizada por la DNA polimerasa en los ciclos repetidos (generalmente de 20 a 30) que integran la reacción. Al terminar cada uno de ellos, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima lográndose al final una producción exponencial ( $2^n$ ) de millones de copias del gen o del segmento específico sometido al proceso (figura 5).<sup>3</sup>

### RETROTRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

#### FUNDAMENTO

La expresión de un gen también puede ser analizada determinando el producto final (proteína) o su RNAm mediante retrotranscripción. Esta modalidad de PCR, denominada RT-PCR, emplea a la enzima transcriptasa reversa, descubierta en 1970 por Howard Temin, la cual es capaz de sintetizar cDNA a partir de RNAm, generalmente difícil de obtener, captado con un oligonucleótido con timinas usado como iniciador que se une específicamente a la cola de poliadeninas [poly (A<sup>+</sup>)] del RNAm. De esta manera, la presencia de RNAm no sólo nos dice si el gen que codifica para una determinada proteína se encuentra presente en el DNA genómico, sino que también se transcribe.<sup>7,28</sup>



**FIGURA 5. ESQUEMA DEL SISTEMA DE RT-PCR**

Barrera, S , Ortiz, L. y Rojas, M 1993 Reacción en cadena de la polimerasa. Una época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo 19: 50-59.

## XV. ANEXO 2

### REACTIVOS Y SOLUCIONES.

#### Solución de lisis de eritrocitos

<sup>1</sup>NH<sub>4</sub> Cl: 0.829 g

<sup>1</sup>EDTA disódico: 0.0052 g

<sup>1</sup>Na HCO<sub>3</sub>: 0.1 g

Mezclar los reactivos y ajustar el pH a 7.4, aforar a 100 ml con agua destilada.

#### Amortiguador de fosfatos (PBS)

<sup>1</sup>KCl: 0.2 g

<sup>1</sup>K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.2 g

<sup>1</sup>NaCl: 8 g

<sup>1</sup>Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O: 2.16 g

Mezclar los reactivos y ajustar el pH a 7.35 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

#### Amortiguador de fosfatos con albúmina al 0.5% (PAB)

<sup>2</sup>Albúmina sérica bovina: 5.0 g

Diluir en PBS estéril con pH de 7.35

#### Azul tripano al 0.02%.

<sup>2</sup>Azul Tripano al 0.4%: 100 µl

PBS estéril pH 7.35 cbp 2 ml

Agua tratada (agua-DEPC al 0.1%)

<sup>3</sup>Dietilpirocarbonato (DEPC): 1.0 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Etanol al 75%.

<sup>3</sup>Alcohol etílico absoluto: 75 ml

Agua-DEPC estéril: 25.0 ml

Mezclar y almacenar a -20°C

Gel de agarosa al 1%

<sup>4</sup>Agarosa grado electroforesis: 0.3 g

TAE 1 X: 30 ml

Calentar y mezclar para disolver completamente.

Amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X

<sup>4</sup>Tris base 0.04 M: 4.84 g

Ácido acético glacial: 1.142 ml

EDTA 0.5 M pH 8.0: 2 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

EDTA (ácido etilendiamino-tetra-acético) 0.5 M, pH de 8.0

<sup>1</sup>EDTA disódico: 7.445 g

Disolver en 40 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.0.

### Gel de poliacrilamida al 40%.

Solución stock de acrilamida al 40 %: 1.75 ml

TBE 10X: 0.06 ml

Agua desionizada: 3.5 ml

<sup>4</sup>TEMED (N N N´N´-tetra-metil-etilendiamina): 5 µl

<sup>4</sup>PSA al 10%: 30 µl

Mezclar todos los reactivos. El tiempo de polimerización es de 20 minutos aproximadamente.

### Acrilamida al 40%

<sup>4</sup>Acrilamida: 7.6 g

<sup>4</sup>Bis acrilamida: 0.4 g

Disolver en 20.0 ml de agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

### TBE 10X (Tris-boratos-EDTA)

Tris-base: 108.0 g

<sup>3</sup>Ácido bórico: 55.0 g

EDTA 0.5M, pH de 8: 40.0 ml

Aforar con agua destilada a 1000 ml.

### TBE 1X

TBE 10X: 100.0 ml

Aforar con agua desionizada a 1000 ml. mezclar y almacenar a temperatura ambiente.

### PSA al 10% (Persulfato de amonio al 10%)

<sup>4</sup>Persulfato de amonio: 1.0 g

Agua desionizada estéril: 10 ml

Homogeneizar y distribuir en alícuotas en tubos eppendorf limpios. Almacenar a 4°C.

### Solución stock de Bromuro de etidio 10 mg/ml

Bromuro de etidio: 1.0 g.

Aforar a 100 mL con agua desionizada.

### Solución de carga (amortiguador de corrimiento)

<sup>5</sup>Glicerol: 5 mL

<sup>1</sup>EDTA 1.0 mM, pH de 8: 20 µL

<sup>4</sup>Azul de bromofenol: 2.5 µg

<sup>2</sup>Xilencianol: 2.5 µg

Agua tratada con DEPC: 5.0 ml

Homogeneizar y mantener a temperatura ambiente.

<sup>1</sup> BAKER-ANALYZED, <sup>2</sup> SIGMA, <sup>3</sup> MERCK, <sup>4</sup> BIO-RAD, <sup>5</sup> GIBCO

## XVI. REFERENCIAS

1. Abbas K., A.; Lichtman H., A. y Pober S.; J. 1994. Cellular and molecular immunology. 2ª edición. Saunders Company U.S.A. pp 268-292.
2. Ailles, E.; Gerhard, B. y Hogge, E. 1997. Detection and characterization of primitive malignant and normal progenitors in patients with acute myelogenous leukemia using long-term coculture with supportive feeder layers and cytokines. *Blood*. 90: 2555-2564.
3. Barrera, S.; Ortiz, L. y Rojas, M. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Una época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*. 19: 50-59.
4. Bantler, E.; Lichtman, A.; Caller, S.; Kipps y J. Williams, J. 1995. Hematology. Chapter 22. 5ª edición. Mc Graw-Hill. U.S.A. pp 211-228.
5. Benjamin, D.; Knobloch, J. y Dayton, A. 1992. Human B-cell interleukin 10: B-cell lines derived from patients with acquired immuno deficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood*. 80: 1289-1298.
6. Blay, J.; Burdin, N.; Rousset, F.; Lanoir, G.; Biron, P.; Philip, T.; Banchereau, J. y Faurot, C. 1996. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 82: 2169-2174.
7. Bobadilla, A. y Gamba, G. 1996. Biología molecular en medicina. V. Reacción en cadena de la polimerasa. *Rev. Invest. Clín.* 48: 401-406.
8. Bost, L.; Bieligk, C. y Jaffe, M. 1995. Lymphokine mRNA expression by transplantable murine B lymphocytic malignancies. *J. Immunol.* 154: 718-729.
9. Broxmeyer, H. 1992. Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis. *Am J. Ped. Hematol. / Oncol.* 14: 22-32.

10. Broxmeyer, H.; Williams, E.; Lu, S.; Cooper, S.; Anderson, L.; Beyer, S.; Hoffman, R. y Rubin, Y. 1986. The suppressive influence of human tumor necrosis factor on the bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon- $\gamma$ . *J. Immunol* 136: 4487-4495.
11. Burdin, N.; Peronne, C.; Banchereau, J. y Rousset, F. 1993. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J. Exp. Med.* 177: 295-304.
12. Buschle, M.; Campana, D.; Carding, R.; Richard, C.; Hoffbrand, V. y Brenner, K. 1993. Interferon  $\gamma$  inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 177: 213-218.
13. Buske, C.; Becker, D.; Feuring-Buske, M.; Hanning, H.; Wulf, G.; Schafer, C.; Hiddemann, W. y Wormann, B. 1997. TGF-beta inhibits growth and induces apoptosis in leukemic B cells precursors. *Leukemia.* 11: 386-393.
14. Caux, Ch; Moreau, I; Saeland, S. y Banchereau, J. 1992. Interferon- $\gamma$  enhances factor-dependent Myeloid proliferation of human CD34<sup>+</sup> hemapoietic progenitor cells. *Blood.* 79: 2628-2635.
15. Caux, Ch.; Saeland, S.; Faure, C.; Dwart, V.; Mannoni, P. y Banchereau, J. 1990. Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 12: 2292-2298.
16. Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidin thiocyanate phenol-choloform extitiation. *Ann. Biochem.* 162: 156-159.

17. Cluitmans, M.; Esendam, J.; Landegent, E ; Willemze, R. y Falkenburg, F. 1995. Constitutive in vivo cytokine and hematopoietic growth factor gene expression in the marrow and peripheral blood of healthy individuals. *Blood*. 85: 2038-2044.
18. Congreso Nacional de Química Clínica/EXPOLAB XXII (Memorias del). 1999. México, D.F. p 68.
19. Dawson-Saunders, B. y Trapp, G. 1993. Bioestadística Médica. Capítulo 9 "Estimación y comparación de proporciones". El Manual Moderno. México. pp 165-182.
20. Eeles, R. y Stamps, A. 1993. Polymerase chain reaction (PCR): The technique and its applications. R.G. Landes Co. pp 1-11.
21. Ely, P.; Wallace, K.; Givan, L.; Graziano, F.; Guyre, M. y Fanger, W. 1996. Bispecific-armed, interferon  $\gamma$ -primed macrophage-mediated phagocytosis of malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 87: 3813-3821.
22. Farreras, V. y Rozman, C. 1995. Medicina Interna. Vol 2. 13ª edición. Mosby/Doyma libros. España. pp 1738-1747.
23. Filella, X.; Blade, J.; Guillermo, A.; Molina, R.; Rozman, C. y Ballesta, A. 1996. Cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma. *Cancer Detec. Preven.* 20: 52-59.
24. Finke, J.; Ternes, P.; Lange, W.; Mertelsman, R. y Dölker, G. 1993. Expression of interleukin-10 in lymphocytes of different origin. *Leukemia*. 7: 1852-1857.
25. Fiorentino, F.; Bond, W. y Mosmann, R. 1989. Two types of mouse T helper cell IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081-2095.

26. Fossiez, F.; Djossou, O.; Chomarat, P.; Flores-Romo, L.; Ait-Yahio, S.; Maat, C.; Pin, J-J.; Garrone, P.; García, E.; Saeland, S.; Blanchard, D.; Gaillard, C.; Mahopatra, D.; Rouvier, E.; Golstein, P.; Banchereau, J. y Lebecque, S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 183: 2593-2603.
27. García, T. 1997. Fundamentos de inmunobiología. UNAM. México. p.p 349-393
28. Gry, F. 1998. Reverse transcriptase: A historical perspective. *Focus.* 20: 65, 66.
29. Ham, W.; H. 1985. Tratado de histología 8ª edición. Nueva Editorial Interamericana. México. pp 343-347.
30. Horst, I. 1995. Dictionary of cytokines. Editorial VCH Verlagsgesellschaft mbH. Germany. pp 313-321.
31. Isselbacher, J.; Braunwold, E.; Wilson, D.; Martín, B.; Fauci, S. y Kasper, L. 1994. Principios de medicina interna. Vol 2. 13ª edición. Interamericana McGraw-Hill. España. pp 2042-2054.
32. Jacobsen, W.; Rothe, M.; Rostein, L.; Goeddel, V.; Simeland, B.; Veyby, P.; Siørlund, L. y Jacobsen, W. 1994. Role of the 75 Kda tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10695-10699.
33. Jacobsen W.; Ruscetti, W.; Dubois, M. y Keller, R. 1992. Tumor necrosis factor  $\alpha$  directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: role colony-stimulating factor receptor modulation. *J. Exp. Med.* 175: 1759-1772.
34. Jacobsen, W.; Stokke, T. y Jacobsen, W. 1995. Transforming growth factor- $\beta$  potently inhibits the viability promoting activity of stem cell and other cytokines

- and induces apoptosis of primitive murine hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 86: 2957-2966.
35. James, H. 1993. Blood cell formation. Chapter 1. 3ª edición. Blackweell Scientific Publications. U.S.A. pp 7-22.
36. Jans, A. y Hassan, G. 1998. Nuclear targeting by growth factors, cytokines and their receptors: a role in signaling?. *Bioessays*. 20: 400-411.
37. Jaramillo, A. 1990. El cáncer. Fundamentos de oncología. Tomo 2. Editorial de la Universidad de Costa Rica. pp 753-761.
38. Jimenez-Zepeda, V. y Jimenez-Zepeda, R. 1998. Linfoma no Hodgkin: clasificación biológica, diagnóstico y tratamiento. *Gaceta Médica de México*. 134: 443-463.
39. Koeffler, P.; Gasson, J.; Ranyard, J.; Souza, L.; Shepard, M. y Munker, R. 1987. Recombinant human TNF- $\alpha$  stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 70: 55-59.
40. Kremer, J.; Reisbach, G.; Nerl, C. y Dormer, P. 1992. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells express and release transforming growth factor-beta. *Br. J. Heamatol*. 80: 480-488.
41. Kröning, H.; Täger, M.; Thiel, U.; Ittenson, A.; Reinhold, D.; Bühling, F., Ketter, E. y Ansorge, S. 1997. Over production of IL-7, IL-10 and TGF- $\beta$  in multiple myeloma. *Acta Haematol*. 98: 116-118.
42. Lagneaux, L.; Delforge, A.; Bernier, M.; Stryckmans, P. y Bron, D. 1998. TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymph*. 31: 2387-2396.

43. Leary, A.; Zeng, H.; Clark, S. y Ogawa, M. 1992. Growth factor requirements for survival in G<sub>0</sub> and entry into the cycle of primitive human hematopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4013-4021.
44. Levine, M. 1990. Lymphoma complicating immunodeficiency disorders. *Ann. Oncol.* 5: 29-35. (suppl 2),
45. Löwenberg, B. y Touw, P. 1993. Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* 81: 281-292.
46. Lowry, A. 1995. Hematopoietic stem cell cytokine response. *J. Cel. Biochem.* 58: 410-415.
47. Maniatis, T.; Fritsh, E. y Sambrook, T. 1988. Molecular cloning. A laboratory manual. Chapter 7 "Extraction, purification and analysis of Messenger RNA from eukaryotic cells". 2ª edición. Cold Spring, Harborg Laboratory. N.Y. pp 7.1-7.25
48. Marcia, J.; Gomez, X.; Esquerda, A.; Perez, B.; Callao, V. y Marzo, C. 1996. Value of the determination of TNF-alpha in the plasma of patients with non-Hodgkins lymphoma. *Leuke. Lymph.* 20: 481-490.
49. McNiece, I.; Langley, K. y Zsebo, K. 1991. Recombinant human stem cell factor synergies with GM-CSF, G-CSF, IL-3 y Epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp. Hematol.* 19: 226-234.
50. Metcalf, D. 1993. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?. *Blood* 82: 3523-3526.
51. Moore, S. 1991. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood.* 78: 1-19.
52. Mori, N.; Gill, S.; Mougdil, T.; Murakami, S.; Eto, S. y Prager, P. 1996. Interleukin-10 gene expression in adult T cell leukemia. *Blood.* 88: 1035-1045.

53. Mrózek, E.; Anderson, P. y Caligiuri, A. 1996. Role of interleukin 15 in the development of human CD56<sup>+</sup> natural killer cells from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 87: 2632-2640.
54. Muraille, E. y Leo, O. 1998. Revisiting the TH1/TH2 paradigm. *Scandin. J. Immunol.* 47. 1-6.
55. Nowell, P. y Moore, J. 1998. Aberrant responses of human lymphocytic neoplasms to cytokine regulation. *Immunol. Res.* 17: 171-179.
56. Oehler, L.; Foedinger, M.; Koeller, M.; Kollars, M.; Reiter, E.; Bohle, B.; Skoupy, S.; Fritsch, G.; Lechner, K. y Geissler, K. 1997. Interleukin-10 inhibits spontaneous colony-forming unit-granulocyte-macrophage growth from human peripheral blood mononuclear cells by suppression of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor release. *Blood*. 89: 1147-1153.
57. Ogawa, M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 81: 2844-2853.
58. Paul, S.; Bennett, F.; Calvetti, J.; Kelleher, K.; Wood, C.; O'Hara, R.; Leary, A.; Sibley, B.; Clark, S.; William, D. y Yang, Y. 1990. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin-11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 7512-7521
59. Reya, T.; Contractor, V.; Couzens, S.; Wasik, A.; Emerson, G. y Carding, R. 1998. Abnormal myelocytic cell development in interleukin-2 ( IL-2 ) deficient mice: evidence for the involvement of IL-2 in myelopoiesis. *Blood*. 91: 2935-2947
60. Richard, G. y Bithell, C. Wintrobe's. 1993. *Clinical Hematology*. Vol 1. 9ª edición. Lea and Febiger. U.S.A. pp 48-62.

61. Robinson, E. y Quesemberry, J. 1990. Hematopoietic growth factors: over view and clinical applications. Part II. Am. J. Med. Sci. 300: 237-244.
62. Rowe, J. y Liosveld, J. 1997 Hematopoietic growth factors in acute leukemia. Leukemia. 11: 328-341.
63. Rubin, E y Farber, L. 1990. Patología. Editorial Médica Panamericana. México. pp 914-1005.
64. Ruiz, A. 1993. Fundamentos de hematología. Editorial Médica Panamericana. México. pp 15-23.
65. Sappino, A.; Seelentag, W.; Pelte, M.; Alberto, P. y Vassalli, P. 1990. Tumor necrosis factor/cachectin and lymphotoxin gene expression in lymph nodes from lymphoma patients. Blood. 75, 958-967.
66. Schwabe, M.; Cox, W.; Bosco, C.; Prohaska, R. y Kung, H. 1996. Multiple cytokines inhibit interleukin-6-dependent murine hybridoma / plasmacytoma proliferation. Cell. Immunol. 168: 117-123.
67. Sewall, A. y Mc Rae, S. 1998. RNA isolation with Trizol reagent. Focus. 20: 36, 37.
68. Siegel, S. 1991. Estadística no paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta. Capítulo 6 "El caso de dos muestras independientes". Trillas. México. pp 120-30.
69. Simms, D.; Cizdziel, E. y Chomczynski, P. 1993. TRizol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. Focus. 15: 99-103.
70. Smith, H. 1991. Tratado de medicina interna. Parte XII. Enfermedades hematológicas. Vol. 1. 18ª edición. Interamericana Mc Graw-Hill. México. pp 1117-1124.

71. Snoeck, H.; Van Bockstaele, R.; Nys, G.; Lenjou, M.; Lardon, F.; Haenen, L.; Rodrigus, I.; Peetermans, E. y Berneman, N. 1994. Interferon  $\gamma$  selectively inhibits very primitive CD34<sup>2+</sup> CD38<sup>-</sup> and not more mature CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 180: 1177-1182.
72. Snoeck, H.; Weekx, S.; Moulijn, A.; Lardon, F.; Lenjou, M.; Nys, G.; Van Ranst, F.; Van Bockstaele, R. y Berneman, N. 1996. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is a potent synergistic factor for the proliferation of primitive human hematopoietic progenitor cells and induces resistance to transforming growth factor  $\beta$  but not to interferon  $\gamma$ . *J. Exp. Med.* 183: 705-710.
73. Sporn, M. y Roberts, A. 1989. Transforming growth factor- $\beta$ : multiple actions and potential clinical applications. *JAMA.* 262: 938-948.
74. Stites, P. y Abba, J. 1991. Basic and clinical immunology. 7<sup>a</sup> edición. Appleton and Lange. Norwalk. pp 133-154.
75. Stopka, T.; Ziviny, J.; Stopkova, P. y Parchal, J. 1998. Human hematopoietic progenitors erythropoietin. *Blood.* 91: 3766-3772.
76. Taetle, R.; Payne, C.; Dos Santos, B.; Rusesell, M. y Segarini, P. 1993. Effects of transforming growth factor beta 1 on growth and apoptosis of acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 53: 3386-3394.
77. Taga, T. y Kishimoto, T. 1993. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J.* 7: 3387-3395.
78. Taga, K.; Mostowski, H. y Tosato, G. 1993. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood.* 81: 2964-2971.
79. Tavassoli M. y Fredenstein A. 1983. Hematopoietic stromal microenvironment. *Am. J. Hematol.* 15: 195-203.

80. Testa, G.; Lord, B. y Dexter, M. 1997. Hematopoietic lineages in health and disease. Chapter 1 and 2. Marcel Dekker. U.S.A. pp 1-45.
81. Veiby, P.; Borge, J.; Martensson, A.; Beck, X.; Schade, E.; Grzegorzewski, K.; Lyman, D.; Martenson, I. y Jacobsen, W. 1997. Bidirectional effect of interleukin-10 on early murine B-cell development: stimulation of flt3-ligand plus interleukin-7-dependent generation of CD19<sup>-</sup> pro B cells from uncommitted bone marrow progenitor cells and growth inhibition of CD19<sup>+</sup> pro B cells. *Blood*. 90: 4321-4331.
82. Voorzanger, N.; Touitou, R.; Garcia, E.; Delecluse, H.; Rousset, F.; Joab, I.; Favrot, C. y Blay, Y. 1996. Interleukin (IL)-10 and IL-6 produced in vivo by Non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors. *Cancer Res*. 56: 5499-5505.
83. World Medical Association: 1964. Declaration of Helsinki. Recommendation guide doctors in clinical research. *World Med. J.* 11:281-292.
84. Yamada, H.; Ochi, K.; Nakada, S.; Takahara, S.; Nemoto, T.; Sekikawa, T. y Horiguchi-Yamada, J. 1995. Interferon modulates the messenger RNA of G1-controlling genes to suppress the G1-to-S transition in Daudi cells. *Mol. Cell. Biochem.* 152: 149-153.
85. Young, A.; Kliman, M.; Reynolds, A.; Grzegorzewski, J.; Nii, A.; Ward, M.; Winter-Pickett, T.; Ortaldo, R.; Kenny, J. y Komschlies, L. 1997. Bone marrow and thymus expression of interferon- $\gamma$  results in severe B-cell lineage reduction T-cell lineage alternations and hemopoietic progenitor deficiencies. *Blood*. 89: 583-595.
86. Zinzani, P.; Baccini, C.; Zaccaria, A.; Visani, G.; Buzzi, M.; Morelli, A.; Molinari, A.; Salvucci, M.; Bendandi, M.; Rubbodi, D.; Gherlinzoni, F.; Zanchini, R. y Tura,