

030623
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO

**ESTUDIO DE LAS CELULAS PLURIPOTENCIALES
HEMATOPOYETICAS
(CD 34) Y LA EXPRESION GENICA DE CITOCINAS EN
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRIA
EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA**



**PRESENTA
DIANA ELODIA AGUILAR LEON**

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECIBIDO EN
SECRETARIA
AL
DIA

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** Dr. Carlos Rosales Ledezma
- VOCAL:** Dr. Jorge Alcocer Varela
- SECRETARIO:** Dr. José Antonio Enciso Moreno
- SUPLENTE:** Dr. Marco Antonio Meraz Ríos
- SUPLENTE:** Dr. José Sullivan López González

- Asesores del tema:** Dr. Jorge Alcocer Varela
Dr. Xavier J. López Karpovitch

Sustentante: Diana Elodia Aguilar León

Este trabajo se realizó en el Departamento de Hematología y en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

AGRADECIMIENTOS

Dr. Xavier López Karpovitch
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Q.F.B. Josefa Piedras Ross
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Dr. Jorge Vela Osorio
Centro Médico "La Raza", IMSS

Dra. Teresa Marin Palomares
Centro Médico "La Raza", IMSS

Dra. Ma. de los Angeles del Campo Martínez
Centro Médico "La Raza", IMSS

Q.F.B. Aurora Acosta Barreda
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. José Sullivan López González
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Srita. Ma. Magdalena Bustos Vázquez
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

INDICE

Abreviaturas	2
Resumen	5
Introducción	7
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Material y métodos	
Muestras biológicas	19
Procesamiento de la muestra	21
Cuantificación de CD34 por FACS	21
Extracción de RNA	23
RT-PCR para CD34 y citocinas	24
Análisis estadístico	26
Resultados	27
Análisis de los productos de PCR	39
Discusión	42
Conclusiones	50
Apéndice	52
Referencias	56

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
AcMo	Anticuerpo monoclonal
Bis-acrilamida	N,N'-Metilen-bis-acrilamida
CD	Cluster differentiation
CD14	Marcador de monocitos-granulocitos
CD19	Marcador de células B
CD33	Marcador de linaje mieloide
CD34	Marcador de células pluripotenciales
CD45	Marcador de leucocitos
CD5	Marcador de células T
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CFU	Unidades formadoras de colonias
CFU-E	Unidades formadoras de colonias de eritrocitos
CFU-G	Unidades formadoras de colonias de granulocitos
CFU-GEMM	Unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y macrófagos
CFU-GM	Unidades formadoras de colonias de granulocitos- monocitos
CFU-LB	Unidades formadoras de colonias de linfocitos B
CFU-LT	Unidades formadoras de colonias de linfocitos T
CFU-M	Unidades formadoras de colonias de monocitos
CFU-Meg	Unidades formadoras de colonias de megacariocitos
CMN	Células mononucleares
CSF-G	Factor estimulador de colonias de granulocitos
CSF-GM	Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos
CSF-M	Factor estimulador de colonias de monocitos
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleótidos trifosfato
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EE	Error estándar
FACS	Citometría de flujo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano DR
IFN-γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodaltons
LEG	Lupus eritematoso generalizado
MEC	Matriz extracelular
μg	Microgramos
μl	Microlitros
mM	Milimolar
MO	Médula ósea
N.S.	No significativo
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDN	Prednisona
PE	Ficoeritrina
pg	Picogramos
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Acido ribonucleico
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
TBE	Tris-borato-EDTA

TGF- β

TNF- α

UV

Factor de crecimiento tumoral beta

Factor de necrosis tumoral alfa

Ultravioleta

RESUMEN

El lupus eritematoso generalizado es una enfermedad autoinmune, generalizada de predominio en mujeres. Sus manifestaciones clínicas son muy variadas e incluyen lesiones cutáneas, artritis, glomerulonefritis y la afección de los sistemas nervioso y cardiopulmonar. Entre los trastornos más frecuentes, se encuentra también la presencia de citopenias, que se definen como el descenso de elementos formes sanguíneos, cuya expresión es variada y puede incluir anemia hemolítica, trombocitopenia, leucopenia neutropenia y linfopenia.

Las citopenias en el lupus, pueden ser causadas por mecanismos relacionados con la propia enfermedad, como los anticuerpos contra los elementos formes; sin embargo, también pueden depender de otras alteraciones, como la mielofibrosis, aplasia medular o cambios en el proceso de la hematopoyesis. Recientemente su estudio ha sido posible gracias al marcador CD34, que no solo caracteriza a la célula pluripotencial primitiva, sino que permite conocer los mecanismos de autoduplicación, diferenciación, maduración y la generación de su progenie.

La documentación de un desbalance en la red que forman las diversas citocinas, con sobreproducción de algunas y deficiente producción de otras se ha definido particularmente en sangre periférica; sin embargo el estudio de estos mediadores en médula ósea y especialmente en el lupus, ha sido insuficiente. Diversos factores de crecimiento hemolinfopoyéticos y numerosas citocinas que participan en la formación de células sanguíneas periféricas y estudios recientes han permitido conocer que las interleucinas 2 (IL-2), 4 (IL-4), 6 (IL-6), 10 (IL-10), IFN- γ , TNF- α y el TGF- β tienen gran importancia en los mecanismos de regulación de la hematopoyesis.

En este trabajo se cuantificaron las células precursoras CD34 en médula ósea y se estudió la presencia génica de CD34 y de un grupo de citocinas que pueden regular el proceso de la hematopoyesis.

Se estudiaron 16 pacientes con lupus que cumplieron los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología, todos ellos presentaron alguna citopenia periférica y fueron divididos en pacientes activos sin tratamiento, enfermos activos tratados con prednisona y pacientes activos tratados con prednisona e inmunosupresores. El grupo control incluyó 11 individuos clínicamente sanos

seleccionados del programa de trasplante de médula ósea. A partir de la médula ósea obtenida por punción en cresta ilíaca, se realizó el estudio citológico el cual mostró resultados heterogéneos, sin anomalías específicas que pudieran explicar las citopenias. El análisis mediante citometría de flujo, incluyó la cuantificación de las células positivas para CD34, CD33, CD45, CD19 y CD5 utilizando anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína y/o ficoeritrina. El estudio de CD34 y de IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IFN- γ , TNF- α y TGF- β en médula ósea, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa empleando el cDNA obtenido del RNA total, previamente sometido a un proceso de transcripción reversa.

En las muestras de pacientes con lupus se encontró un descenso de las poblaciones CD34, CD33 y CD45 en comparación del grupo control ($p=0.05$, 0.006 y 0.03 respectivamente). La disminución de los valores de hemoglobina, leucocitos y plaquetas en el grupo de enfermos, se correlacionó con el descenso del número de células CD34 en los grupos sin tratamiento y en aquellos tratados con prednisona ($r=0.86$). En cuanto a las citocinas, no detectamos IL-2 en los pacientes ni en el grupo control, y no hubo diferencias entre ambos grupos con respecto a la IL-4, IL-6, TNF- α . En cambio, la presencia de IL-10 ($p=0.02$) fue más frecuente en la médula ósea de los pacientes con LEG que el grupo control y el IFN- γ ocurrió en un menor porcentaje de pacientes con lupus, aunque sin significancia estadística.

Los resultados de este estudio sugieren que las citopenias periféricas en el lupus, pueden estar relacionadas al menos parcialmente con un descenso de las células CD34. El perfil de citocinas puede apoyar que un cambio en su síntesis, en alguna fase de la hematopoyesis, puede comprometer este proceso e incidir en una regulación anómala.

Es necesario extender el estudio hacia otras líneas de investigación, como sería conocer la interacción de las células progenitoras con su microambiente, así como estudiar la participación de subpoblaciones de CD34 o de la matriz extracelular.

INTRODUCCION

HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis se define como la serie de eventos mediante los cuales una célula pluripotencial hematopoyética influida por su microambiente, sufre una autoduplicación y da lugar a un proceso de diferenciación, maduración y finalmente la producción de la progenie que constituirá los elementos sanguíneos formes a nivel periférico.

El proceso hematopoyético, se ha dividido en diferentes fases. La autoduplicación, que consiste en la capacidad de la célula para dividirse, renovarse y establecer la población tronco pluripotencial, es decir la célula permite generar diversos linajes celulares. La diferenciación destaca por ser un suceso génico que depende de la síntesis de productos específicos, como factores estimuladores de colonias y citocinas, los cuales facilitarán el compromiso celular hacia linajes específicos. A su vez, la maduración ocurre a consecuencia de una serie de sucesos morfológicos y bioquímicos iniciados por la diferenciación, permitiendo la adquisición de la capacidad funcional completa y específica de las células efectoras (1, 2).

En el adulto la médula ósea (MO) es el compartimiento más importante en el que se lleva a cabo la hematopoyesis, siendo el sitio principal de la formación de los elementos sanguíneos. Los componentes fundamentales de la MO son la matriz extracelular (MEC) y las células hematopoyéticas. La MEC, está constituida por diversas proteínas y factores solubles como colágena tipo I, III y IV, fibronectina, hemonectina, trombospondina y factor VIII de la coagulación, que son secretadas por diferentes células como fibroblastos, células reticulares, células endoteliales y macrófagos. Esta MEC tiene una interacción con las células progenitoras y los factores de crecimiento y citocinas en el ámbito apropiado que aporta el microambiente de la MO (3).

En cuanto a la célula hematopoyética primitiva, una de las características mejor estudiada es la expresión de la molécula CD34, la cual se encuentra en la superficie celular y se ha identificado en aproximadamente del 1 al 3% del

contenido celular total en la MO, mientras que la proporción en sangre periférica (SP) en individuos sanos no supera el 1%. Este marcador está estrechamente relacionado al proceso de la hematopoyesis y su importancia surgió durante el estudio de pacientes con leucemia, en los cuales esta molécula permitió identificar células del linaje mieloide de tipo indiferenciado en MO (4,5,6). Otra evidencia que ha apoyado su importancia en el proceso de diferenciación, fue la aparición de una tinción positiva con anticuerpos monoclonales CD34 específicos, en las células progenitoras obtenidas en cultivos *in vitro* a partir de MO. Estas células mostraron capacidad de autoduplicación en un tiempo aproximado de 65 horas y sus características morfológicas mostraron la presencia de un solo núcleo con aspecto retráctil y citoplasma translúcido con capacidad migratoria, lo que es distintivo de la población progenitora. Además, al usar anticuerpo CD33 el cual identifica un antígeno mieloide temprano, no se encontró reconocimiento alguno (7, 8).

El análisis del antígeno CD34 ha mostrado que es una glicoproteína transmembranal de 115 kDa, altamente glicosilada y se ha observado que se une a la E-selectina, pero no a la L-selectina, lo que ha sugerido que los ligandos para E- y L-selectina relacionados con la interacción celular de esta población son epitopes diferentes (9).

La importancia de CD34 en términos funcionales es reforzada al conocerse que la célula portadora de este marcador se puede diferenciar hacia distintos linajes. Datos recientes muestran que en los modelos murinos irradiados letalmente, la transfusión de MO rica en células CD34 a estos animales, es capaz de reconstituir su potencial hematopoyético, mientras que al introducir células CD34 negativas, en embriones murinos, se observa no sólo un abatimiento de los progenitores CD34, sino una completa inhibición del desarrollo de la serie eritroide así como una inhibición de la diferenciación mieloide y disminución del número de unidades formadoras de colonias (CFU). Las deficiencias del progenitor CD34 en adultos, muestra una cinética anormal de recuperación de eritrocitos y plaquetas después de una irradiación subletal. Estos datos sugieren

que la célula CD34 desempeña un papel importante en la formación de los elementos formes sanguíneos durante la hematopoyesis, tanto en la etapa embrionaria como en el adulto (10).

Evidencias adicionales han mostrado que las células progenitoras primitivas van disminuyendo su expresión de CD34 en la medida en que progresa la diferenciación (11). Además, las células que se diferencian hacia los linajes mieloide o linfoide son influenciados por diferentes factores de crecimiento que afectan la población CD34. Por ejemplo, la inducción de la producción de eosinófilos de sangre periférica, se obtiene a partir de poblaciones enriquecidas de células CD34 que son estimuladas por IL-5, siempre y cuando se adicione previamente CSF-GM e IL-3, además, la adición de CSF-G incrementa el porcentaje de neutrófilos (12).

Otros experimentos, relacionados con la función de CD34 indican que la expresión de esta molécula en células endoteliales, tiene un papel en los mecanismos de adhesión y localización por lo que se ha planteado que este antígeno es importante en los procesos de localización/adhesión en la MO (13). Esta interacción célula-MEC es modulada además por el estroma, el que además de regular la hematopoyesis, aporta el microambiente en el que moléculas de adhesión celular (CAMs) interactúan con linajes específicos dependiendo del estado de diferenciación (14).

CITOCINAS Y HEMATOPOYESIS

Las citocinas conforman un grupo heterogéneo de moléculas de naturaleza glicoprotéica, que son producidos por una gran variedad de células. Su actividad puede ser autocrina, paracrina o endocrina y ocurre a concentraciones picomolares. Entre sus funciones más relevante están las de regular el crecimiento, la morfología y la migración celular, por lo que desempeñan un papel importante en diferentes fases de la respuesta inmune (15).

Las citocinas participan en diversos mecanismos, incluyendo la presentación del antígeno, el proceso de diferenciación y las capacidades efectoras, tanto de las células inmunes como de otros elementos formes sanguíneos (16).

En las enfermedades autoinmunes como el LEG se ha observado un claro desequilibrio en la red que forman las diversas citocinas. El estudio en sangre periférica ha revelado que la sobreproducción de algunas y deficiente producción de otras, puede favorecer cambios en la respuesta inmune que caracterizan a esta enfermedad. Sin embargo, el efecto de las citocinas en MO y particularmente en la hematopoyesis no ha sido suficientemente analizado (17).

Las citocinas que han mostrado efectos bien caracterizados en el proceso de la hematopoyesis incluyen a la interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)(18).

La IL-2 estimula tanto a las unidades formadoras de colonias de linfocitos T (CFU-LT), como a las unidades formadoras de colonias de linfocitos B (CFU-LB). El receptor para esta citocina es el antígeno CD25 que se ha localizado en los blastos de algunos pacientes con leucemia aguda mieloide, por lo que se ha sugerido que la alteración en esta molécula puede tener un papel relevante en las anomalías de la mielopoyesis. Además, la IL-2 puede inhibir el crecimiento de las unidades formadoras de colonias tanto de granulocitos como de granulocitos-monocitos y monocitos (CFU -G, CFU-GM, CFU-M) (19).

La IL-4 producida por los linfocitos T y otras células inmunes, (células cebadas) no sólo activa linfocitos T cooperadores (CD4) y linfocitos B sino también estimula las unidades formadoras de colonias de linfocitos B (CFU-LB). Así mismo incrementa en las células B la expresión de moléculas HLA y en conjunto con IL-3 favorece el crecimiento de mastocitos. Su acción conjunta con el factor estimulador de colonias-granulocíticas (CSF-G) induce la formación de las CFU-GM. Con eritropoyetina se estimula la formación de las unidades formadoras de colonias de eritrocitos (CFU-E) y las unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y macrófagos (CFU-GEMM) y con

eritropoyetina e IL-1, se favorece la formación de las unidades formadoras de colonias de megacariocitos (CFU-Meg) (20).

La IL-6 es una glicoproteína que puede ser producida por células T y B, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y mesangiales. Su síntesis y secreción son inducidas por la IL-1 y el TNF- α . Esta citocina tiene un efecto inductor en la proliferación de las CFU-Meg, CFU-G y las CFU-M y actúa sinérgicamente con la IL-3 favoreciendo el crecimiento de la CFU-B1 y CFU-LM (15).

La IL-10 tiene un papel supresor en la respuesta inmune, es sintetizado por las células T (Th2) y B activadas, macrófagos, queratinocitos y mastocitos. Actúa inhibiendo la producción y transcripción de citocinas pro-inflamatorias que son producto de los macrófagos y específicamente se ha informado que regula la síntesis de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (21). Esta citocina favorece la diferenciación del linfocito B hacia célula plasmática y modula la síntesis de otras citocinas, por lo que a pesar de la ausencia de reportes en los que se relacione directamente con la hematopoyesis, puede tener repercusión sobre los precursores de MO (22).

El TNF, cuya fuente principal es el macrófago activado, se ha dividido en TNF- α y TNF- β . El TNF- α se sintetiza como un precursor intracelular que posteriormente es transformado a su forma activa. Aunque es secretado fundamentalmente por macrófagos activados, los linfocitos, las células NK y los mastocitos también lo producen. Además de su efecto inductor de necrosis hemorrágica de ciertos tumores y la caquexia, es conocido por sus efectos proinflamatorios. En la MO, ha mostrado capacidad inhibitoria durante la hematopoyesis. El TNF- β , el cual es producto de linfocitos T interviene, aunque en menor medida que el TNF- α , en la citólisis y en la activación de linfocitos T. La participación de estas citocinas en la hematopoyesis no se conoce del todo, pero recientemente, se ha observado que la producción del TNF- α a partir de células de MO se incrementa en presencia de IL-2 y que una alteración en la síntesis de esta citocina puede explicar la depresión medular en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida

(23-26). Además, el TNF- α aumenta la capacidad de los monocitos para producir mediadores de la inflamación incluyendo a la IL-6 e IL-8.

El TGF- β 1 pertenece al grupo de los factores moduladores del tejido conjuntivo, que es secretado por una gran diversidad de células como los linfocitos T y B, macrófagos, fibroblastos, plaquetas, células de riñón y tumorales. Se sintetiza tardíamente durante el proceso de activación de los linfocitos T y es un potente inhibidor de la proliferación de éstos y de la producción de IL-2 e IFN- γ , por lo que puede desempeñar un importante papel como regulador negativo (15). El efecto inhibidor ha sido reportado tanto en la hematopoyesis, como en las fases de activación de las células T en tejido sinovial (15,17).

El IFN- γ comparte con algunas proteínas específicas como la MIP-1a, la propiedad de inhibir el proceso hematopoyético (17).

El estudio del efecto de los factores de crecimiento y citocinas en MO durante la hematopoyesis puede generar información valiosa en cuanto a la diferenciación y maduración de las células sanguíneas (27). La IL-2 inhibe el crecimiento de las CFU-G, CFU-M, CFU-GM y el CSF-GM, así como la motilidad de los neutrófilos. La eritropoyetina actúa directamente a nivel de CFU-E así como en los proeritroblastos (28). Otro factor hemolinfopoyético importante es la interleucina-3 (IL-3), cuya síntesis es regulada por un gen localizado en el cromosoma 5 (29). En pacientes con anemia aplásica, la administración crónica de IL-3 produce un aumento del número de granulocitos, monocitos linfocitos y reticulocitos, pero no de plaquetas (30,31). Esta citocina actúa directamente sobre el progenitor primitivo y afecta todos los linajes con excepción del linfoide, además el empleo conjunto de IL-3, IL-6 y CSF-G estimula la proliferación de las células CD34 (32,33,34).

LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad inflamatoria con un gran número de alteraciones en la inmunoregulación, cuyo principal resultado es la autoinmunidad. Aunque su causa precisa no se conoce, en su inicio y

progresión participan las interacciones de diversos factores, entre los que destacan los genéticos, hormonales y ambientales.

La descripción original de la enfermedad, se atribuye a Biett en 1822, pero fue Cazenave en 1851, quien empleó por primera vez el nombre de lupus eritematoso para describir las manifestaciones clínicas de una forma de lesión en la piel que se reconoció en esta enfermedad. Más adelante se aclaró que dicho cambio cutáneo correspondía realmente una forma de tuberculosis totalmente distinguible del LEG que ha recibido el nombre de lupus vulgaris (35).

Kaposi y Osler, enfocaron su atención hacia la naturaleza generalizada del LEG y destacaron la importancia del compromiso cerebral, respiratorio, cardíaco, gastrointestinal, renal, neurológico, articular y hematológico (35,36).

En 1950, Hargraves describió el fenómeno lupus eritematoso (LE), conocido también como célula LE y a partir de ello, se inició el estudio inmunológico de la enfermedad. Más adelante, Richmond y Monton realizaron estudios que demostraron que dicho fenómeno era el resultado de un anticuerpo contra antígenos del núcleo celular, que se unía a este organelo y facilitaba su fagocitosis (35).

Durante las últimas tres décadas, el LEG se ha reconocido como una enfermedad reumática importante en todo el mundo. Su incidencia anual se ha estimado entre el 0.001 y 0.002% y la prevalencia es del 0.008%, mientras que algunos estudios reportan un caso por cada 7,000 habitantes. Incluso se ha observado que en algunos hospitales, la prevalencia ha sobrepasado la de la artritis reumatoide.

El LEG es más común en ciertos grupos étnicos, particularmente entre la raza negra y la población asiática, además su incidencia es mayor en los núcleos familiares en comparación con la población en general (36,37). Por otra parte, tiene un acentuado predominio en mujeres entre la tercera y quinta década de la vida, con una relación hasta de 9 ó 15 :1 respecto al sexo masculino.

Los pacientes con LEG tienen típicamente una enfermedad que compromete prácticamente todos los órganos y sistemas, aunque no siempre se afectan

simultáneamente. El curso clínico se caracteriza por presentar exacerbaciones y remisiones cuya duración puede variar desde meses hasta varios años.

Uno de los hallazgos más relevantes del LEG es la presencia de citopenias que generalmente se manifiestan produciendo anemia, leucopenia, trombocitopenia o bien el descenso específico de linfocitos o neutrófilos. Estas alteraciones, pueden ser ocasionadas por mecanismos relacionados con la propia enfermedad y se ha descrito la destrucción periférica de eritrocitos, leucocitos y plaquetas por anticuerpos específicos contra estos componentes. Recientemente se ha reportado que otras causas de citopenias recurrentes puede ser el síndrome hemofagocítico agudo, la mielofibrosis y la aplasia medular (38).

Otra alternativa es que las citopenias dependan de una alteración en el número y/o función de sus progenitores en MO; sin embargo, la literatura aporta pocas evidencias en favor de esta posibilidad (39).

Entre las evidencias que sostienen una alteración en la hematopoyesis en el LEG, particularmente cuando estos pacientes cursan con alguna citopenia, se encuentra una reducción en la granulopoyesis, con predominio de células inmaduras. Otros estudios aislados, han reportado un descenso de las CFU-E y de sus precursores en MO. En estudios *in vitro* se ha logrado detectar una inhibición de las CFU-E causada por linfocitos T autólogos o alogénicos provenientes de pacientes con LEG sin tratamiento. También se ha descrito la presencia de anticuerpos contra precursores de MO, así como una supresión del crecimiento de células progenitoras de las líneas granulocítica y monocítica (40). Desafortunadamente, la mayoría de estas evidencias han derivado de casos aislados con citopenias y no se ha profundizado en su importancia fisiopatogénica.

Al analizar el compromiso inmunológico, una de las características más importantes del LEG es la presencia de un desbalance de este sistema en el que participa tanto la respuesta humoral como celular. La hiperactividad de linfocitos B, se ve reflejado principalmente en la producción de autoanticuerpos, mientras que las alteraciones en la célula T, han revelado una gran variedad de cambios,

como el descenso en el número y función de la respuesta celular tanto *in vivo* como *in vitro* y anomalías en la producción y regulación de distintas citocinas.

JUSTIFICACION

La citopenias en el LEG pueden ser consecutivas a la destrucción periférica por anticuerpos específicos, sin embargo, no siempre se logra tener una explicación precisa y entre las alternativas, debe considerarse algún cambio en el proceso de la hematopoyesis inducido por variación en los niveles de citocinas.

En el LEG, no hay estudios que permitan sostener que alguna alteración en el número y/o función de las células progenitoras primitivas, explique la presencia de citopenias periféricas.

El conocimiento actual de las células pluripotenciales y su marcador CD34, ha permitido observar que esta molécula es de gran utilidad para estudiar los cambios y relevancia de esta población celular en varias condiciones patológicas. Por su parte, las citocinas tienen un papel importante en la regulación de los mecanismos de autoduplicación diferenciación y maduración celular en MO, por lo que el análisis del mRNA de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 IFN- γ , TGF- β y el TNF- α puede ayudar a definir alguna relación.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso cuantificar células con el marcador CD34 mediante citometría de flujo y determinar la presencia del mensajero en células totales de MO, tanto de CD34 como de las citocinas que potencialmente pueden regular el mecanismo de la hematopoyesis.

HIPOTESIS

Las citopenias en el LEG pueden ser explicadas por mecanismos alternativos a los de destrucción periférica producidos por anticuerpos específicos y entre las alternativas debe considerarse alguna anomalía en el proceso hematopoyético, cuyo estudio puede abordarse analizando las células progenitoras pluripotenciales CD34, y las citocinas que modulan su autoduplicación, diferenciación y maduración.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo incluyeron:

- a) Cuantificar las células pluripotenciales CD34 en MO de pacientes con LEG con alguna citopenia periférica y,
- b) Medir el mRNA de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β e IFN- γ así como de CD34 en MO de dichos pacientes.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES Y CONTROLES

Se incluyeron 16 pacientes, quienes fueron estudiados consecutivamente en los Departamentos de Hematología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". Todos ellos fueron seleccionados en base a los criterios de clasificación de LEG descritos por el Colegio Americano de Reumatología (41). Además del diagnóstico de LEG, estos pacientes presentaron alguna citopenia, que de acuerdo a los parámetros internacionales se manifestaron con los siguientes datos: hemoglobina inferior a 10 g/dl, leucocitos menores de $4 \times 10^9/l$, linfocitos por abajo de $1.5 \times 10^9/l$, neutrófilos totales menores de $1.5 \times 10^9/l$ ó cuenta de plaquetas inferior de $100 \times 10^9/l$.

Los criterios del Colegio Americano de Reumatología, para la clasificación de LEG son:

1. Eritema malar, definido como enrojecimiento cutáneo en regiones malares: eritema fijo, elevado o plano, que tiende a preservar los pliegues nasolabiales.
2. Lupus discoide: placas eritematosas, elevadas, con áreas de cicatrización con hiperqueratosis y tapones córneos; puede haber cicatrices atróficas en lesiones antiguas.
3. Fotosensibilidad: eritema cutáneo como resultado de una reacción inusual a la exposición solar, identificado por el médico o como parte de la historia aportada por el paciente.
4. Úlceras orales: úlceras orales o nasolabiales, usualmente indoloras observadas por un médico.
- 5.- Artritis: artritis no erosiva que afecta 2 o más articulaciones periféricas, con dolor, aumento de volumen o derrame articular.
6. Serositis, definido como un proceso inflamatorio de membranas serosas: a) pleuritis: una historia de dolor torácico, tipo pleurítico o frote pleural percibido por un médico, o evidencia de derrame pleural, o b) pericarditis, entendido como la inflamación del pericardio, documentada por un electrocardiograma o frote, o evidencia de derrame pericárdico.

7. Alteración renal consistente en: a) proteinuria persistente de más de 5 g/día (o ++++) o b) cilindros celulares que pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.

8. Alteración neurológica: a) convulsiones o b) psicosis, ambas en ausencia de una causa conocida por ejemplo uremia, desequilibrio hidro-electrolítico.

9. Alteraciones hematológicas: a) anemia hemolítica con reticulocitosis; b) leucopenia menor a $4 \times 10^9/l$ leucocitos en 2 o más ocasiones; c) linfopenia menor a $1.5 \times 10^9/l$ linfocitos en 2 o más ocasiones y d) trombocitopenia menor a $100 \times 10^9/l$ plaquetas en 2 o más determinaciones.

10. Alteraciones inmunológicas: a) presencia de células L.E. (lupus eritematoso); b) títulos anormales de anticuerpos contra DNA nativo; c) presencia de anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm; d) VDRL (venereal disease reaction látex) falso positivo durante al menos 6 meses, con prueba confirmatoria de FTA (fluorescent treponemal assay) negativa.

11. Anticuerpos antinucleares: título anormal de anticuerpos antinucleares mediante inmunofluorescencia o alguna técnica equivalente en cualquier momento de la enfermedad en ausencia de fármacos que pudieran causar su elevación.

Se clasificará como LEG aquel paciente que reúna 4 o más de los criterios. Los criterios de actividad para LEG que se consideraron para evaluar esta condición fueron los del MEX-SLEDAI (42).

En el grupo control se incluyeron individuos clínicamente sanos captados del programa de transplante de MO, quienes no tuvieran antecedentes de haber recibido ningún tipo de tratamiento, incluyendo la aplicación de CSF-GM. Además, en todos ellos se excluyó la presencia de enfermedades hematológicas primarias y otras alteraciones que pudieran afectar la MO.

Antes de proceder con el trabajo, se obtuvo la autorización por escrito de cada paciente, para ser incluido en el protocolo y obtener 5 ml de MO. Esta petición se realizó antes del procedimiento siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki (43).

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

OBTENCION DE LA MUESTRA DE MEDULA OSEA (MO)

En todos los pacientes y controles se obtuvieron muestras de MO mediante punción de cresta ilíaca.

Una vez obtenida la muestra, se colocó en condiciones de esterilidad, en un tubo nuevo con heparina (25 UI/ml). Una porción de la muestra fue destinada al estudio de citometría de flujo y una alícuota de 4 ml de la muestra, se separó en un tubo de policarbonato siliconizado para congelarlo inmediatamente a -70°C (Revco).

CUANTIFICACION DE LAS CELULAS CD34

Se realizó mediante el método de citometría de flujo (44,45). Para ello, se partió de 1 ml de MO, al cual se le adicionaron 9 ml de PBS-albúmina (fracción V de albúmina sérica bovina) (Sigma Co) y se mezcló en un agitador vórtex. En seguida se centrifugó durante 3 minutos a 1500 x g a temperatura ambiente y después de eliminar el sobrenadante se resuspendió el botón para proceder a cuantificar las células nucleadas. Esta cuenta se realizó con una pipeta para glóbulos blancos aforando con solución de Turck y se realizó el conteo celular en una cámara de Newbauer.

Para proceder a la citometría, se ajustaron las células nucleadas a una concentración de 1×10^6 cel/ml por tubo y se incubó por una hora a 4°C, con cada anticuerpo monoclonal marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con ficoeritrina (PE) (Becton-Dickinson). Posteriormente se lavó con PBS-albúmina mediante centrifugación a 1200 x g por 10 minutos. A continuación se adicionó una solución de lisis que contiene cloruro de amonio, EDTA y carbonato de sodio y se incubó 10 minutos a 37°C; se lavó 2 veces con PBS-albúmina centrifugando a 1200 x g por 4 minutos y el botón se resuspendió en 1 ml de PBS, a partir del cual se realizó el análisis en un citómetro de flujo (Cytoron Absolute, Ortho), registrando el número de células que mostraron fluorescencia positiva.

Las células CD34 se cuantificaron de acuerdo al protocolo de Milán (46). Para ello se introdujo al citómetro de flujo el tubo control de isotipo (células marcadas con AcMo IgG FITC/PE). En este caso se fijó en el eje "Y" del citograma la dispersión frontal (tamaño) y en el eje "X" la dispersión lateral (granulación). A continuación se creó una ventana adicional que permitió incluir a todas las células con marcaje con excepción de los eritocitos y los restos celulares.

En la siguiente fase se introdujo el segundo tubo conteniendo las células marcadas con el AcMo anti-CD45 FITC/CD14 PE y se fijó en el eje "Y" la fluorescencia y en el eje "X" la dispersión lateral, generando una ventana para localizar las células con mayor intensidad de fluorescencia y menor granulación. Sin modificar los ejes, se introdujo el tubo que contenía las células marcadas con el AcMo anti-CD34 FITC/CD33 PE y considerando la ventana creada con el segundo tubo se logró cuantificar la población CD34. El porcentaje de células CD34 y CD33 se obtuvo creando un citograma de doble fluorescencia, para lo cual se empleó tanto anticuerpos anti-CD34 marcados con FITC, como anticuerpos anti-CD33 marcados con PE.

Con un cuarto tubo (células marcadas con AcMo CD19 FITC/CD5 PE) se analizaron las células T y B empleando un citograma de doble fluorescencia.

El número de células por μl a partir de la muestra total, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{células CD34}/\mu\text{l} = \frac{(\text{No. de células CD34}^*) (\text{células nucleadas}/\mu\text{l de la MO})}{(\text{total de células analizadas})}$$

*cuenta total de células en el histograma granulación contra tamaño

En los grupos de estudios estas variables se analizaron calculando la media, desviación estándar y error estándar (EE).

DETECCION DE CD34 Y CITOCINAS

EXTRACCION DEL RNA

Para detectar la presencia de la molécula CD34, así como de las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β e IFN- γ se realizó la extracción de RNA total de la muestra de MO (47).

La extracción del RNA se realizó mediante el método de isotiocianato de guanidina (48), empleando las células de MO, a las cuales se les adicionó 1 ml de Trizol (Gibco-BRL) por cada 1×10^6 células. Este preparado se homogeneizó con vórtex y por cada ml de la mezcla se adicionaron 200 μ l de cloroformo, la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó 5 minutos a 4°C para posteriormente centrifugar a 12 000 x g durante 15 minutos a 4°C. Con este procedimiento se separó la fase orgánica que contenía el DNA y proteínas en el fondo y el RNA en la parte superior, el cual formó una fase acuosa. Este volumen se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, al cual se le agregó isopropanol en proporción 1:1 agitando vigorosamente e incubando durante 15 minutos a 4°C para obtener el precipitado de RNA. La suspensión se centrifugó a 12 000 x g por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se eliminó con una punta estéril. El botón se lavó con 800 μ l de etanol al 75% enfriado previamente a -20°C y se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C. Al término de este paso, el sobrenadante se eliminó y el botón se secó con un sistema de condensación (SAVANT). El botón se resuspendió en 20 μ l de agua-DEPC y se calentó a 55°C por 15 minutos. Para cuantificar la concentración de RNA se empleó un equipo comercial (GENE QUANT, Pharmacia) y para identificar el RNA constitutivo 18s y 28s, se ajustó a 1 μ g/ μ l y se realizó electroforesis en un gel de acrilamida al 40% (49) en el que se empleó un marcador de peso molecular como referencia.

Una vez obtenido y cuantificado el RNA se realizó el procedimiento de la transcriptasa reversa para obtener el cDNA. Se tomó de 1 a 5 μ g de RNA total y se adicionó 1 μ l de oligo dT (500 ng/ml) (Gibco BRL), 12 μ l de agua-DEPC. A continuación se calentó la mezcla a 70°C 10 minutos y se colocó inmediatamente en hielo. En seguida se adicionaron 4 μ l de amortiguador 5x (KCl 375 mM, Tris

HCl 250 mM, MgCl₂ 15 mM), así como 2 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de dNTP (10mM) y se mezcló e incubó a 42°C por 2 minutos adicionando 1 µl de Super script II (Gibco BRL). Posteriormente se mezcló y se incubó a 42°C por 50 minutos y para inactivar la reacción se calentó a 70°C por 15 minutos. El RNA restante se eliminó con 1 µl de RNAsa (1 U/µl) mediante la incubación a 37°C 20 minutos. Al final se almacenó la muestra a -70°C hasta su uso en el RT-PCR.

RT-PCR PARA CD34 Y CITOCINAS

Para cada una de las muestras se realizó la determinación de CD34 y las siguientes citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, TGF-β e IFN-γ. Este estudio se efectuó a partir del cDNA obtenido por retrotranscripción (50). Para ello se utilizaron 5 µl de amortiguador de PCR 10x, 5 µl de mezcla de dNTP (10mM), 3 µl de MgCl₂ (50 mM), 3 µl (0.5 µM) de los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para CD34 y cada una de las citocinas. El RNA total de las muestras de MO, se empleó a una concentración de 1 µg. También se adicionó 0.5 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/µl), 25.5 µl de agua-DEPC y 50 µl de aceite mineral (Nujol) para obtener un volumen final de 100 µl, los cuales se procesaron en un termociclador (PERKIN ELMER DNA Thermal Cyclor 480) (51,52). Como control del RT-PCR, se realizó la determinación del GADPH, que es un producto constitutivo. Este estudio se efectuó en todas las muestras, incluyendo a pacientes y controles sanos.

El equipo de PCR se programó de la siguiente manera: 94°C 5 minutos, 40 ciclos 94°C un minuto, 60°C 45 segundos y 72°C un minuto y 1 ciclo, 72°C 5 minutos. Para obtener las condiciones óptimas de la temperatura media de alineamiento, se empleó la siguiente formula:

$$T_m = 2(T+A) + 4(G+C)$$

Para confirmar la amplificación del DNA, se realizó una electroforesis en acrilamida al 4% en una cámara vertical (Bio-Rad Mini-PROTEAN II), en un amortiguador de Tris Boratos EDTA (TBE I X) manteniendo un voltaje constante (100 volts) por 2 horas. Al cabo de este proceso, se realizó una tinción del gel con

bromuro de etidio (0.01%) y se observó el patrón de corrimiento en un transiluminador de luz UV (Hoefer Scientific Instruments), utilizando como referencia un marcador de peso molecular READY-LOAD 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL). El registro de esta electroforesis se realizó mediante una impresión fotográfica con una cámara Polaroid (DS34).

Para la determinación de CD34 y las citocinas, se utilizaron oligonucleótidos específicos cuya secuencia se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

SECUENCIA Y CARACTERISTICAS DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS PARA CD34 Y CITOCINAS

Citocinas o marcador	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Tamaño del producto amplificado
CD34	5'CTCTTCTGTCCAGTCACAGACC3'	5'GAATAGCTCTGGTGGCTTGT3'	540 pb
IL-2	5'GTCACAAACAGTGCCACCTAC3'	5'ATGGTTGCTGTCTCATCAGC3'	458 pb
IL-4	5'TGCCTCCAAGAACACCAACTG3'	5'AACGTACTCTGGTTGGCTTC3'	456 pb
IL-6	5'TCAATGAGGAGACTTGCCTG3'	5'GATGAGTTGTCATGTCCTGC3'	260 pb
IL-10	5'AAATTTGGTTCTAGGCCGGG3'	5'GAGTACAGGGGCATGATATC3'	264 pb
TNF- α	5'ACAAGCCTGTAGCCCATGTT3'	5'AAAGTAGACCTGCCAGACT3'	427 pb
TGF- β 1	5'TTTCGCCTTAGCGCCCCACTG3'	5'TCCAGCCGAGGTCCTTGCGG3'	465 pb
IFN- α	5'GCAGAGCCAAATTGTCTCT3'	5'ATGCTCTTCGACCTCGAAAC3'	290 pb
GADPH	5'TGAAGGTGCGGAGTCAACGGATTGGT3'	5'CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC3'	110 pb

ANALISIS ESTADISTICO

La comparación de los resultados entre los grupos con LEG y controles, en cuanto a la determinación de las células CD34, se realizó mediante la prueba de U de Mann Whitney (53), que evalúa 2 grupos independientes a partir de poblaciones que no tienen una distribución normal.

El estudio de correlación entre la cuantificación de las células CD34 y las variables hematológicas, que incluyeron hemoglobina, leucocitos, neutrófilos y plaquetas se realizó mediante una prueba correlación de Spearman (53), la cual estima la medida de asociación entre 2 grupos de valores ordinales que pueden variar concomitantemente.

La diferencia en cuanto a la frecuencia de las citocinas en los grupos de estudios fue analizada mediante una prueba exacta de Fisher (53), que permite analizar datos discretos (ordinales o nominales) a partir de muestras independientes pequeñas que pertenecen a clases mutuamente excluyentes.

En todos los casos se consideró como una prueba estadísticamente significativa, siempre y cuando el nivel de probabilidad alcanzara un valor menor o igual de 0.05.

RESULTADOS

CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO

Los pacientes estudiados reunieron los criterios de clasificación de LEG de acuerdo a las propuestas realizadas por el Colegio Americano de Reumatología (41).

Siguiendo los parámetros que evalúan la presencia de actividad o remisión de la enfermedad reportados previamente (Mex-SLEDAI) (42) y tomando en consideración el tratamiento médico al momento de su inclusión, se dividieron a los pacientes en los siguientes grupos:

Grupo I. Dos pacientes con LEG activo sin tratamiento previo,

Grupo II. Cinco pacientes con LEG activo tratados con prednisona (PDN), y

Grupo III. Nueve pacientes con LEG activo tratados con prednisona y/o hidrocortisona, antimetabolitos o alquilantes.

El grupo control estuvo constituido por 11 individuos clínicamente sanos del programa de donadores de trasplante de MO.

La presencia de citopenias se evaluó de acuerdo a los parámetros de inclusión de este trabajo, que tuvieron como fundamento los criterios del Colegio Americano de Reumatología (41) y ocurrieron en todos los pacientes con LEG.

El análisis de las variables hematológicas reveló que los 16 pacientes con LEG mostraron al menos un valor disminuido a partir del estudio de la biometría hemática. La mayor parte de los casos mostró (n=13) descenso de hemoglobina y le siguieron en orden de frecuencia la plaquetopenia, linfopenia (n=10) y la leucopenia (n=9). En contraste ningún control sano presentó este tipo de anormalidades.

Los resultados individuales de la biometría hemática de los pacientes con LEG en relación al grupo al que pertenecían se muestran en la siguiente tabla (tabla 2)

TABLA 2**CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON LEG**

Paciente	Patología	Terapia	Hemoglobina g/dl 12.5-16 fem*	Leucocitos $10^9/l$ 4-10.9*	Neutrófilos $10^9/l$ 1.4-6.5*	Linfocitos $10^9/l$ 1.2-3.4*	Plaquetas $10^9/l$ 150-450*
1	LEG	PDN	10.3	1.4	0.2	0.8	115
2	LEG	PDN/AZA	6.5	3.4	1.2	1.8	204
3	LEG	PDN/AZA	8.9	12.4	9.3	2.3	9
4	LEG	PDN/MT	7.5	3.1	2.4	0.5	21
5	LEG	PDN/AZA	9.9	1.9	0.5	1.1	12
6	LEG	PDN/AZA	6.8	1.2	0.8	0.4	11
7	LEG	SIN TRAT.	9.0	5.1	3.0	1.5	412
8	LEG	SIN TRAT	11.3	3.7	2.9	0.6	148
9	LEG	PDN/CLQ/AZA	12.2	2.4	1.0	1.0	249
10	LEG	PDN/AZA	10.3	7.9	6.2	1.1	30
11	LEG	PDN/AZA	13.8	3.3	1.9	0.8	61
12	LEG	PDN/AZA	9.0	5.0	4.1	0.6	177
13	LEG	PDN	14.9	6.2	4.1	1.3	262
14	LEG	PDN	15.4	6.6	4.0	6.7	19
15	LEG	PDN	11.2	6.0	1.0	ND	112
16	LEG	PDN	11.7	2.2	1.4	0.6	224

LEG: lupus eritematoso generalizado; PDN: Prednisona; AZA: Azatioprina; CLQ: Cloroquina SIN TRAT: sin tratamiento. ND: no determinado, fem valores de referencia para mujeres, *Valores de referencia

Al analizar los datos de la citología hemática de nuestro grupo control, no se encontró ningún dato por debajo de los valores de referencia.

ESTUDIO CITOMORFOLOGICO DE MEDULA OSEA.

Las características celulares de la MO de los pacientes con LEG, fueron analizadas en frotis teñidos con colorante de Wright, lo cual mostró resultados heterogéneos. Siete de los pacientes mostraron incremento del número total de células de MO (hipercelularidad), 3 descenso en el número total de dichas células

(hipocelular) y 3 mostraron tener cifras normales (normocelulares), tomando como valores de referencia las cifras aceptadas internacionalmente. La cuenta diferencial mostró que 2 casos presentaron elevación de neutrófilos jóvenes y adultos. En 2 enfermos aumentó la proporción de eosinófilos, y en 6 enfermos se documentó disminución de linfocitos. Fue interesante encontrar que algunos pacientes presentaron incremento de células plasmáticas e incluso un caso mostró blastos, adicionalmente ningún enfermo mostró evidencias de aplasia medular. Los valores individuales obtenidos mediante el estudio citológico, se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

CARACTERISTICAS DE LA CITOLOGIA DE MO DE LOS PACIENTES CON LEG

Paciente	Megacariocitos	Normoblastos (%)	Linfocitos (%) (0-26)*	Monocitos (%) (0-6)*	Neutrófilos Jóvenes (%) (12-34)*	Neutrófilos Adultos (%) (0-32)	Eosinófilos (%) (0-6)*	Células Plasmáticas (%) (0-2)*	Blastos (%) (0-3)*	Abundancia celular
1	N	22	5	1	44	26	2	--	--	↓+
2	N	42	6	--	27	20	3	2	--	↑+++
3	N	46	9	1	24	16	3	1	--	↑++
4	N	31	9	--	21	35	1	3	--	N
5	↑+	23	25	--	42	5	3	2	--	↓+
6	N	2	3	--	23	70	1	--	1	↓+++
7	N	38	7	--	20	28	2	4	--	↑+
8	↑+	20	19	--	26	25	8	2	--	↑+
9	N	33	8	1	25	23	8	2	--	N
10	↑+	30	8	--	27	30	4	1	--	N
11	N	22	5	--	29	39	3	2	--	↑+
12	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
13	NV	22	1	--	25	40	--	--	--	NV
14	↑+++	30	4	--	24	34	--	3	--	↑+
16	↑+	35	6	--	25	34	--	--	--	↑+

↑: Aumentado, ↓: Disminuido, N: Normal, NV: No valorable, NR: no realizado, *Pronormoblastos 11%,
 *Valores de referencia, (--) Variable no encontrada en la citomorfología.

DETERMINACION DE CELULAS CD34

Al estudiar los pacientes con LEG como un solo grupo, se encontró descenso de los niveles de células CD34/ μ L en MO ($n=16$, $X\pm EE$ 56 ± 7.85) en comparación con el grupo control ($n=9$ $X\pm EE$ 131 ± 11.15) ($p= 0.05$), sin embargo al observar que uno de los valores del grupo control superaba la tendencia general, se realizó un análisis excluyendo este valor ($n=8$, $X\pm EE$ 95.22 ± 7.58), lo que resultó en una falta de significancia estadística.

Cuando se analizaron los resultados considerando el tratamiento médico que recibieron los pacientes, se encontró lo siguiente:

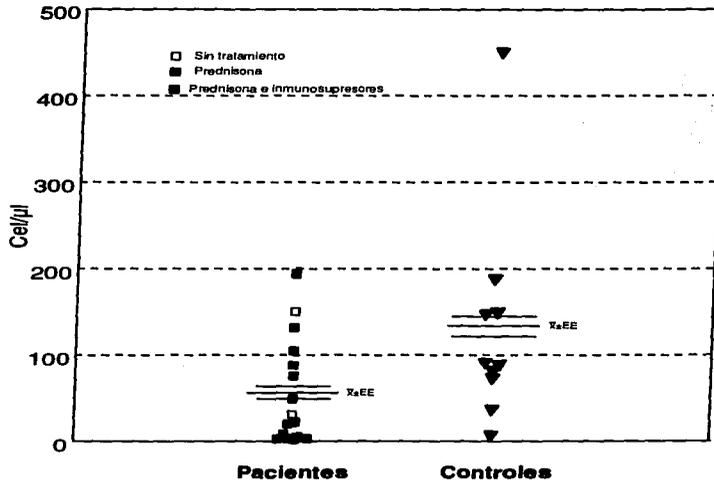
Solo 2 pacientes con LEG activo (uno tratado y el otro sin tratamiento) superaron la media del grupo de referencia (figura 1).

Al valorar el grupo con LEG sin tratamiento, se observó que la media ($n=2$, $X\pm EE$ 91 ± 9.2) ($p=$ no significativa, N.S.) quedó por abajo del grupo control (figura 2).

La cuantificación de las células CD34 en los pacientes con LEG que recibieron tratamiento con prednisona, mostró una disminución en el número de estas células, notando que su media ($n=6$, $X\pm EE$ 47 ± 7.3) fue menor que en el grupo control ($n=9$, $X\pm EE$ 131 ± 11.15) ($p=$ N.S.), como se aprecia en la figura 3.

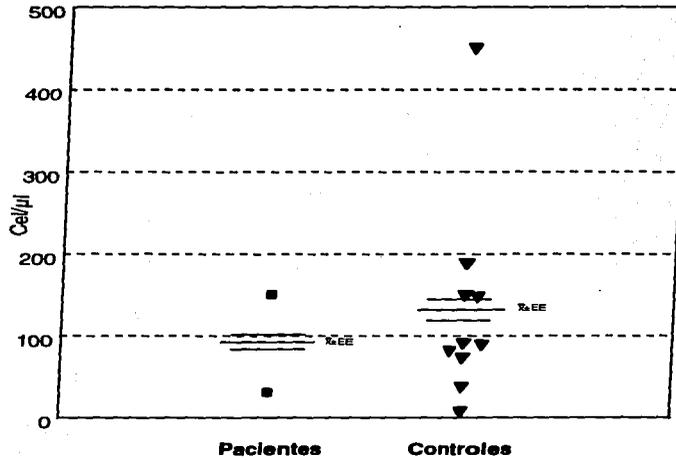
Por su parte el grupo tratado con prednisona e inmunosupresores presentó cifras menores ($n=8$, $X\pm EE$ 53 ± 8.2) ($p=$ N.S.) que el grupo de referencia (figura 4).

**Figura 1. Determinación de CD34+
en Lupus Eritematoso Generalizado**



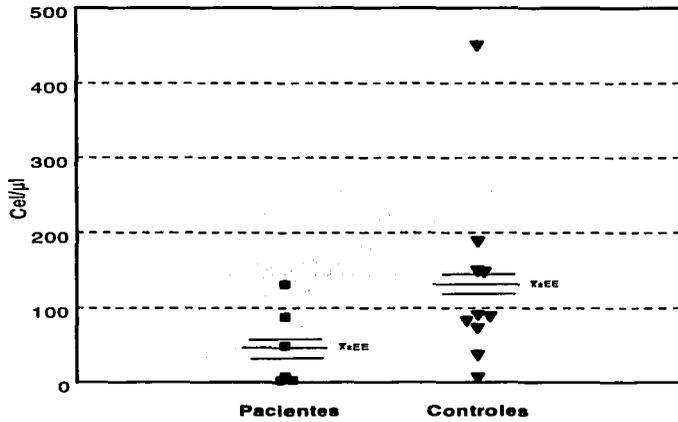
La $\bar{x} \pm EE$, se señala con las líneas horizontales

**Figura 2. Determinación de CD34+
en Lupus Eritematoso Generalizado
(sin tratamiento)**



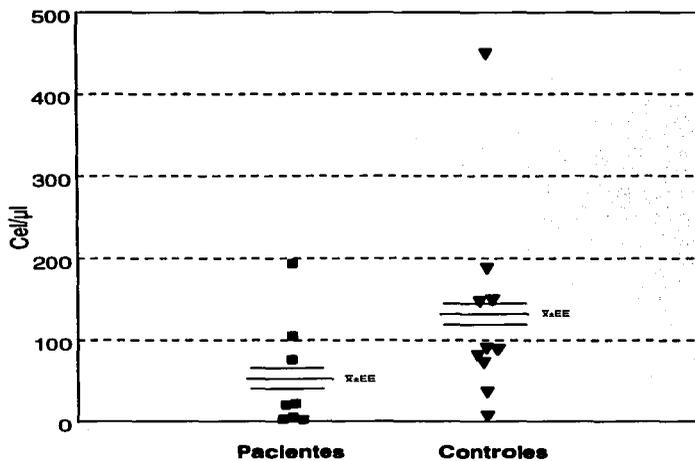
La $\bar{x} \pm EE$, se señala con líneas horizontales

**Figura 3. Determinación de CD34+
en Lupus Eritematoso Generalizado
(tratamiento con prednisona)**



La $\bar{x} \pm EE$, se señala con líneas horizontales

**Figura 4. Determinación de CD34+
en Lupus Eritematoso Generalizado
(tratamiento prednisona e Inmunosupresores)**



La $\bar{x} \pm EE$, se señala con líneas horizontales

RELACION ENTRE CELULAS CD34, VARIABLES HEMATOLOGICAS Y RESULTADOS EN MO

Al analizar los resultados obtenidos mediante FACS se obtuvieron cifras de CD34 expresadas en células/ μ l, que mostraron una correlación con las variables hematológicas. Se apreció una relación significativa entre el descenso del número de células CD34 y la disminución del valor de hemoglobina ($r=0.86$), leucocitos ($r=0.86$), así como de plaquetas ($r=0.86$), en los pacientes lúpicos tratados con prednisona, mientras que en el grupo con LEG tratado con prednisona e inmunosupresores y en los controles no hubo correlación alguna. El pequeño número de casos con LEG sin tratamiento, impidió este tipo de análisis en dicho grupo (tabla 4).

TABLA 4
CORRELACION ENTRE CELULAS CD34 Y VARIABLES HEMATOLOGICAS EN LEG Y CONTROLES

	CD34 (cél/μl)	Hb (g/dl)	Leucocitos ($10^9/l$)	Plaquetas ($10^9/l$)
Lupus sin trat.	31-151	9.0-11.0	3.7-5.1	148-412
n=2/*r=		NV	NV	NV
Lupus PDN	3-49	10.3-14.9	1.4-6.2	115-262
n=6/*r=		0.86	0.86	0.86
Lupus PDN-O	2-194	6.5-15.4	1.2-12.4	9-249
n=9/*r=		0.09	0.10	0.68
Controles	6-449	6.3-13.8	1.3-23.9	53-120
n=11/*r=		0.39	0.03	0.25

Trat: tratamiento, PDN: prednisona, PDN-O: prednisona-otros, citotóxicos, *: Correlación de Sperman, NV: No valorable.

DETERMINACION DE OTROS MARCADORES

Al realizar el marcaje de las células de las MO para la población CD34, se estudiaron en forma independiente otras poblaciones celulares. Esta determinación se efectuó a partir de un citograma de doble fluorescencia, las poblaciones marcadas fueron CD33, CD45, CD14, CD19 y CD5 que se expresaron como células/ μ l. Las células del linaje mieloide que presentan en su superficie el antígeno CD33 se observó disminuida en el grupo de lupus, en comparación con el grupo control ($p=0.006$). Estos resultados fueron similares a los encontrados para el antígeno CD34 (Tabla 5). Este mismo fenómeno se manifestó con el marcador de leucocitos CD45 y el grupo de sanos presentó cifras mayores, que el grupo de pacientes en quienes se encontró descenso de esta población ($p=0.03$). Para los antígenos CD14, (marcador de monocitos-granulocitos) ($p=0.095$), CD19 (marcador de células B) ($p=0.08$) y CD5 (marcador de células T) ($p=0.46$), no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio, la media se mantuvo homogénea en ambas poblaciones ($p=N.S.$).

TABLA 5

DETERMINACION DE OTROS MARCADORES EN MO

	LEG	CONTROLES	(p<)
	(media\pmEE)	(media\pmEE)	
CD34 (cel/ μ l)	56 \pm 7.85	131 \pm 11.15	0.05
CD33 (cel/ μ l)	213 \pm 61.2*	1382 \pm 41.8	0.006
CD45 (cel/ μ l)	2723 \pm 61.2*	4847 \pm 63.2	0.03
CD14 (cel/ μ l)	164 \pm 16.3*	164 \pm 16.3	N.S.
CD19 (cel/ μ l)	179 \pm 18.1*	160 \pm 13.1	N.S.
CD5 (cel/ μ l)	642 \pm 28.2*	708 \pm 21.9	N.S.

*(n=14), no se estudiaron en 2 pacientes con LEG (uno de ellos tratado con PDN y otro PDN-O), EE. Error estándar, N.S. No significativa

ESTUDIO DE CD34 POR PCR

La determinación de CD34 a partir del cDNA obtenido de las muestras de MO no mostró diferencias entre el grupo de enfermos comparada con los controles. Sin embargo, es importante recordar que mediante nuestro sistema de PCR, no se logró realizar una determinación cuantitativa. La identificación del corrimiento electroforético de CD34, correspondió a 540 pb en un gel de acrilamida al 40% y difirió claramente de los resultados de las citocinas estudiadas, de acuerdo al perfil de corrimiento comparativo.

DETERMINACION DE CITOCINAS

En cuanto al perfil de citocinas, fue interesante el hallazgo de que la IL-2 ocurrió en un bajo porcentaje tanto en LEG como en el grupo control. Al comparar la presencia de IL-4 e IL-6 se encontró que la frecuencia fue muy semejante en los grupos de estudio. La IL-4 ocurrió en el 18.8% de los pacientes con LEG y el 18.2% de los controles y la IL-6 estuvo presente en el 25% de los casos con LEG y el 27.7% de los controles. Los resultados para TNF- α y TGF- β fueron muy semejantes para el grupo de los pacientes con LEG (56.3%, 56.3%) mientras que para el grupo control hubo mayor variación (54.5% y 63.6% respectivamente).

En contraste, solo se apreció diferencia para la IL-10, cuyo porcentaje de positividad difirió claramente entre el grupo con LEG y los controles. La IL-10 en pacientes lúpicos se encontró en el 87.5% de los casos mientras que para el grupo control este resultado fue de 45.5% ($p=0.02$). Al analizar los grupos de LEG en cuanto a las modalidades de tratamiento no se apreciaron diferencias, ya que todos los pacientes sin tratamiento y todos aquellos tratados con prednisona, así como 7 de 9 de los casos con prednisona e inmunosupresores presentaron incremento de IL-10.

En relación al IFN- γ , la frecuencia fue ligeramente mayor en el grupo control (36.3%), que en los pacientes con LEG (25%) ($p= N.S.$). Estos datos se pueden apreciar en las tablas 6 y 7.

TABLA 6**PRESENCIA DE CITOCINAS Y CD34 EN PACIENTES CON LEG**

Paciente	Terapia	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	CD34
1	PDN	-	+	-	+	-	+	-	+
2	PDN/AZA	-	-	+	+	+	+	+	+
3	PDN/AZA	-	-	+	+	+	-	-	+
4	PDN/MT	-	-	-	+	-	+	-	+
5	PDN/AZA	-	-	-	+	+	+	-	+
6	PDN/AZA	-	+	-	-	-	+	-	+
7	SIN TRAT.	-	-	-	+	-	+	-	+
8	SIN TRAT	-	-	+	+	+	-	-	+
9	PDN/CLQ/AZA	-	-	-	-	-	-	-	+
10	PDN/AZA	-	-	-	+	+	+	-	+
11	PDN/AZA	-	-	-	+	-	-	+	+
12	PDN/AZA	-	+	-	+	+	-	-	+
13	PDN	-	-	+	+	+	-	-	+
14	PDN	-	-	-	+	-	+	-	+
15	PDN	-	-	-	+	+	-	+	+
16	PDN	-	-	-	+	+	+	+	+
Positivos (%)		0	18.8	25	87.5	56.3	56.3	25	100

TABLA 7**PRESENCIA DE CITOCINAS Y CD34 EN EL GRUPO CONTROL**

Paciente	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	CD34
1	-	+	-	+	+	+	-	+
2	-	-	-	-	+	+	-	+
3	-	-	-	-	+	+	-	+
4	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	+
8	-	-	+	+	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	+	+	-	+	+
11	-	+	-	+	-	+	-	+
Positivos (%)	0	18.2	27.7	45.5	54.5	63.6	36.3	100

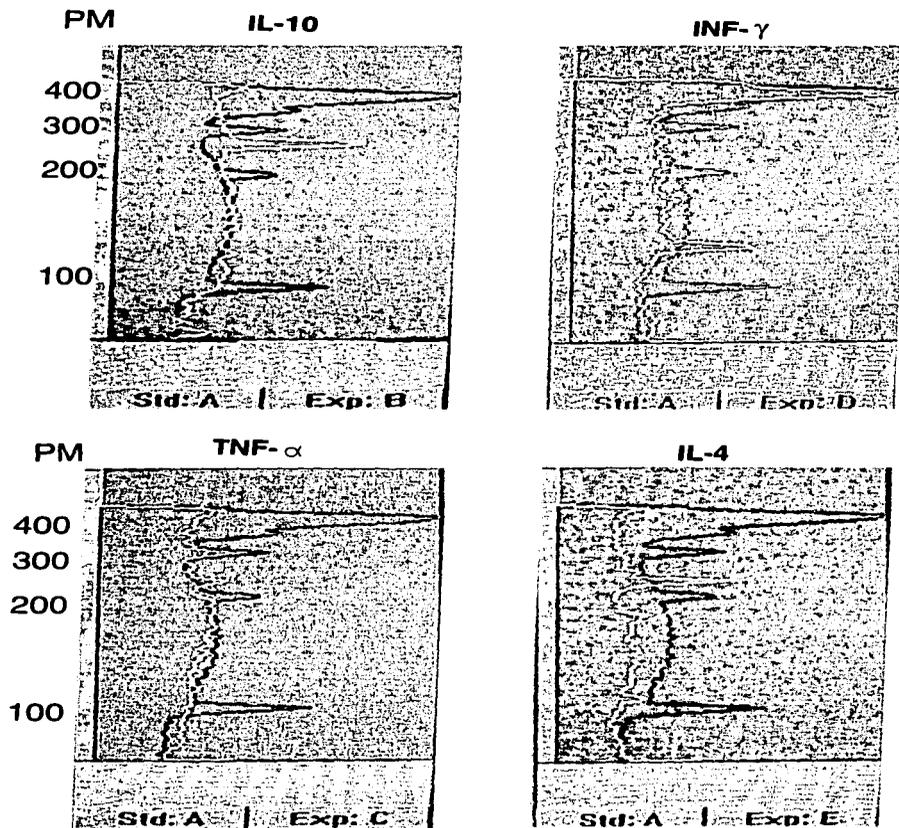
ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Una vez que se amplificó el DNA y se realizó la electroforesis de la citocinas, se procedió al análisis de su corrimiento mediante un programa de cómputo (1D Windows Software System, Kodak). Para ello, se empleó como referencia un marcador de peso molecular comercial (Low DNA Mass Ladder, Gibco-BRL) que permitió identificar bandas de 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb.

Al realizar este procedimiento se logró observar que la migración en gel de acrilamida al 40% del amplificado de DNA de cada una de las citocinas coincidió con el peso molecular esperado.

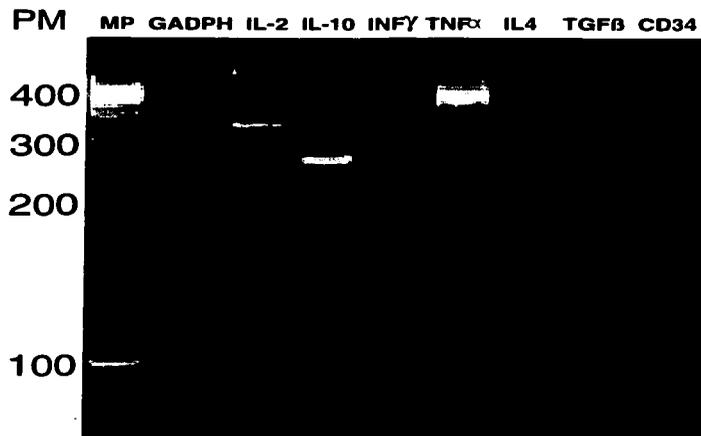
En las figuras 5 y 6 se muestran prototipos del análisis realizado para las distintas citocinas, apreciando que el perfil obtenido con los marcadores de peso (Low DNA Mass Ladder, Gibco-BRL) (Std) mediante el estudio de una dimensión permitió tener una referencia precisa para determinar el peso molecular del amplificación de las citocinas estudiadas (Exp). En la figura 6 se muestra la imagen típica del corrimiento electroforético de los marcadores de peso, así como de las diferentes citocinas y de CD34 que fueron estudiadas en este trabajo.

Figura 5. Análisis del peso molecular del DNA amplificado para cada citocina



Línea oscura: marcadores de peso
Línea clara: muestras de paciente o controles

Figura 6. Identificación del DNA amplificado mediante PCR



MP: Marcadores de peso

DISCUSION

La disminución de las cifras de los elementos formes sanguíneos a nivel periférico, se manifiesta a través de distintos tipos de citopenias. En el LEG, estos cambios son frecuentes e importantes y pueden producir anemia, leucopenia, linfopenia, neutropenia o plaquetopenia.

Los mecanismos fisiopatogénicos que pueden explicar la presencia de citopenias en el LEG incluyen aquellos que dependen directamente del mecanismo autoinmune en el que puede participar una destrucción periférica, o bien los causados por complicaciones consecutivas de la enfermedad, como la insuficiencia renal o lesiones microvasculares que pueden ocasionar citopenias en ocasiones indistinguibles de aquellas causadas por anticuerpos.

El estudio de las alteraciones hematológicas y particularmente de las citopenias en esta enfermedad autoinmune, ha logrado demostrar que el descenso de los elementos formes sanguíneos puede ser debido a la producción de anticuerpos específicos contra epítopes de eritrocitos, leucocitos, plaquetas o linfocitos que favorecen su destrucción por activación de la cascada del complemento y/o mediante su atrapamiento y eliminación en el sistema fagocítico mononuclear, especialmente en bazo e hígado (38).

En pocos estudios se sustenta alguna alteración en las células y/o componentes de la MO, o bien en el proceso mismo de la hematopoyesis. Particularmente, se carece de datos que demuestren fehacientemente la participación de alguna anomalía en el número y/o función de los progenitores pluripotenciales o alteraciones en las citopenias que pueden regular los mecanismos de diferenciación y maduración (54).

En este estudio, como en otros reportes (40) no logramos demostrar alguna alteración específica mediante el estudio citomorfológico convencional de MO. Los resultados fueron heterogéneos, encontrando cifras variables de megacariocitos, normoblastos, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas. En cuanto a la abundancia celular fue variable, pues hubo tanto hipocelularidad como hipercelularidad y aún reportes de pacientes sin tales

cambios. El hallazgo de hipocelularidad no se relaciono con pancitopenia ni otros datos sugerentes de mielofibrosis, hipoplasia o transformación gelatinosa en MO, las cuales han sido descritas como causas de citopenias periféricas en el LEG (55). Además, en general los resultados citomorfológicos de MO no mostraron una asociación específica con el tipo y/o grado de citopenia, ni con la modalidad de tratamiento de los pacientes.

Las células CD34 están plenamente caracterizadas como los precursores pluripotenciales en el mecanismo de hematopoyesis y diversas evidencias han mostrado que en las enfermedades hematológicas como las leucemias linfocíticas, monocíticas y linfomas puede ocurrir un cambio en el número y/o función de esta población (56). Nuestros resultados en MO mostraron alteraciones cuantitativas que pueden ayudar a explicar, al menos en parte, que la presencia de citopenias periféricas en LEG, puede deberse a alguna anomalía en el proceso hematopoyético.

La disminución de las células CD34 en MO de pacientes con LEG en comparación con los controles fue patente al considerar la totalidad de los casos estudiados encontrando valores estadísticamente significativos sin embargo, cuando excluimos del análisis uno de los valores altos en el grupo control se suprimió la diferencia estadística, aunque la tendencia en la disminución de CD34 en el LEG siguió siendo notoria. Esto sugiere que las células hematopoyéticas pueden presentar alguna anomalía en al menos tres diferentes niveles: a) un defecto primario en el proceso de la generación de los precursores hematopoyéticos; b) un descenso consecutivo a la destrucción por autoanticuerpos en contra de la células hematopoyéticas o debido a su interacción anormal con los componentes de la MEC o mediadores solubles en el microambiente de MO; y c) que estas células hematopoyéticas se encuentren previamente comprometidas hacia un linaje específico con el fin de restablecer los elementos sanguíneos faltantes, lo que puede resultar en un descenso relativo.

Los resultados de este estudio podrían apoyar parcialmente un defecto en la generación de los precursores, al encontrar un descenso paralelo de las células

CD34 y CD33. Por otra parte se puede excluir razonablemente que la célula CD34 esté comprometida hacia algún linaje, ya que si bien hubo un descenso de la población CD45, los porcentaje de células CD19 y CD5 se mantuvieron en límites semejantes a los encontrados en los controles.

Aunque los cambios en las células precursoras hematopoyéticas en el LEG pudieron estar condicionados por el tratamiento médico, no se documentaron resultados contundentes en favor de esta posibilidad. El descenso de las células CD34, CD33 y CD45 ocurrió tanto en los pacientes con LEG que recibieron prednisona, como en aquellos con prednisona e inmunosupresores y solo un caso en este último grupo y un enfermo sin tratamiento, presentaron cifras superiores a la media del grupo control.

Es posible que las alteraciones en el número y/o función de las células CD34, no sean únicos o excluyentes de otros mecanismos que expliquen la presencia de citopenia periférica en el LEG. Indudablemente, una gran variedad de alteraciones pueden ocasionar estos cambios en los elementos formes sanguíneos. En la literatura se han documentado diversos datos en favor de la presencia de alteraciones en la hematopoyesis en enfermedades autoinmunes, especialmente a partir del advenimiento de métodos de estudio a nivel molecular. Se ha reportado la presencia de anticuerpos contra células precursoras en MO y la supresión del crecimiento de los progenitores de las líneas granulocítica y monocítica (23). Los pacientes con LEG que cursan con alguna citopenia, pueden tener una reducción en la granulopoyesis con predominio de células inmaduras y algunos informes han mostrado un descenso de las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) y de sus precursores en MO. Otros autores, han señalado que en estudios *in vitro* se ha logrado identificar un bloqueo en la formación de CFU -E mediante el cocultivo con linfocitos T autólogos o alogénicos provenientes de enfermos lúpicos sin tratamiento. Además, en estudios *in vivo*, se ha mostrado que al emplear sobrenadantes de MO de pacientes con LEG se inhibe la producción de ciertos factores hematopoyéticos (CSF-GM y CSF-G).

Las anomalías en MO no solo parecen jugar un papel importante en la patogénesis de los cambios hematológicos, sino que pueden participar en la generación de otro tipo de daño tisular en los pacientes con LEG (53,57). Algunos estudios, han hecho patente que aún en los casos en los que no es evidente un mecanismo de destrucción periférica de las células sanguíneas, se pueden sustentar distintas alteraciones a nivel de la generación de los precursores inmediatos en MO. Esto puede ocasionar incluso un desbalance en el sistema inmune, sin embargo a la fecha, se carece de suficientes datos que avalen tales propuestas (38).

En cuanto al estudio de la presencia de citocinas en MO, este trabajo ha puesto en evidencia algunos cambios que pueden contribuir tanto a la disfunción de las células progenitoras, como a los cambios de inmunoregulación que caracterizan al LEG.

En estudios previos se ha demostrado contundentemente, que la producción de citocinas en células de sangre periférica de pacientes con diversas formas de autoinmunidad es anormal, lo cual no sólo es parte de los cambios del sistema inmune sino que contribuyen a su desbalance. La disminución en la síntesis de ciertas citocinas, como la IL-2 o el exceso de producción o una inadecuada inhibición de otros productos como la IL-3, IL-4 e IL-5, se han descrito en diversas condiciones autoinmunes y pueden contribuir a la perpetuación de los mecanismos de daño y el desarrollo de una enfermedad crónica como el LEG (53,58).

Nuestro estudio muestra algunos cambios en la frecuencia de algunas citocinas, que han mostrado ser relevantes en la modulación del proceso de la hematopoyesis en MO.

La mayor proporción de IL-10 en pacientes con LEG y el relativo descenso de IFN- γ , en comparación con los controles, son observaciones que pueden ayudar a explicar la presencia de citopenias periféricas y concuerda en algunos aspectos con el patrón de citocinas encontrado en sangre periférica en esta enfermedad. Sin embargo, no debemos olvidar que el análisis de citocinas en MO, refleja la

participación de diferentes componentes y no solo de una población o estirpe celular.

Al estudiar linfocitos de sangre periférica en LEG, se ha encontrado que la producción de citocinas parece favorecer la presencia de una respuesta celular CD4 Th2. En nuestro estudio, la presencia de IL-10 en MO fue detectada en un mayor porcentaje de pacientes lúpicos con citopenias que en el grupo control, lo que es sugerente de esta misma polarización. En estudios recientes en sangre periférica de pacientes con LEG se ha observado la expresión elevada de transcritos de varios genes incluyendo no solo a la IL-4, IL-6 e IL-10 sino al TNF- α , el cual aumenta significativamente en los pacientes con LEG en comparación con los controles sanos (59,60). Estos resultados son particularmente relevantes en el LEG, puesto que las células T, son reguladas por dichas citocinas y su función puede contribuir con el desarrollo de la activación policlonal de las células B y la producción de autoanticuerpos.

El hallazgo de que un bajo porcentaje de pacientes con LEG presentaron IFN- γ , parecería sorprendente tomando en cuenta que la liberación de esta citocina por las células T puede tener una influencia importante en la producción de anticuerpos. Sin embargo, en el caso de MO, debe ser considerarse que la participación del microambiente hematopoyético y especialmente del estroma influyen en este perfil de citocinas.

Al analizar individualmente a las citocinas, se encontró que ninguno de los pacientes con LEG presentaron IL-2 en MO, para lo cual no tenemos una explicación precisa. En sangre periférica el descenso de la expresión de IL-2 se ha relacionado con un defecto en las células T que está en concordancia con una disminución de su respuesta proliferativa y un descenso en la actividad de IL-2. Tampoco encontramos una respuesta a la resultados relativamente heterogéneos de IL-6 y TGF β en MO; pero las alteraciones en estas citocinas pueden relacionarse con el desbalance inmunológico observado en el LEG.

En cuanto a la IL10, ésta parece tener un efecto diametralmente opuesto en el LEG en comparación con otras enfermedades. La gran producción y efectos

patogénicos potenciales de la IL-10 producida por monocitos y células B en el LEG, contrasta con el efecto benéfico que produce en el compartimiento articular de los pacientes con artritis reumatoide. En el LEG domina una acción estimulante en la producción de autoanticuerpos, mientras que en artritis reumatoide la IL-10 inhibe la población Th1. Este efecto de la IL-10 sobre la producción de autoanticuerpos ha sido comprobada recientemente, al transferir células de pacientes con LEG a ratones inmunosuprimidos (61).

Las citocinas generadas en MO, pueden tener una participación relevante en el desbalance inmune que ocurre en el LEG. Se ha observado que en sangre periférica, existe un descenso en la capacidad proliferativa de las células T, una disminución en la actividad de IL-2 y una deficiente producción de IL-1. Esto se ha tratado de explicar a través de un defecto primario de las células CD4, un efecto supresivo en la actividad de IL-2 por células CD8 o anticuerpos específicos contra esta linfocina, así como por la presencia de células T exhaustas activadas *in vivo* o anomalías en la producción de citocinas que modulan estos procesos (62). En todas estas fases, pueden tener un papel importante las citocinas que regulan el proceso hematopoyético en MO.

Otro aspecto que merece ser analizado es la participación de la MEC, la cual puede tener una enorme influencia en el control de la hematopoyesis. Su capacidad de absorber y compartimentalizar los factores solubles dentro del microambiente estromal y de regular la función de la célula hematopoyética pluripotencial (62), depende tanto de las células hematopoyéticas (macrófagos, linfocitos) como de los elementos no hematopoyéticos (fibroblastos, células endoteliales y adipocitos) que directamente o a través de sus productos influyen en la hematopoyesis. La interacción célula-célula y célula-MEC, así como la producción de los factores solubles durante los procesos de proliferación, diferenciación y maduración, mantienen un control estrecho de la célula pluripotencial hematopoyética (63).

Es posible que el estudio de la interacción de la célula progenitora con los componentes de la MEC, pueda ayudar a explicar o evidenciar los cambios en los

precusores hematopoyéticos que expliquen las citopenias periféricas en el LEG. Los elementos del estroma, como proteoglicanos, colágena, hemonectina y otros productos derivados de diversos tipos celulares, influyen definitivamente en el proceso de diferenciación durante la hematopoyesis. Sin embargo, a excepción de algunos reportes aislados que relacionan a la sobreproducción de ácido hialurónico en MO, con citopenias periféricas (56), no hay estudios suficientes que permitan obtener información acerca de la importancia de este tipo de mecanismos patogénicos en el LEG.

Es posible que la colágena, fibronectina, elastina y la laminina tengan un papel importante en las fases iniciales de proliferación y eventualmente sobre los procesos de diferenciación de las células CD34, CD33 o su progenie, como lo han mostrado algunos autores que al realizar cultivos de estas células empleando sistemas que semejan el contenido de proteínas de la MEC, han obtenido una transición hacia los linajes linfóide y mielóide, independientemente del empleo de otros factores de diferenciación como la IL-3 (64).

En cuanto a la relación entre la MEC y las citocinas, se tiene un pleno conocimiento que en la proliferación, diferenciación y maduración de la célula pluripotencial hematopoyética participan mediadores solubles que tienen su origen en las células del estroma. Entre los múltiples factores derivados del estroma que estimulan diversas fases de la diferenciación y maduración de la célula progenitora y que no fueron estudiados en este trabajo, destacan el CSF-G, CSF-GM, CSF-M, IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-7, IL-8, IL-11 y el factor de crecimiento de la célula madre (MGF) (64), mientras que los productos con capacidad inhibitoria de la hematopoyesis incluyen a la proteína inhibidora de macrófagos MIP-1a (17,65,66).

Estos efectos positivos o negativos de algunas citocinas pueden depender además de si actúan concertadamente, como se ha reportado en el caso de la IL-2, que en presencia de CSF-GM favorece la diferenciación del linaje mielóide, en tanto que en presencia de IFN- γ inhibe este mismo proceso (33). Otro ejemplo es

el papel que ejerce la interacción célula-célula la cual puede generar la liberación de inhibidores de la hematopoyesis en el estroma como el TGF- β .

Para concluir, es clara la necesidad de ampliar el conocimiento sobre el mecanismo hematopoyético y su posibles alteraciones en enfermedades como el LEG. Esto hará posible visualizar un mayor número de cambios en MO, que aislados o en conjunto puedan explicar la presencia de citopenias periféricas.

El estudio *in vitro* de la célula CD34 aislada de MO (63) analizando la influencia específica de algunas citocinas en el proceso de mielopoyesis o eritropoyesis, o bien el abordaje de las relaciones del progenitor con su entorno, incluyendo la participación de los componentes de la MEC en las vías de diferenciación serán de utilidad para conocer los mecanismos que influyen en la producción y/o perpetuación de las citopenias periféricas en el LEG. Adicionalmente, evidencias recientes que postulan la existencia de subtipos de células progenitoras pluripotenciales, como las CD34^{hi} y CD34^{lo} hacen posible el abordaje de nuevas líneas de trabajo, en cuanto a su diferenciación hacia linajes específicos, características de su progenie, la capacidad de secreción de macromoléculas que conforman la MEC o su respuesta ante la biosíntesis de los factores de crecimiento derivados del estroma (67,68,69) entre otras alternativas.

CONCLUSIONES

La presencia de citopenias periféricas en el LEG ha sido explicada principalmente por mecanismos autoinmunes específicos y complicaciones inherentes al desarrollo y/o progresión de la enfermedad.

En el LEG, es escaso el número de estudios que puedan sustentar claramente alguna alteración en el proceso de la hematopoyesis y específicamente en la población de células progenitoras CD34, como causa potencial de las citopenias periféricas.

Este trabajo, sostiene que la presencia de citopenias periféricas en el LEG puede explicarse al menos en parte, por un descenso en el número de células progenitoras pluripotenciales CD34 en MO.

El descenso simultáneo de CD33 y CD45 sugiere que la anomalía principal ocurre en la célula pluripotencial primitiva y puede afectar su progenie.

El descenso de los elementos formes sanguíneos en el LEG, representado específicamente por las variables de hemoglobina, leucocitos y plaquetas mostró una correlación significativa con la disminución del número de células CD34 en MO, en los pacientes tratados con prednisona.

La producción de las células sanguíneas depende de la interacción entre las células CD34 y su microambiente, por lo que es probable que otras anomalías en las células hematopoyéticas y componentes del estroma que derivan de un progenitor común, puedan favorecer la citopenia periférica en LEG.

El estudio génico de las citocinas en MO, reveló que en comparación con los controles sanos, una gran proporción de los pacientes con LEG presentaron IL-10, mientras que hubo un descenso relativo del IFN- γ .

El estudio de las diferentes citocinas, con respecto a los resultados de CD34, no mostró nexo alguno que sugiera un defecto puntual en el proceso de la hematopoyesis.

El abordaje ulterior en esta área del conocimiento, mediante el estudio de la célula CD34 aislada; los transcritos de otras citocinas; la capacidad de diferenciación hacia linajes específicos; los cambios en el número y/o función de

subtipos de células progenitoras y su progenie, o bien el análisis de las relaciones del progenitor con su entorno, podrá aportar mayor información acerca de los mecanismos involucrados en la producción de citopenias periféricas en los pacientes con LEG.

APENDICE

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Solución de lisis

NH₄Cl	0.829 ml
EDTA	0.0037 g/ml
NaHCO₃	0.1 g/ml
Ajustar pH 7.2, aforar 100 ml	

Amortiguador PBS

KCl	0.2 g
KH₂PO₄	0.2 g
NaCl	8 g
Na₂HPO₄	2.16 g
Ajustar pH 7.35, aforar 1000 ml	

Solución PBS-albúmina

PBS	100 ml
Albúmina	0.5 g
Azida de sodio	0.1 g

Agua-DEPC

DEPC	1.0 ml
Agua destilada desionizada	
cbp	1000 ml
Esterilizar y conservar en tubos nuevos a temperatura ambiente.	

EDTA 5mM

EDTA disódico	9.3 g
Agua DEPC	30.0 ml

Ajustar pH 8.0, aforar 50 ml

Etanol al 75%

Alcohol etílico	75 ml
Agua-DEPC	25 ml

Almacenar a -20°C

Solución amortiguadora de carga

Glicerol	5 ml
EDTA pH 8.0, 1mM	20 µl
Azul de Bromofenol	2.5 µg
Xilencianol F.F.	2.5 µg
Agua-DEPC	5 ml

Homogeneizar el glicerol, conservar a temperatura ambiente

Bromuro de etidio

Bromuro de etidio	1 mg
Agua-DEPC	10 ml

Conservar protegido de la luz y a temperatura ambiente

TBE 10X

Tris-base	108 g
Acido bórico	55 g
EDTA pH 8.0, 0.5M	40 ml
Agua destilada desionizada cbp 1000 ml	

Solución amortiguadora TBE 1X

TBE 10X	100 ml
Agua destilada desionizada cbp 1000 ml	

Gel de poliacrilamida al 40%

Acrilamida	3.5 ml
TBE 10X	1.2 ml
Agua	7.0 ml
TEMED	10 μ l
PSA 10%	60 μ l

Gel de poliacrilamida-urea 4%

Urea	3.6 g
Agua desionizada	4.27 ml
TBE 10X	1.0 ml
Disolver en calor	
Agua desionizada	1.8 ml
Acrilamida 40%	2.67 ml
PSA 10%	60 μ l
TEMED	10 μ l

Acrilamida 40 %

Acrilamida	7.6 g
Bis-acrilamida	0.4 g
Agua	20 ml

REFERENCIAS

1. López-Karpovitch X. Hematopoyesis. Temas de medicina interna leucemia aguda. Asoc de Medic Interna de Méx. Edit. Interamericana Mc Graw-Hill Vol I, Núm 1 1993, pp 1-16.
2. Izak G., Erythroid cell differentiation and maturation. Progress Hematol 10:2-41, 1977
3. Quesenberry PJ, Mc Niece IK, Mc Granth HE., Stromal regulation of hematopoiesis. Ann N Y Acad Sci 554:116-124, 1989
4. Huang S, Terstappen LW., Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. see comments. Nature 360:745-749, 1992
5. Reuss Borst MA, Buhning HJ, Klein G, Muller CA., Adhesion molecules on CD34+ hematopoietic cells in normal human bone marrow and leukemia. Ann Hematol 65:169-174, 1992
6. Nakamura Y, Komano H, Nakauchi H., Two alternative forms of cDNA encoding CD34. Exp Hematol 21:236-242, 1993
7. Richel DJ, Baars JW, Wijngaarden MJ, Vander SCE, Vlasveld LT, Rodenhuis S., Favorable effect of hematopoietic stem cells isolated from blood on hematologic recovery following high-dosage chemotherapy. Ned Tijdschr Geneesk 137:245-250, 1993
8. Leemhuis T, Leibowitz D, Cox G, Silver R, Srour EF, Tricot G, Hoffman R., Identification of BCR/ABL-negative primitive hematopoietic progenitor cells within chronic myeloid leukemia marrow. Blood 81:801-807, 1993
9. Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA., Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human fossil high endothelial venules. J Cell Biology 131:261-270, 1995
10. Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA., Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. Blood 87:479-490, 1996

11. Krause SD, Ito T, Fackler JM, Smith MO, Collector MI, Sharkis JS, May SW., Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells *Blood* 84:691-701, 1994
12. Shalif M, Sekhsaria S, Malech HL., Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL-5 and other growth factors. *Cell Immunol* 160:50-57, 1995
13. Krause DS, Fackler MJ, Civin CJ, May WS., CD34, Structure biology, and clinical utility. *Blood* 87:1-13, 1996
14. Zannettino ACW, Berndt NC, Butcher C, Butcher EC, Vadas MA, Simmons PJ., Primitive human hematopoietic progenitors adherent p-selection (CD62P). *Blood* 85:3466-3477, 1995
15. Alvaro-García JM., Citocinas en la membrana sinovial de la artritis reumatoide. *Rev Esp Reumatol* 19:378-387, 1992
16. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cytokines. Chap 11. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders 1991, pp. 226-43
17. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M., Cytokine Expression in Chronic Inflammatory Disease. *Br Med Bulletin* 51:368-384, 1995
18. Ruiz-Argüelles GJ., Fundamentos de hematología. Cap 1. López-Karpovitch X. Hematopoyesis, Edit. Médica panamericana, 1993, pp 15-20
19. Carron JA, Cawley JC., IL-2 and myelopoiesis: IL-2 induces blast cell proliferation in some cases of acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 73:168-172, 1989
20. Taylor CW, Grogan TM, Salmon SE. Effects of interleukin 4 on the in vitro growth of human lymphoid and plasma cell neoplasms. *Blood* 75:1114-1118, 1990
21. De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M, Spits H, De vries J., Interleukin - 10. *Curr Op Immunol* 4:314-320, 1992
22. Itzel H, De waal Malefyt R, Roncarolo MG., IL-10 is produced by subsets of human CD4+T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 149:2378-84, 1992

23. Fauci AS., Multifactorial nature of human immunodeficiency in disease. Implications for therapy. *Science* 262:1011-1018, 1993
24. Kitano K, Rivas CI, Baldwin GC, Vera JC, Golde DW., Tumor necrosis factor dependent production of human immunodeficiency CD4 lines in chronically infected HL-60 cells. *Blood* 82:2742-2748, 1993
25. Ulich TR, Shin SS, Del castillo J., Haematologic effects of TNF. *Res Immunol* 144:347-354, 1993
26. Klingeman HG, Neerunjun J, Schwulera U, Ziltener HJ., Culture of normal and leukemic bone marrow in interleukin-2. Analysis activation, cell proliferation and cytokine production. *Leukemia* 7:1389-1393, 1993
27. López-Karpovitch X, Prados-Semorile MR, Rojas R., Release of granulocyte-macrophage colony-inhibiting activity by normal human post thymic precursor cells. *J Hematol* 20:246-256, 1985
28. Schuster SJ, Wilson JH, Ersler AAAJ, Coro J., Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 70:316-18, 1987
29. Rizzo S, Ball SE, Gordon-Smith EC., IL-3 is produced by normal stroma in long-term bone marrow cultures. *British J Haematol* 90:518-525, 1995
30. Leary AG, Yang Y-CH, Clark SC, Gasson JC, Golde DW, Ogawa M., Recombinant Gibbon Interleukin 3 supports formation of human multilineage colonies and blast cell colonies in culture. Comparison with recombinant. *Blood* 70:1343-48, 1987
31. Monroy RL, Skelly RR, MacVittie TJ, Davis TA, Sauber JJ, Clark SC, Donahue RE., The effect of recombinant GM-CSF on the recovery of Monkeys transplanted with autologous Bone Marrow. *Blood* 70:1696-99, 1987
32. Dexter TM., Regulation of hemopoietic cell growth and development: experimental and clinical studies. *Leukemia* 3:469-74, 1989
33. Platzer E., Human hemopoietic growth factors. *Eur J Haematol* 42:1-15, 1989
34. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM., Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and

- does not appear to be influenced by citokines. *J Cell Physiol* 157:579-86, 1993
35. Rothfield M., Clinical features of systemic lupus erythematosus. Chap 69. Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (eds) *En: Textbook of Rheumatology*. W.B. Saunders 1985, pp 1070-97
 36. Hughes GRW., Systemic lupus erythematosus. Chap 2. Hughes GRW (ed). *En Connective tissue diseases 2th ed*. Blackwell Scientific Publications 1979, pp. 3-72
 37. Williamson GG, Pennebaker S, Boyle SA., Clinical characteristic of patients with rheumatic disorders who possess antibodies against ribonucleoprotein particles. *Arthritis Rheum* 26:509-515, 1983
 38. Morales PM, Jimenez BFJ, Yañez P., Storage histiocytes and hemophagocytosis. A common finding in the bone marrow of patients with active systemic lupus erythematosus. *Arch Med Res* 27:57-621, 1996
 39. Feng C, Ng MHL, Szeto RSC, Li EK., Bone marrow findings in lupus patients with pancytopenia. *Pathology* 23:5-11, 1991
 40. Quismorio FP., Hemic and lymphatic abnormalities in SLE. Chap 43. *En Dubois' lupus erythematosus*. Wallace DJ, Hahan BH (eds). 4th Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1993, pp 418-430
 41. Tan EM, Cohen AS, Tries JF, Masi AT, Mc Shane DJ, Rothfield M, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ., The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-77, 1982
 42. Guzman RJ., La medición de la actividad del lupus eritematoso generalizado. Tesis de posgrado, de la especialidad en Reumatología. Facultad de Medicina, División de estudios de posgrado, UNAM, 1991, pp 20.
 43. World Medical Association: Declaration of Helsinki. Recommendation guide and doctors in clinical research. *World Medical Journal* 11:281, 1964
 44. Boyüm A., Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 (suppl 97):77-89, 1968

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

45. **Ruíz Arguelles A:** Citometría de flujo en el estudio de los leucemicos agudos. Temas de Medicina Interna. Leucemia aguda. Asociación de Medicina Interna de México. Edit. Interamericana, Mc Graw Hill Vol I, Núm. 1 1993, 55-62
46. **Siena S.,** Milan protocol for clinical CD34+ cell estimation in peripheral blood for autographing in patients with cancer En: Hematopoietic stem cells, The Mulhouse manual wunder E, Sovalat H, Hénon PR, Serke S (Editors) Alpha Med Press, 1994, pp 23-30
47. **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.,** Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. chap 7. En Molecular cloning Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (eds). Cold Spring Harbor, N.Y. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, pp 7.1-7.87
48. **Chomozynski P, Sacchi N.,** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-59, 1987
49. **Spectrum May 94.** A publication of Life Technologies, Inc
50. **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J:** In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. chap 14. En Molecular cloning Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (eds). Cold Spring Harbor, N.Y. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, pp 14.1-14.21
51. **Melby CP, Darnell JB, Tryon VV.,** Quantitative measurement of human cytokine gene expression by polymerase chain reaction. J Immunol Methods 159:235-244, 1993
52. **Firestein SG, Alvarado-García JM, Maki R.,** Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. J Immunol 144:3347-3353, 1990
53. **Siegel S:** Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias. Edit. Trillas, Cap 9 pp 226-74, 1991
54. **Otsuka T, Nagasawa K, Harada M, Niho Y.,** Bone marrow microenvironment of patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 20:967-971 1993
55. **Ng MHL, Li EK, Feng CH,** Gelatinous transformation of bone marrow in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 16:989-992, 1989

56. Holyoake TL, Alcorn MJ., CD34+ positive haemopoietic cells: Biology and clinical applications. *Blood Reviews* 8:113-124, 1994
57. Lopez-Karpovitch X, Cardiel M, Cardenas R, Piedras J, Alarcón Segovia D., Circulating colony-forming units of granulocytes and monocytes/macrophages in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 77:43-46, 1989
58. Alcocer VJ, Alarcón SD., Longitudinal study on the production of and cellular response to interleukin-2 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 15:57-63, 1995
59. Weckman AL, Alcocer VJ., Cytokine inhibitors in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum* 26:539-57, 1996
60. Emille D, Llorente L, Galanaud P., Citokines et lupus. *Ann Med Interne* 147:480-84, 1996
61. Llorente L, Richaud-Patin Y., La interleucina 10 en enfermedades reumáticas autoinmunes. *Rev Mex Reumat* 11:59-64, 1996
62. Richaud-Patin Y, Alcocer VJ, Llorente L., High levels of TH2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin* 47:267-72, 1995
63. Dührsen V, Knieling G, Beecken W, Neumann S, Hossfeld DK., Chimaeric cultures of human marrow stroma and murine leukaemia cell: evidence for abnormalities. In the haemopoietic microenvironment in myeloid malignancies and other infiltrating marrow disorders. *British J Haematol* 90:502-511, 1995
64. Gibson FM, Scopes J, Rizzo S, Ball SE, Gordon-Smith EC., IL-3 is produced by normal stroma in long-term bone marrow cultures. *British J Haematol* 90:518-525, 1995
65. Mayani H, Little MT, Dragowska W, Thornbury G, Lansdorp PM., Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 α , TGF- β and TNF- α on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34+ cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp Hematol* 23:422-27, 1995
66. Maciejewsk L, Selleri C, Anderson S, Young NS., Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon γ and tumor necrosis

factor α and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. Blood 85:3183-90, 1995

67. McKinstry WJ, Li Ch L, Rasko JEJ, Nicola NA, Johnson GR, Metcalf D., Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 89:65-71, 1997
68. Di Giusto D, Chen S, Combs J, Webbs S, Namikawa R, Tsukamoto A, Chen BP, Galy AHM., Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. Blood 84:421-32, 1994
69. Huang S, Terstappen WMM L., Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. Nature 360:745-749, 1992