

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
“SALVADOR ZUBIRÁN”**

**LEUCOPENIA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO  
GENERALIZADO: ¿ACTIVIDAD O TOXICIDAD  
FARMACOLÓGICA?**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA**

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

**JUAN CRUZ RIZO RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. JUANITA ROMERO DÍAZ**

**MÉXICO, D. F.**

**OCTUBRE DEL 2006**



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.

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
“SALVADOR ZUBIRÁN”**

**LEUCOPENIA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO  
GENERALIZADO: ¿ACTIVIDAD O TOXICIDAD  
FARMACOLÓGICA?**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA**

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

**JUAN CRUZ RIZO RODRÍGUEZ**

**Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez  
Director de Enseñanza**

**Dr. Jorge Alcocer Varela  
Investigador Titular y  
Profesor Titular del Curso  
de la Especialización en  
Reumatología**

**Dra. Juanita Romero Díaz  
Director de Tesis**

**MÉXICO, D. F.**

**OCTUBRE DEL 2006**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres, hijos y esposa, por su apoyo incondicional.

A los Drs. Juanita Romero, Jorge Sánchez, Jorge Alcocer por sus enseñanzas y ayuda en la formación como Reumatólogo.

A las Dras. Janette Furuzawa y María Inés Rojas por su apoyo en el procesamiento y análisis de las muestras.

En memoria al Dr. Donato Alarcón Segovia.

La ciencia me dice que Dios ha de existir.

Mi mente me dice que nunca comprenderé a Dios.

## **TABLA DE CONTENIDO:**

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>Definición del problema</b>	<b>11</b>
<b>Justificación</b>	<b>12</b>
<b>Hipótesis de trabajo</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos</b>	<b>14</b>
<b>Diseño experimental</b>	<b>15</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>15</b>
<b>Análisis estadístico</b>	<b>26</b>
<b>Resultados</b>	<b>27</b>
<b>Discusión</b>	<b>44</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>48</b>

**Palabras clave:** índice, introducción, definición del problema, justificación, hipótesis de trabajo, objetivos, diseño experimental, materiales y métodos, análisis estadístico, resultados, discusión, bibliografía.

## **LEUCOPENIA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO**

### **GENERALIZADO: ¿ACTIVIDAD O TOXICIDAD FARMACOLÓGICA ?**

#### **INTRODUCCIÓN:**

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune de causa desconocida, caracterizado por la producción de autoanticuerpos. Entre las principales manifestaciones que se observan en esta enfermedad se encuentran afección a nivel de serosas, sistema nervioso, articular, mucocutáneo y hematológico. De aquellos pacientes con afección hematológica, la anemia se presenta en 20 a 35%, la trombocitopenia de 30 a 45% y la leucopenia en 40 a 70%; esta generalmente a expensas de linfopenia. La leucopenia es producto de la apoptosis, que se define como el proceso de muerte celular en el contexto fisiológico sin liberación de mediadores inflamatorios.

Las citopenias se deben a varias etiologías, actividad de la enfermedad, falla medular, toxicidad por fármacos, destrucción periférica, infiltración tumoral y sepsis.<sup>1,2</sup>

Hay trabajos que demuestran asociación con citopenias por actividad de la enfermedad con algunos autoanticuerpos como SSA-Ro, SSB-La, anti-DNA, anti-RNP.<sup>3</sup>

Durante el proceso de apoptosis las células externalizan la fosfatidilserina de la membrana, siendo este cambio el mecanismo por el cual las células fagocíticas pueden identificar a las células apoptóticas. Además se incrementa de manera temprana la presencia de anexina V, que es una proteína con alta afinidad por los fosfolípidos dependiente de calcio.<sup>4</sup>

La leucopenia observada en los pacientes con lupus eritematoso generalizado se desarrolla a expensas de la apoptosis aumentada de células T.<sup>5</sup>

La apoptosis neutrofílica está mediada por Fas (APO-1/CD95) asociado a la expresión de fosfatidilserina en la superficie celular, localizándose el gen en el brazo largo del cromosoma 10.<sup>6</sup>

La neutropenia ( $<1500$  células/ $\text{mm}^3$ ), asociada al lupus eritematoso generalizado, en ausencia de toxicidad por fármacos, se ha reportado en 20-40% de la población Japonesa<sup>7</sup>, siendo la apoptosis neutrofílica aún no estudiada en la población mestiza de México.

En el estudio realizado por Courtney y colaboradores, se encontró que el porcentaje de neutrófilos apoptóticos era mayor en sangre periférica de pacientes con LEG, comparado con pacientes con otras enfermedades y en individuos sanos. Donde el número en porcentaje de neutrófilos apoptóticos en pacientes con LEG correlaciona positivamente con la actividad de la enfermedad (SLAM, SLEDAI), anti-ADNdc y otros elementos. El incremento en la apoptosis produce un incremento de material antigénico, provocando

reacción permanente en la tolerancia natural. El uso de esteroides disminuye las células neutrofílicas apoptóticas.<sup>8</sup>

Los neutrófilos sintetizan citocinas que modulan la respuesta inmune (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8), e incluso la apoptosis a través de los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) en la superficie celular.<sup>9</sup>

El ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF- $\alpha$  (TRAIL) puede acelerar el proceso de apoptosis, vía LT de los pacientes con LEG, facilitando la opsonización de los PMN, contribuyendo con ello a neutropenia.<sup>10</sup>

Los esteroides y el IFN- $\gamma$  modulan la expresión de TRAIL de los LT, los primeros lo hacen a la baja y el IFN- $\gamma$  lo regula a la alza (elevado en pacientes lúpicos con actividad).<sup>11</sup>

Los esteroides tienen efecto protector sobre los neutrófilos, al retrasar la apoptosis.<sup>12</sup>

Se ha informado la presencia de neutropenia como consecuencia de actividad de la enfermedad (probablemente relacionado a anticuerpos anti-granulocito).<sup>13</sup>

Existe correlación entre niveles elevados de actividad neutrofílica (apoptosis) y cuenta neutrofílica periférica baja, asociándose a actividad lúpica, siendo útil este

parámetro para discriminar entre pancitopenia inducida por fármacos, por actividad de la enfermedad (LEG), o la formación de remanentes leucoagregados intravasculares.<sup>14, 15</sup>

En pacientes con LEG, las citopenias representan un gran dilema cuando se trata de determinar su etiología, incluso se llega a requerir el aspirado de médula ósea como herramienta en la búsqueda de su origen en los pacientes con LEG, en el cual puede observarse un incremento de eosinófilos, diseritropoyesis y afección en la maduración granulocítica al estado mielocítico en pacientes con toxicidad por fármacos. Por otro lado, cuando se trata de actividad por la enfermedad se encuentra incremento de celularidad en las diversas líneas hematopóyeticas.

En un estudio realizado en nuestro Instituto en el cual se incluyeron pacientes hospitalizados con lupus y neutropenia moderada a grave, se encontró una asociación entre la presencia de neutropenia con actividad lúpica en sistema nervioso central, anemia hemolítica, trombocitopenia, incremento de VCM y HCM, uso de cisaprida, DFH, amoxicilina-clavulanato, TMP-SMX y el uso de inmunosupresores. Se demostró que la toxicidad por fármacos es la etiología más frecuente de neutropenia en ese grupo de pacientes.<sup>16</sup>

Por otro lado, en un estudio previo se demostró que en pacientes con LEG no tratados, el 14% mostraban leucopenia (<2000) y solo el 2% neutropenia <1000.<sup>17</sup> Se cree que los resultados arrojados por este estudio determinan la precaución que deberá de tenerse al usar fármacos inmunosupresores en pacientes con LEG, que son los detonantes de citopenias (neutropenia en este estudio).<sup>18</sup>

Con lo antes expuesto, la presencia de leucopenia puede ser un fenómeno asociado a actividad de la enfermedad o bien, puede observarse como un efecto tóxico secundario al uso de fármacos; determinar cuál de los dos procesos está determinando la leucopenia en un determinado paciente puede ser en algunos casos, una tarea difícil.

Con respecto a las estrategias disponibles para identificar que la actividad de la enfermedad es el mecanismo responsable de la leucopenia, en los 70's se describió la presencia de anticuerpos linfocitotóxicos y su asociación con la actividad de la enfermedad<sup>19,20</sup>, esta área de la investigación fue poco explorada y se abandonó pocos años después. Actualmente son considerados como marcadores de actividad los anticuerpos anti-DNAc, C3, IFN- $\gamma$ , trombocitopenia y neutropenia en pacientes con LEG<sup>21,22,23</sup>; y en últimas fechas se están considerando otros elementos como posibles marcadores, como son TRAIL y Fas.<sup>24,25,26</sup>

La molécula asociada a CD95 media la muerte celular programada, así como la inducción y mantenimiento de la tolerancia de linfocitos T. Se ha observado que la apoptosis de linfocitos correlaciona con incremento de CD95 en pacientes con lupus activo.<sup>27,28</sup>

Por otro lado, las herramientas para identificar el efecto tóxico de los inmunosupresores, específicamente de la azatioprina se fundamentan en el conocimiento de su mecanismo de acción. Al respecto, desde hace algunas décadas se ha descrito que este fármaco actúa a través de la vía de las tiopurinas, siendo su metabolito activo la 6-MP, éste

es transformado por vía de la tiopurina metil-transferasa en 6-metil-MP, ácido 6-tioúrico o 6-tioguanina, metabolitos que pueden ser mielosupresores. En los últimos años, se ha encontrado un efecto pro-apoptótico de la azatioprina, este efecto puede observarse por vía de la coestimulación de CD28, siendo sus marcadores el CD95 y TRAIL, los cuales pueden ser determinados a través de la vía 6-TG que va a encontrarse elevada a nivel sérico y con ello, ser una medición indirecta de la toxicidad que puede tener la azatioprina en aquellos pacientes con lupus eritematoso.<sup>29, 30,31</sup>

En pacientes con enfermedad de Crohn se encontró que a mayor dosis y tiempo de exposición se produce una mayor concentración intracelular de 6-TG. La medición de niveles de 6-TG eritrocitaria es de utilidad para optimizar la dosis adecuada de azatioprina como terapia antimetabólica y obtener una respuesta clínica adecuada sin inducir leucopenia. En pacientes refractarios a terapia con azatioprina, que presentan niveles elevados de 6-TG eritrocitaria, se deben considerar otras terapias alternativas.<sup>32, 33</sup>

## **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA:**

En el grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado que acuden a la consulta de Reumatología y presentan leucopenia; un porcentaje de ellos presentan además manifestaciones clínicas y serológicas que sugieren actividad de la enfermedad. Con frecuencia estos pacientes se encuentran recibiendo tratamiento inmunosupresor con azatioprina.

Decidir en ese momento si el efecto principal es toxicidad o persistencia de la actividad de la enfermedad es una tarea difícil. Sin embargo, la decisión tomada puede tener repercusiones importantes en el tratamiento y evolución del paciente.

## **JUSTIFICACIÓN:**

En la práctica clínica y en aquellos pacientes con leucopenia más datos de actividad del lupus, en quienes es difícil determinar si el efecto observado es secundario al uso de citotóxicos o debido a la actividad de la enfermedad, sería de gran utilidad el contar con un instrumento que nos permita identificar cual de éstos dos efectos es el que estamos observando.

## **HIPÓTESIS:**

1.- **H<sub>0</sub>**. En aquellos pacientes con lupus eritematoso generalizado con leucopenia y datos de actividad de la enfermedad quienes reciben tratamiento con azatioprina, la determinación sérica de TRAIL, Fas e IFN $\alpha$  no mostrara asociación con la actividad del lupus eritematoso generalizado.

2.- **H<sub>a</sub>**. En aquellos pacientes con lupus eritematoso generalizado con leucopenia y datos de actividad de la enfermedad con azatioprina, la determinación sérica de TRAIL, Fas e IFN $\alpha$  estará asociada con la actividad del lupus eritematoso generalizado a pesar de estar recibiendo dosis intermedias de azatioprina.

## **OBJETIVOS:**

a) **General.** Determinar si la leucopenia observada en pacientes con lupus eritematoso generalizado con tratamiento es secundaria a actividad de la enfermedad o efecto tóxico por azatioprina.

### **b) Específicos.**

1.- Identificar si los marcadores de apoptosis TRAIL, Fas e IFN $\alpha$  se asocian con la actividad del lupus eritematoso generalizado (SLEDAI-2K).<sup>34</sup>

2.- Identificar si los marcadores de apoptosis TRAIL, Fas e IFN $\alpha$  se asocian con la presencia de leucopenia, linfopenia y neutropenia en pacientes con LEG.

2. Determinar el efecto de 6-Tiogunaina sobre la expresión y cuantificación de los marcadores de apoptosis (TRAIL, Fas y Anexina V).

## DISEÑO EXPERIMENTAL:

Estudio piloto, transversal.

## PACIENTES, MATERIALES Y METODOS.

### 1. Descripción de la maniobra.

#### Estudio *ex vivo*

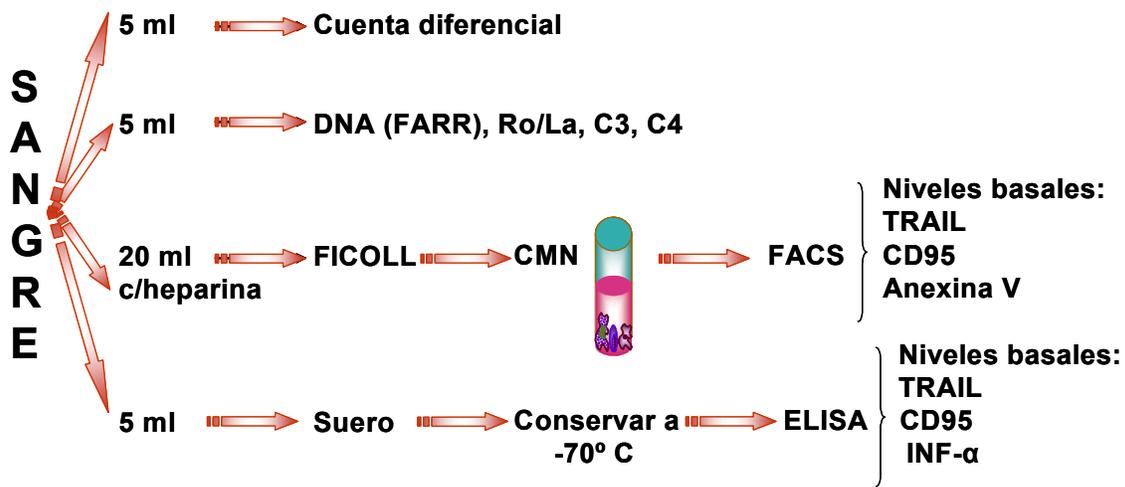
##### *Exámenes de laboratorio*

A cada paciente se le tomó una muestra de 50 mL de sangre para realizar los siguientes análisis:

a) Cuenta diferencial de leucocitos (5 mL) (Fig.1).

b) Anticuerpos anti-ADN (técnica de FARR) y anti-Ro/La y las moléculas C3 y C4 del complemento (Fig. 1).

Figura 1. Esquema de la metodología *ex vivo*



### ***Determinaciones especiales***

#### ***a) Expresión basal de los niveles séricos de TRAIL, CD95 e IFN- $\alpha$ por ELISA***

Se obtuvo el suero de 5 mL de sangre total, el cual se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. A través de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA en fase sólida (R&D Systems, Minneapolis, MN) se cuantificó a la molécula TRAIL, el CD95 (Fas, APO-1) y el IFN- $\alpha$ . Se emplearon 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones del estándar de TRAIL, CD95 ó IFN- $\alpha$  o de los sueros de los diferentes grupos de estudio. Se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en las placas que previamente tenían unido un anticuerpo anti-TRAIL, -CD95 ó -IFN- $\alpha$ . Posteriormente las placas se lavaron y aspiraron, y se les adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de un anticuerpo anti-TRAIL, -CD95 ó -IFN- $\alpha$  humano acoplado a la peroxidasa. Lo anterior se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. El TRAIL, CD95 ó IFN- $\alpha$  unido a la fase sólida se detectó a los 30 min de incubación por la reacción de la peroxidasa sobre 100  $\mu\text{l}$  del substrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, peróxido de hidrógeno al 20% (v/v) y dimetilformamida. La reacción se detuvo empleando 100  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M. La lectura se realizó a 450 nm de longitud de onda. La sensibilidad del sistema es de 1.25 ng/ml, y la linealidad obtenida entre los 3.13 ng/ml y los 60 ng/ml.

**b) *Expresión basal de TRAIL, CD95 y Anexina V membranar en células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) por Citometría de Flujo (FACS)***

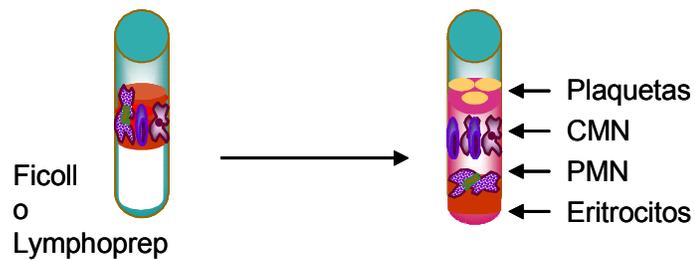
De las muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA al 2% se tomaron 150  $\mu$ L para cada prueba, a éstos se adicionaron 5  $\mu$ L de los anticuerpos anti-TRAIL-FITC, -CD95-PE y -anexina V-PE (BD Biosciences, San Diego, CA; Fig. 1). Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos monoclonales. Los eritrocitos se lisaron por incubación en oscuridad con 2 mL de una solución de lisis para FACS 1X durante 20 minutos (BD, San José, CA). Después las muestras se lavaron dos veces con 2.5 mL de PBS 0.05 M, pH 7.2-7.4, centrifugando a 1300 rpm, durante 5 minutos y se resuspendieron en 0.5 mL de formaldehído al 3% en PBS. Las muestras se cubrieron con aluminio y se dejaron a 4°C para leerlas al día siguiente. Las muestras se evaluaron en un citómetro FACScan empleando el programa Cell Quest para su análisis. Se determinaron al menos 1000 eventos en cada ventana de la subpoblación analizada. El número absoluto de células/ $\mu$ L se calculó de acuerdo a la cuenta total de células.

## **Estudios *in vitro***

### *Aislamiento de CMNSP por gradiente de densidad*

Se obtuvo la muestra de sangre periférica en una jeringa de 20 mL con 2 mL de EDTA al 2%. La muestra se diluyó de 1 a 3 veces con PBS 0.05 M, pH 7.2-7.4 (Ej. 10 mL de sangre se diluyen hasta alcanzar un volumen de 20 ó 40 mL con PBS). La sangre diluida se homogenizó y se vertió con un flujo lento y constante en un tubo Falcon (COSTAR) de 50 mL, el cual previamente contenía el Lymphoprep o el Ficoll (Ej: 30 mL de sangre se añaden sobre 10 a 15 mL de Ficoll o Lymphoprep; Fig. 2). Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomó el anillo de CMNSP (Fig. 2) y se vertió en un tubo Falcon nuevo. Se agregó PBS hasta ajustar un volumen de 50 mL para lavar las células y evitar el efecto tóxico del Ficoll o Lymphoprep. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, desechando el sobrenadante. Se resuspendió el botón celular en 1 a 5 mL de RPMI-1640 y se cuantificó el número de células vivas empleando el colorante azul tripano. La suspensión celular se diluyó 1:10 a 1:20 (10  $\mu$ L de células en 90  $\mu$ L de azul tripano). Diez  $\mu$ L de la suspensión celular teñida se colocó en la cámara de Neubauer y las CMNSP se contaron en los cuatro cuadrantes grandes para sacar un promedio. Para obtener la concentración celular se multiplicó la media por la dilución (Ej: si el promedio de células es de 33 y la dilución 1:20 entonces:  $33 \times 0.2 = 6.6 \times 10^6$  cél/mL y este resultado se multiplica por los mL que se tengan:  $6.6 \times 10^6$  cél/mL  $\times$  1 mL =  $6.6 \times 10^6$  cél/mL).

**Figura 2. Separación de CMN por gradiente de densidad**



*Aislamiento de la subpoblación de células T por roseteo con eritrocitos de carnero.*

De las CMNSP aisladas se seleccionaron las células T por roseteo con eritrocitos de carnero (la pureza de células T obtenida es de aproximadamente 99%) para los ensayos *in vitro* (Fig. 2).

#### *Preparación de las Rosetas*

Para preparar las rosetas de carnero se requirió de los siguientes materiales:

Solución salina 0.15 M, pH 7.4 ó

PBS 0.05 M, pH 7.4 estéril

AET (amino etil tiouroniom B) 1 g en 25 ml de agua destilada desionizada (dd H<sub>2</sub>O),  
ajustar la solución a pH 8.5

Método para el tratamiento de los eritrocitos de carnero:

Se tomaron 10 mL de eritrocitos de carnero y se pusieron en un tubo Falcon de 15 mL. Se lavaron 3 veces con solución salina estéril centrifugando cada vez a 2500 rpm 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante por aspiración con una pipeta Pasteur estéril. A 3 mL del botón de eritrocitos se les agregaron 10 mL de AET y se incubaron durante 20 minutos a 37°C agitando cada 5 min. El volumen final de eritrocitos quedó a una concentración de 10% en PBS (aforar hasta 30 mL). Los eritrocitos se almacenaron a 4°C hasta su uso (antes de los 8 días de preparación).

#### *Separación de las células T con eritrocitos de carnero*

Después de separar las CMNSP por gradiente de densidad, se contaron las células tras el segundo lavado. La concentración de CMNSP se ajustó a  $10 \times 10^6$  cél/mL. El volumen total de la suspensión celular se dividió en 2 y a cada suspensión se le añadió 10% de suero bovino fetal (SFB) para completar el doble de la solución inicial. A esta suspensión se le añadieron los eritrocitos de carnero.

Ej: 5 mL de CMNSP en suspensión en RPMI-1640

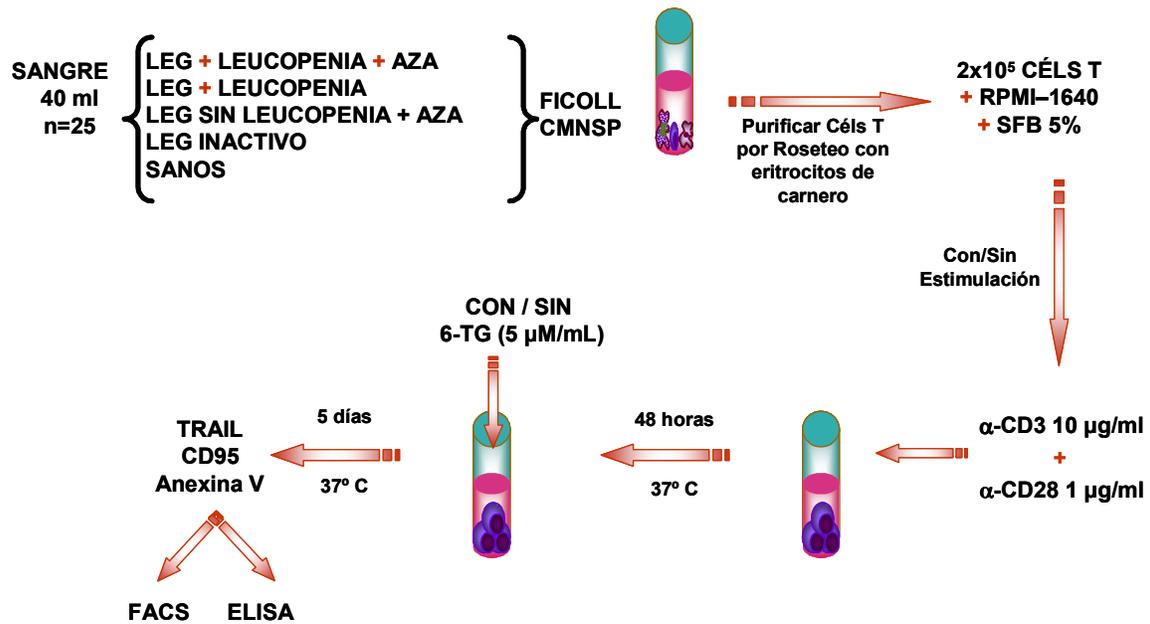
1 mL de SFB (que corresponde al 10% del volumen total)

4 mL de eritrocitos de carnero que completan un volumen total de 10 mL

La mezcla se incubó toda la noche a 4°C, si el volumen era menor a 8 mL se empleó un tubo Falcon de 15 mL, si era mayor de 8 mL se utilizó de preferencia un tubo Falcon de 50 mL. Después de la incubación se homogenizó la suspensión muy suavemente con una pipeta y se centrifugó a 1500 rpm, durante 30 minutos a 10°C. Se realizó una separación

por gradiente de densidad con Ficoll o Lymphoprep y se desechó lo que quedó en el anillo de CMNSP (linfocitos B y monocitos). En el fondo del tubo quedaron las rosetas (eritrocitos más linfocitos T), las cuales se resuspendieron con 10 mL de AKC. La suspensión se transfirió a un tubo de 50 mL y luego se aforo a 25 mL. Lo anterior se incubó 5 a 10 minutos en hielo agitando hasta obtener una solución de color rojo sangría. Después se aforo con PBS a 50 mL y se centrifugó a 1500 rpm, durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante por aspiración con pipeta pasteur y el botón se resuspendió en 3 a 5 mL de RPMI-1640 y se contaron las células.

Figura 3. Esquema de la metodología *in vitro*.



*Estimulación de linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28*

Los anticuerpos y la concentración a la que emplearon los mismos para la estimulación fue:

Anticuerpo anti-CD3 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (BD Pharmingen 0.1 mg, 0.2 mL, 0.5 mg/mL; No Cat 555337)

Anticuerpo anti-CD28 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (BD Pharmingen 0.1 mg, 0.2 mL, 0.5 mg/mL; No Cat 555726)

La estimulación se llevó a cabo en placas de 96 pozos de fondo plano (COSTAR). Para ello se sensibilizó la placa con el anticuerpo anti-CD3 a la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :

Anti-CD3: 5  $\mu\text{g}$  en 1000  $\mu\text{L}$

500 $\mu\text{g}$  en 10  $\mu\text{L}$

X= 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Para 30 pozos se toman 780  $\mu\text{L}$  de la dilución

10  $\mu\text{g}$  en 1000  $\mu\text{l}$

X en 780  $\mu\text{L}$

X= 7.8  $\mu\text{g}$  de anti-CD3

0.5  $\mu\text{g}$  en 1  $\mu\text{l}$

7.8  $\mu\text{g}$  en X

X = 15.6  $\mu$ l de anti-CD3 +764  $\mu$ L de RPMI-1640

A cada pozo se le adicionaron 30  $\mu$ l de la dilución y la placa se incubó 90 minutos a 37°C cubierta con papel aluminio. La placa se enjuagó 3 veces con PBS frío (200 $\mu$ L).

Posteriormente la placa se sembró con  $2 \times 10^5$  céls/200mL de RPMI-1640/pozo. Finalmente los linfocitos T se estimularon con 10  $\mu$ L del anticuerpo anti-CD28 en cada pozo calculando el número total de pozos para preparar la dilución Ej: para 30 pozos

0.25  $\mu$ g en 10  $\mu$ l

X en 300  $\mu$ l

Los linfocitos T se incuban durante 48 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

X = 7.5  $\mu$ L de anti-CD28 y 292.5  $\mu$ L RPMI-1640

*Efecto de la 6-Tioguanina (TG) en los cultivos de linfocitos T activados.*

Las placas con los linfocitos T activados se trataron con o sin 5  $\mu$ M/mL de 6-Tioguanina (SIGMA A4882-5G) durante 5 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. De los sobrenadantes de cultivo se determinó por ensayos inmunoenzimáticos de tipo ELISA la concentración de TRAIL, CD95, e IFN- $\alpha$ . En el paquete celular se determinó el grado de apoptosis por presencia de Anexina V, la expresión de TRAIL y CD95 membranal.

## **Pacientes.**

### **Criterios de inclusión:**

1.- Pacientes con diagnóstico de LEG que cumplan con  $\geq 4$  criterios de clasificación de acuerdo al ACR (American Collage of Rheumatology)<sup>35</sup> atendidos en la consulta externa del INCMNSZ y que entren en uno de los siguientes 4 grupos:

**Grupo 1)** LEG con leucopenia ( $< 3000$  células/mm<sup>2</sup>) con azatioprina.

**Grupo 2)** LEG con leucopenia ( $< 3000$  células/mm<sup>2</sup>) sin azatioprina.

**Grupo 3)** LEG sin leucopenia sin azatioprina.

**Grupo 4)** LEG sin leucopenia con azatioprina.

2.- Individuos sanos (**Grupo 5**).

3.- No participar en otra investigación.

### **Criterios de exclusión:**

1.- Pacientes menores de 18 años.

2.- Pacientes que no aceptan a participar en el estudio.

3.- Pacientes que reciban otro inmunomodulador diferente de azatioprina.

**Variables.**

**a) A medir.**

**1.- Principal.**

- a) TRAIL
- b) Fas (CD95)
- c) IFN- $\alpha$

**2.- Secundarias.**

- a) DNA (ELISA)
- b) Complemento 3
- c) Complemento 4
- d) SLEDAI-2K
- e) Biometría hemática
- f) Análisis de médula ósea

**b) Frecuencia de mediciones.**

Una sola muestra de sangre y en algunos casos de médula.

**Todos los pacientes y voluntarios sanos firmaron un consentimiento para participar en el estudio.**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se realizó análisis descriptivo empleando pruebas no paramétricas para grupos independientes: U-Mann-Whitney para variables continuas, prueba exacta de Fisher para variables categóricas y análisis de varianza (Kruskal-Wallis).

## **RESULTADOS.**

### **Pacientes**

Para el estudio se incluyeron 20 pacientes de sexo femenino con LEG, divididos en 4 grupos (Tabla 1).

**Grupo 1:** 5 pacientes con LEG, leucopenia y otros datos de actividad de la enfermedad. Todos ellos recibieron azatioprina en dosis intermedia durante los últimos 12 (10-34) meses.

**Grupo 2:** 5 pacientes con LEG, datos de actividad de la enfermedad entre ellos leucopenia. Ninguno de ellos había recibido tratamiento inmunosupresor ni esteroideo al momento del ingreso.

**Grupo 3:** 5 pacientes con LEG sin actividad de la enfermedad, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina durante los últimos 25 (18-77) meses.

**Grupo 4:** 5 pacientes con LEG sin actividad de la enfermedad, sin leucopenia y en tratamiento con azatioprina durante los últimos 13 (5-27) meses.

Se incluyó un quinto grupo:

**Grupo 5:** 5 controles sanos del mismo género que los pacientes.

## Datos demográficos y clínicos

A todos los pacientes se les midió actividad de la enfermedad al momento de ingresarlos al estudio, empleando la escala de SLEDAI-2K en una versión modificada, es decir, se excluyó la variable leucopenia de las 24 que conforman esta escala.

En el grupo de pacientes inactivos, sólo se seleccionaron aquellos que en la evaluación previa en la consulta de Reumatología se encontraban en remisión, tanto clínica como serológica. Al momento del estudio y al realizar la determinación del complemento y anticuerpos anti-DNA<sub>dc</sub>, en algunos pacientes se encontraron niveles bajos del complemento (C3 y C4) e incremento en los títulos de anticuerpos anti-ADN<sub>dc</sub>. A pesar de ello, se encontró que la mediana de SLEDAI-2K modificado del grupo activo fue de 10 vs. 3 del grupo inactivo ( $p = 0.04$ ). Por ello, en algunas comparaciones se empleó el SLEDAI-2K truncado (refleja actividad clínica más que serológica).

De esta manera, se incluyeron en total 10 pacientes con actividad de la enfermedad y 10 pacientes inactivos (de acuerdo al SLEDAI-2K truncado). La mediana de edad del grupo activo fue de 31 años, 29 del grupo inactivo y 28 de los sanos ( $p = 0.70$ ).

La mediana de la dosis de azatioprina fue de 100 mg/día (2 mg/kg/día) y de prednisona de 3.75 mg/día en los pacientes con tratamiento.

La cuenta de leucocitos absolutos en los 5 grupos se muestra en la tabla 1. Diez de los 20 pacientes incluidos tuvieron leucopenia. Tres pacientes del grupo con actividad de la

enfermedad presentaron neutropenia (< 1500 neutrófilos absolutos) y 10 linfopenia (< 1200 linfocitos absolutos). Ninguno de los pacientes presentó trombocitopenia (< 150 000 plaquetas). El grupo de pacientes con LEG activo tenía anemia normocítica, normocrómica (mediana 11.9 g/dL). El grupo con LEG inactivo y de individuos sanos no presentó anemia (mediana 13.5 y 15 g/dL, respectivamente). El volumen globular medio (VGM) de los grupos en tratamiento con azatioprina no evidencio macrocitosis (mediana 89 fL).

**Tabla 1.** Características clínicas y demográficas de los pacientes y los individuos sanos.

<b>Variables</b>	<b>G1<sup>†</sup></b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
Edad	22	34	34	29	28
Tiempo de evolución del LEG (meses)	16	4	98	51	
SLEDAI modificado	10	10	2*	4**	
Dosis de AZA (mg/kg/día)	100			100	
Dosis de PDN (mg/día)	3.75			2.5	
Leucocitos totales (cél/mL)	2700	2900	5600	4300	7500
Neutrófilos (cél/mL)	1674	1566	3874	2640	4446
Linfocitos (cél/mL)	567	728	1518	1054	2590
Plaquetas (cél/mL)	326	194	235	248	310
VGM (fL)	83	88	84	93	88
Hemoglobina (mg/dL)	11.4	12.5	13.3	13.9	15

<sup>†</sup>**Grupo 1:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina.

**Grupo 2:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo.

**Grupo 3:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina.

**Grupo 4:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina.

**Grupo 5:** 5 individuos sanos.

\* p=0.04

\*\*p=0.05

## Estudio Ex-Vivo

*Determinación de los niveles basales de TRAIL y CD95 en las CMNSP y de la apoptosis (Anexina-V).*

Para determinar si existía un incremento en la expresión de las moléculas TRAIL, TRAIL/CD95, CD95 y Anexina-V se examinó su expresión en la membrana de linfocitos T por FACS y las moléculas solubles liberadas al suero se cuantificaron por ELISA (Tabla 2).

**Tabla 2.** Expresión basal en la membrana de CMNSP de TRAIL, TRAIL/Fas(CD95), Fas(CD95) y Anexina V.

<b>Variables</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
TRAIL (%)	0.7	0.18	0.39	0.43	0.23
TRAIL/FAS (%)	9.67	2.63	6.29	8.11	11.99
FAS (%)	19.58	35.95	35.95	22.47	30.08
Anexina V (%)	4.24	3.96	3.01	3.70	5.80

†**Grupo 1:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina.

**Grupo 2:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo.

**Grupo 3:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina.

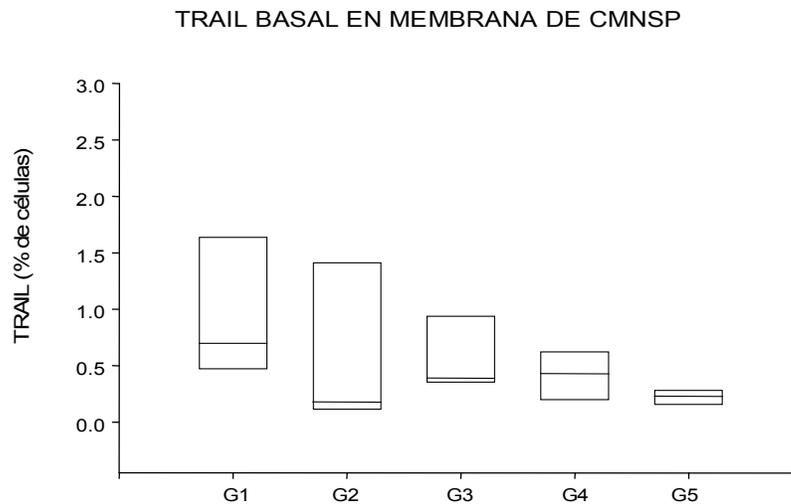
**Grupo 4:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina.

**Grupo 5:** 5 individuos sanos.

Los valores de están expresados en medianas

La expresión basal de TRAIL en la membrana celular, determinado por FACS, fue mayor en el grupo de pacientes con LEG activo y que recibían tratamiento con azatioprina vs. LEG inactivo con o sin tratamiento (G1 + G2 vs. G3 + G4;  $p < 0.05$ ; Figura 1). La expresión en membrana de TRAIL basal correlaciona positivamente con la actividad de la enfermedad pero no con el tratamiento con azatioprina (Tablas 1 y 2).

No se encontraron diferencias en los niveles de TRAIL membranaral en los pacientes del grupo de LEG activo con tratamiento comparado con el grupo de LEG activo sin tratamiento (G1 vs. G2;  $p = 0.37$ ). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de LEG inactivo sin leucopenia con o sin tratamiento (Tabla 2) (Figura 1).



**Figura 1.** TRAIL basal en membrana de CMNSP.

En cuanto a las determinaciones de TRAIL/Fas ( $p = 0.49$ ) y Fas ( $p = 1$ ) no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, se encontró una tendencia a la disminución de la expresión de Fas en el grupo de pacientes con LEG activo, leucopenia y que se encontraban tratados con azatioprina vs. los otros grupos de estudio (G1, Tabla 2).

La asociación de la presencia de anexina V en la superficie de la membrana es un indicador directo de que la célula se encuentra en apoptosis. A pesar de que los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, se observa una clara tendencia a un mayor número de células apoptóticas en el grupo de pacientes con LEG activo, leucopenia y tratados con azatioprina (Tabla 2).

Hubo asociación con los niveles elevados de anticuerpos anti-ADN ( $>$  de 50 UI) y los niveles de TRAIL ( $p < 0.05$ ), no así con TRAIL/Fas ( $p = 0.08$ ) y Fas ( $p = 0.55$ ).

Cuando los resultados se analizaron en los grupos de LEG activo con o sin tratamiento con el inmunosupresor vs. los grupos de LEG inactivo con o sin tratamiento con azatioprina no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en el grupo de pacientes de LEG activo con leucopenia se observó una tendencia a expresar niveles mayores de TRAIL y Fas acompañados de incremento en la apoptosis (Tabla 3).

Al comparar los grupos de LEG con y sin leucopenia, se observó una tendencia a expresar niveles mayores de TRAIL acompañados de incremento en la apoptosis en el grupo de pacientes con LEG y leucopenia (Tabla 4).

**Tabla 4.** Expresión basal de TRAIL, TRAIL/Fas (CD95), Fas (CD95) y Anexina V en la membrana de las CMNSP de los pacientes con LEG y leucopenia vs. LEG sin leucopenia (<3000).

<b>Variabes</b>	<b>Leucopenia n=10</b>	<b>Sin leucopenia n=15</b>	<b>P</b>
TRAIL (%)	0.47	0.34	0.68
TRAIL/Fas (%)	8.22	8.11	0.32
Fas (%)	23.1	26.3	0.58
Anexina V (%)	4.1	3.6	0.73

En el estudio, 3 pacientes del grupo de LEG activo tuvieron leucopenia a expensas de neutropenia. Al comparar a estos pacientes con los que tenían leucopenia a expensas de linfopenia se encontró que en los pacientes con neutropenia había una disminución estadísticamente significativa de la expresión de Fas en la membrana ( $p = 0.02$ ; Tabla 5 ).

**Tabla 5.** Marcadores de apoptosis entre pacientes con y sin neutropenia (<1500).

<b>Variabes</b>	<b>Neutropenia n=3</b>	<b>Sin neutropenia n=22</b>	<b>P</b>
TRAIL (%)	0.27	0.35	0.62
TRAIL/Fas (%)	1.97	8.36	0.09
Fas (%)	17.7	27.5	0.02
Anexina V (%)	4.2	3.7	0.63

Además, al comparar los pacientes con LEG con leucopenia a expensas de linfopenia vs. los pacientes sin linfopenia se observó una tendencia a expresar niveles mayores de TRAIL acompañados de un incremento en la apoptosis (anexina V) y menores de Fas en el grupo de pacientes con LEG y linfopenia (Tabla 6). Lo anterior sugiere que el principal mecanismo de apoptosis en los linfocitos de pacientes con LEG y leucopenia a expensas de linfopenia se lleva a cabo a través de TRAIL y en menor grado de FAS.

**Tabla 6.** Marcadores de apoptosis entre pacientes con y sin linfopenia.

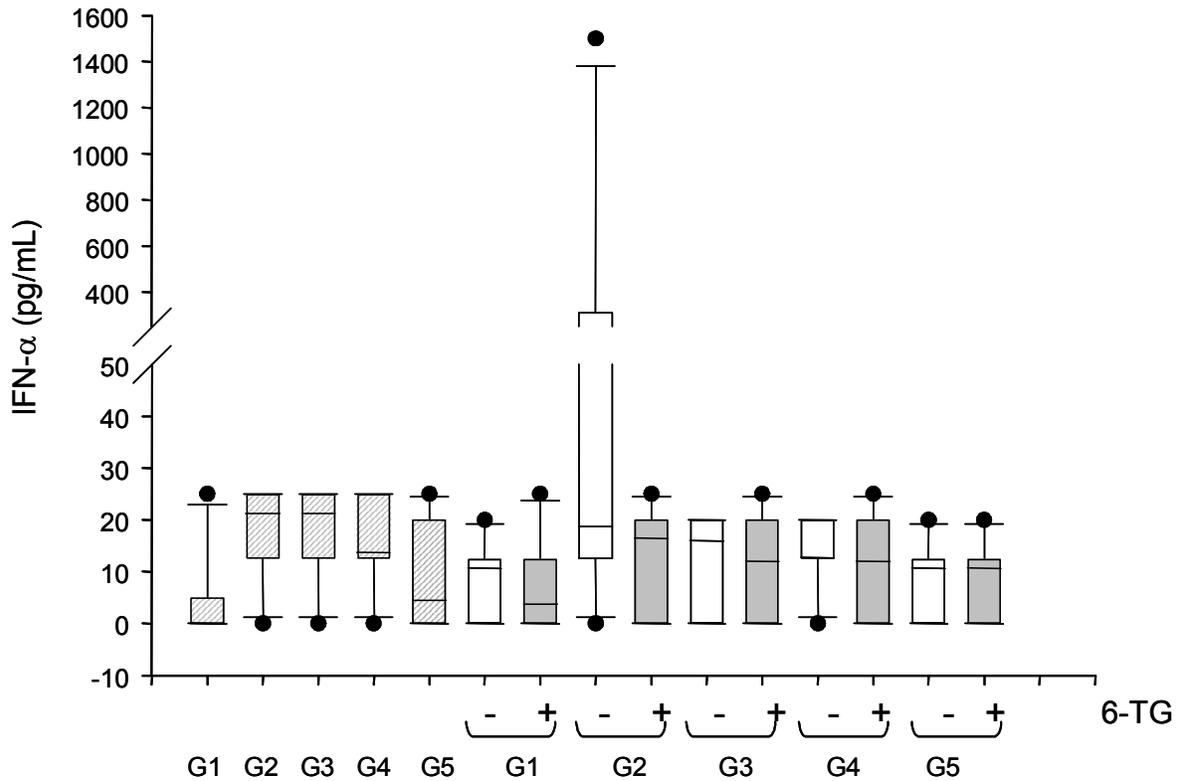
<b>Variables</b>	<b>Con linfopenia n=10</b>	<b>Sin linfopenia n=15</b>	<b>P</b>
TRAIL (%)	0.55	0.29	0.42
TRAIL/Fas (%)	7.1	9.95	0.13
Fas (%)	20.9	28.8	0.12
Anexina V (%)	4.1	3.3	0.22

*Determinación de los niveles séricos basales de IFN- $\alpha$ , TRAIL y CD95.*

La presencia de IFN- $\alpha$  el suero de los pacientes con LEG se ha asociado con la intensidad de la actividad del lupus principalmente a nivel renal y hematológico.

En este estudio se encontró que los niveles de INF- $\alpha$  sérico eran menores en el grupo de pacientes con LEG activo con tratamiento (G1) con respecto a los no tratados (G2) y a los inactivos con o sin tratamiento con azatioprina (G3 y G4, respectivamente; Figura 2).

## IFN- $\alpha$ EN SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LINFOCITOS ACTIVADOS



**Figura 2.** Determinación de IFN- $\alpha$  por el método de ELISA en el suero y los sobrenadantes de cultivo de linfocitos activados y condicionados sin o con 6-TG. (-): Cultivo de linfocitos activados durante 48 hs con anticuerpos anti-CD3/-CD28 sin 6-TG (barras en blanco); (+): Cultivo de linfocitos activados durante 48 hs con anticuerpos anti-CD3/-CD28 tratados con 6-TG durante 5 días (barras en gris); Barras a rayas representan la determinación del IFN- $\alpha$  sérico; **G1**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina; **G2**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo; **G3**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina; **G4**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina; **G5**: 5 individuos sanos. Los resultados se representan en pg/mL y corresponden a cultivos de 200 000 linfocitos/200  $\mu$ L de RPMI-1640/pozo.

No fue posible detectar los niveles de TRAIL debido a que el ELISA empleado no era suficientemente sensible para su detección. Por otro lado, la concentración sérica de Fas fue

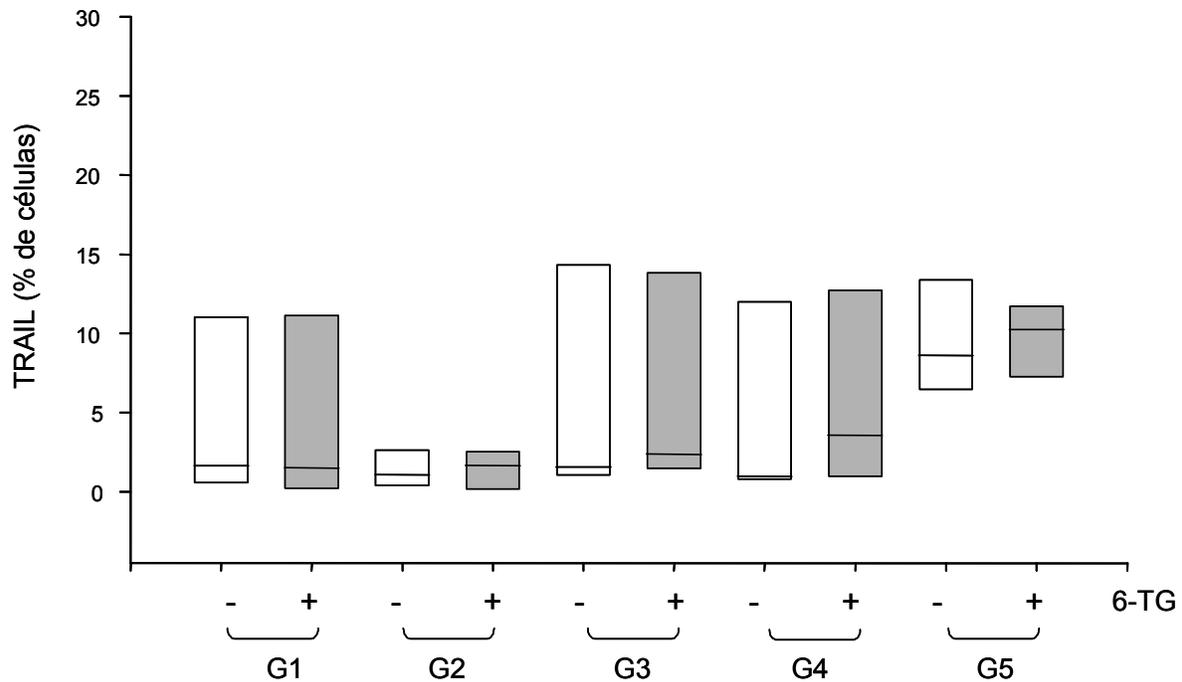
superior al del punto más concentrado (1000 pg/mL) de la curva estándar (dato no mostrado).

### **Estudio *In-Vitro***

Para determinar si la 6-tioguanina (6-TG; derivado metabólico activo de la azatioprina) inducía la leucolinfopenia, ésta se adicionó a cultivos de linfocitos T activados (anticuerpo anti-CD3/anti-CD28) o en reposo de cada uno de los pacientes e individuos sanos, a la concentración de 5 µg/mL (equivalente a la concentración que la 6-TG alcanza en sangre a dosis terapéutica).

Los niveles de expresión de TRAIL , TRAIL/Fas ( CD 95 ), Fas ( CD 95 ) y anexina V membranal, en los linfocitos T activados tratados con 6-TG no presentaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con los cultivos de linfocitos no tratados con 6-TG. Estos resultados sugieren que los niveles de apoptosis no se modifican después de la adición de 6-TG (Figura 3).

### TRAIL EN CULTIVOS DE LINFOCITOS ACTIVADOS



**Figura 3.** Determinación de TRAIL membranal por citometría de flujo en cultivos de linfocitos activados y tratados sin o con 6-TG. (-): Cultivo de linfocitos activados durante 48 h con anticuerpos anti-CD3/-CD28 y sin 6-TG (barras en blanco); (+): Cultivo de linfocitos activados durante 48 horas con anticuerpos anti-CD3/-CD28 y tratados por 5 días con 6-TG (barras en gris); **G1**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina; **G2**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo; **G3**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina; **G4**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina; **G5**: 5 individuos sanos. Los resultados se representan en porcentaje.

#### *Efecto de la 6-Tioguanina sobre TRAIL en los cultivos de linfocitos T activados.*

Al determinar los niveles de TRAIL membranal en las diferentes condiciones, se observó que en el grupo de pacientes con lupus activo y tratamiento con azatioprina (G1) la adición de 6-TG a los cultivos de linfocitos activados no indujo la expresión de TRAIL

en la superficie de las células (Tabla 7). Sin embargo en los grupos de pacientes con LEG activo sin tratamiento con azatioprina (G2) e inactivos con o sin tratamiento con el inmunosupresor (G3 y G4) se determinó un aumento de 1.5 a 3.7 veces la expresión de la molécula TRAIL en la superficie de las células (Tabla 7).

**Tabla 7.** TRAIL membranaral en linfocitos activados sin o con 6-TG

	<b>Basal (%)</b>	<b>CE/S-6TG (%)</b>	<b>CE/C-6TG (%)</b>
<b>G1</b>	0.7	1.66	1.51
<b>G2</b>	0.18	1.08	1.67
<b>G3</b>	0.39	1.58	2.36
<b>G4</b>	0.43	0.98	3.58
<b>G5</b>	0.2	8.61	10.25

†**Grupo 1:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina.

**Grupo 2:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo.

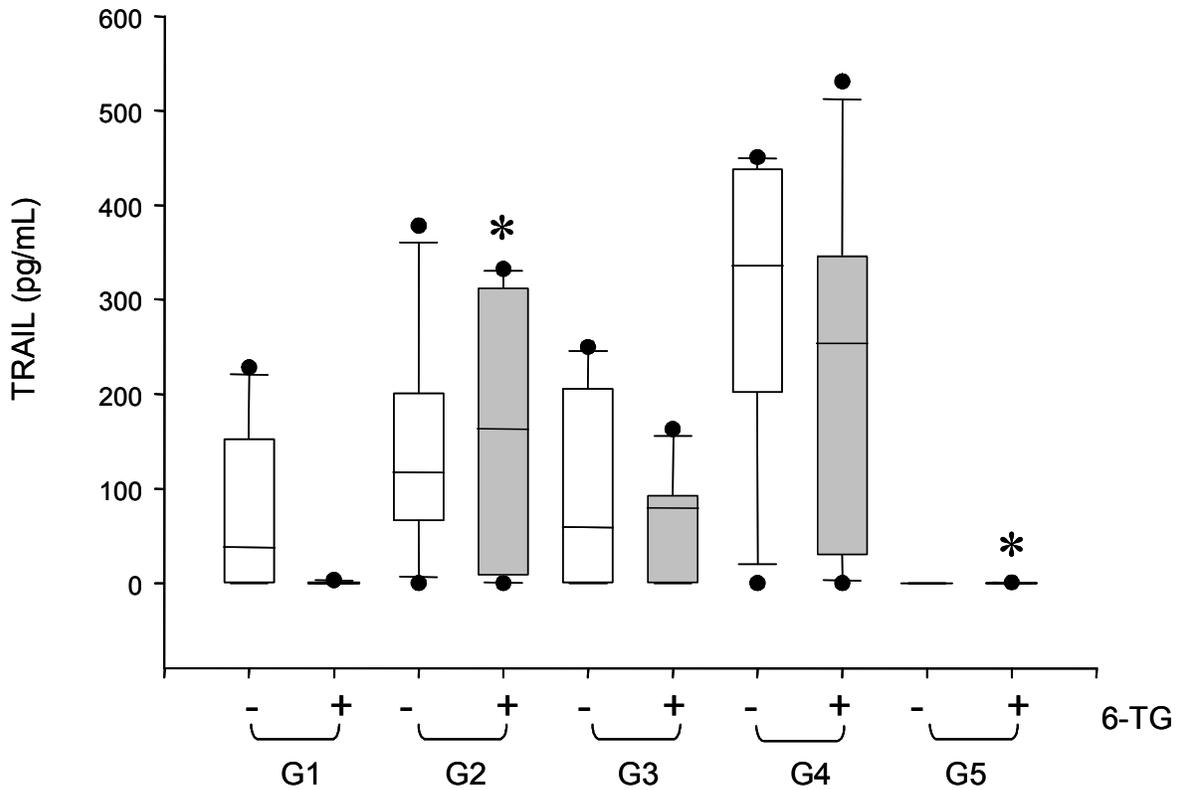
**Grupo 3:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina.

**Grupo 4:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina.

**Grupo 5:** 5 individuos sanos.

Al evaluar los niveles de TRAIL por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos T activados, se encontró el mismo patrón de respuesta en los grupos G2, G3 y G4 que lo observado por citometría de flujo (Tabla 7). Sin embargo los pacientes del grupo 1 presentaron una disminución estadísticamente significativa en la concentración de TRAIL en los cultivos de los linfocitos tratados con 6-TG ( $p = 0.05$  para G1 vs. G2 y G1 vs. G5). Es probable que este efecto dependa de que exista una exposición previa al fármaco por lo que los linfocitos se sensibilizan a la 6-TG, lo que los hace menos proclives a la inducción de la expresión en superficie o a la liberación al sobrenadante de la molécula.

## TRAIL EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LINFOCITOS ACTIVADOS



**Figura 4.** Determinación de TRAIL por el método de ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos activados tratados sin o con 6-TG. (-): Cultivo de linfocitos activados durante 48 hs con anticuerpos anti-CD3/-CD28 sin 6-TG (barras en blanco); (+): Cultivo de linfocitos activados durante 48 hs con anticuerpos anti-CD3/-CD28 y tratados con 6-TG por 5 días (barras en gris); **G1**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina; **G2**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo; **G3**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina; **G4**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina; **G5**: 5 individuos sanos. Los resultados se representan en pg/mL y corresponden a cultivos de 200 000 linfocitos/200  $\mu$ L de RPMI-1640/pozo. \* $p = 0.05$

*Efecto de la 6-Tioguanina sobre la expresión de Fas (Apo-1/CD95) y su liberación a los sobrenadantes de cultivo de linfocitos T activados.*

La expresión de Fas (CD95) en la membrana de los linfocitos activados incubados sin o con 6-TG, fue similar a la de TRAIL (Tabla 8). El aumento fue 1.1 a 1.4 veces mayor en los cultivos tratados vs. los que no se trataron con 6-TG.

**Tabla 8.** Fas (CD95) en la membrana de linfocitos T activados y tratados con o sin 6-TG

	<b>Basal (%)</b>	<b>CE/S-6TG (%)</b>	<b>CE/C-6TG (%)</b>
<b>G1<sup>†</sup></b>	19.58	31	14
<b>G2</b>	35.95	46.63	52.1
<b>G3</b>	24.2	29.68	30.84
<b>G4</b>	22.47	10.89	15.72
<b>G5</b>	30.08	35.71	32.56

<sup>†</sup>**Grupo 1:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina.

**Grupo 2:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo.

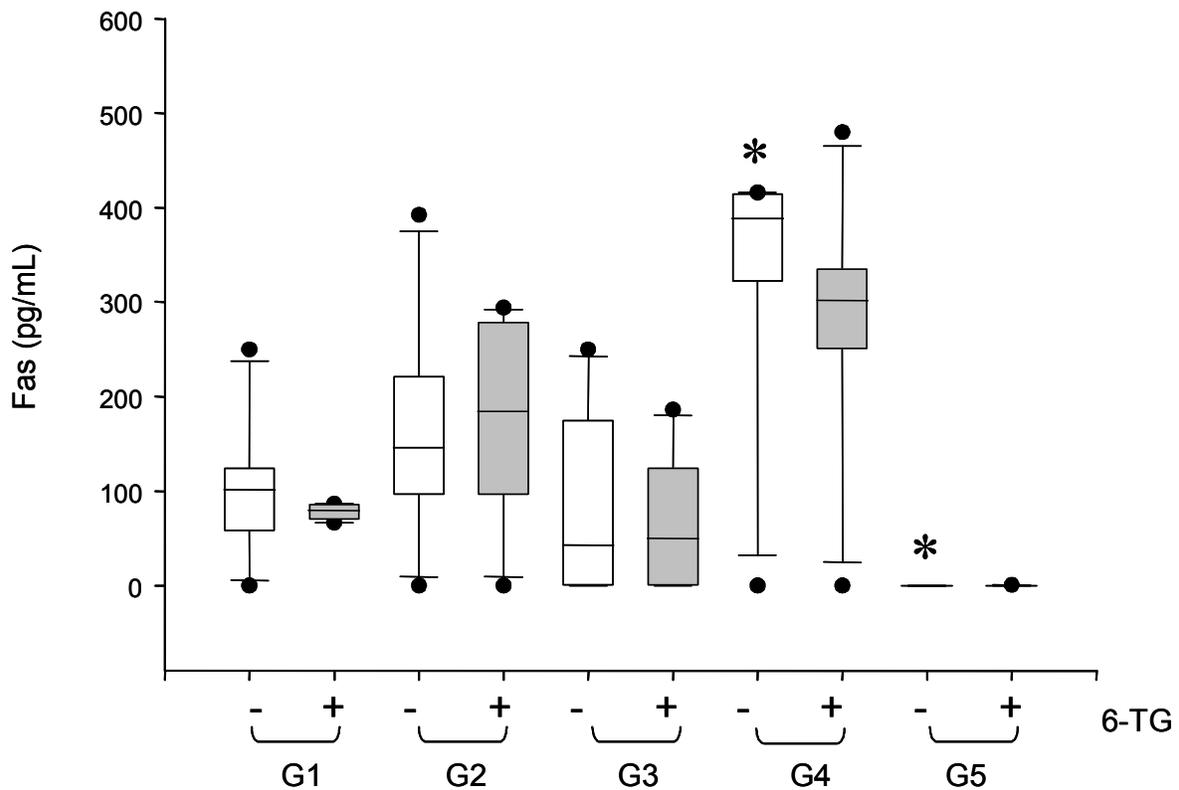
**Grupo 3:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina.

**Grupo 4:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina.

**Grupo 5:** 5 individuos sanos.

Los pacientes activos con leucopenia y azatioprina (G1) presentaron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de Fas en el sobrenadante cuando este grupo se comparó con el de los pacientes inactivos con azatioprina (G4;  $p = 0.045$ ) y con el grupo de individuos sanos (G5;  $p = 0.032$ ; Figura 5).

## FAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LINFOCITOS ACTIVADOS



**Figura 5.** Determinación de Fas (CD95) por el método de ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos activados y tratados con o sin 6-TG. (-): Cultivo de linfocitos activados durante 48 hs con anticuerpos anti-CD3/-CD28 sin 6-TG (barras en blanco); (+): Cultivo de linfocitos activados durante 48 hs con anticuerpos anti-CD3/-CD28 y tratados por 5 días con 6-TG (barras en gris); **G1**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina; **G2**: 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo; **G3**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina; **G4**: 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina; **G5**: 5 individuos sanos. Los resultados se representan en (pg/mL) y corresponden a cultivos de 200 000 linfocitos/200  $\mu$ L de RPMI-1640/pozo. \* $p < 0.05$

*Efecto de la 6-Tioguanina sobre la producción de IFN- $\alpha$  en los cultivos de linfocitos T activados.*

La determinación de los niveles de IFN- $\alpha$  en las diferentes condiciones de cultivo mostró que en los grupos G1, G3, G4 y G5, la concentración de la linfocina no se modificó en los cultivos tratados con 6-TG vs. los cultivos control que no fueron condicionados con el metabolito activo de la azatioprina. Únicamente, el grupo de pacientes con lupus activo vírgen al tratamiento tenía niveles 30 veces mayores de la linfocina, la cual disminuyó en los cultivos tratados con 6-TG (Figura 2).

*Efecto de 6-Tioguanina sobre la apoptosis*

En algunos trabajos, se apoya la posibilidad de que la azatioprina participa en la apoptosis a través de coestimulación de CD28. Para evaluar el efecto de 6-TG sobre la apoptosis de linfocitos activados y en reposo se evaluó la presencia de Anexina V en la membrana de las células. Esta determinación se realizó en las diferentes condiciones de cultivo. Los resultados muestran que los pacientes con lupus activo vírgen al tratamiento (G2) y con lupus inactivo sin tratamiento con el inmunosupresor (G3) eran 5 y 2 veces más susceptibles a sufrir apoptosis que el resto de los grupos en los que los niveles de anexina V no se modificaron (Tabla 9).

**Tabla 9.** Determinaciones de Anexina V membranal en diferentes condiciones de cultivo.

	<b>Basal</b>	<b>SE/S-6TG*</b>	<b>SE/C-6TG*</b>	<b>CE/S-6TG<sup>§</sup></b>	<b>CE/C-6TG<sup>§</sup></b>
<b>G1<sup>†</sup></b>	4.24	31.77	37.13	61.83	58.55
<b>G2</b>	3.96	36.15	21.44	17.92	37.88
<b>G3</b>	3.01	14.49	78.16	59.4	53.19
<b>G4</b>	3.71	69.37	75.51	80.25	75.24
<b>G5</b>	5.78	39.36	34.49	52.19	50.52

\*Cultivos de linfocitos en reposo (SE) o <sup>§</sup>activados con anticuerpos anti-CD3 y -CD28 (CE), \*sin (S-6TG) o <sup>§</sup>con 6-TG (C-6TG) después de 7 días.

**SE/S-6TG.** Sin estímulo y sin 6-TG.

**SE/C-6TG.** Sin estímulo y con 6-TG.

**CE/S-6TG.** Con estímulo, sin 6-TG.

**CE/C-6TG.** Con estímulo y con 6-TG.

<sup>†</sup>**Grupo 1:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia, tratados con azatioprina.

**Grupo 2:** 5 pacientes con LEG activo y leucopenia sin tratamiento inmunosupresor ni esteroideo.

**Grupo 3:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y sin tratamiento inmunosupresor con azatioprina.

**Grupo 4:** 5 pacientes con LEG inactivo, sin leucopenia y tratados con azatioprina.

**Grupo 5:** 5 individuos sanos.

### *Efectos sobre la médula ósea.*

Para evaluar el efecto de toxicidad del inmunosupresor sobre la médula ósea, a los 5 pacientes con actividad de la enfermedad, leucopenia y dosis intermedias de azatioprina (G1) se les realizó un aspirado. Después del análisis independiente por 2 hematólogos, se encontró que ninguno de los pacientes presentó alteraciones compatibles con toxicidad medular. Teniendo conocimiento de estos datos y debido al grado de actividad del lupus en estos pacientes, a todos ellos se les realizó un ajuste de la dosis de azatioprina. En la evaluación subsiguiente 6 a 8 semanas posteriores al incremento de la dosis de azatioprina se encontró que en 5 de ellos se incrementaron o normalizaron los niveles de leucocitos (3.7, 8.1, 5.5, 3.6 y 4.6 K/uL).

## **DISCUSION:**

Este trabajo es el primero en evaluar la asociación de la expresión de INF- $\alpha$ , TRAIL, Fas y Anexina en CMNSP y en cultivos de linfocitos activados o en reposo de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado en diferentes condiciones clínicas y de tratamiento. En trabajos previos se ha demostrado la asociación entre la actividad hematológica (leuco-linfopenia y neutropenia) del lupus y los niveles de TRAIL sérico y de membrana<sup>36</sup>. Nuestro trabajo surge del razonamiento de que la apoptosis, siendo el fenómeno que explica la fisiopatología de la leucopenia en pacientes con actividad de la enfermedad en quienes existe destrucción aumentada de estas células a nivel periférico, puede estar incrementada a pesar del empleo de inmunosupresor en dosis intermedias, postulando que las dosis empleadas en algunos pacientes sean insuficientes para controlar la intensidad de destrucción celular. De presentarse así el fenómeno, es posible que los marcadores de apoptosis estén aumentados y puedan detectarse en pacientes con leucopenia y actividad de la enfermedad a pesar de o por el efecto de la azatioprina.

Al determinarse la actividad de la enfermedad al momento de ingresarlos al estudio, se empleó la escala de SLEDAI-2K en una versión modificada, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos G1 y G2. Asimismo se determinó que los pacientes activos tenían anemia normocítica normocrómica, sin macrocitosis a pesar de la dosis de azatioprina de 2 mg/kg/día.

Al determinarse los niveles basales de TRAIL en el suero y la superficie de las células, ésta correlacionó positivamente con la actividad de la enfermedad. Donde, la expresión de TRAIL fue mayor en el grupo de pacientes con lupus eritematoso generalizado activo y que recibían tratamiento con azatioprina, comparado con el grupo inactivo con y sin tratamiento. En la determinación de TRAIL/Fas se encontró una tendencia a la disminución de la expresión de Fas en el grupo de pacientes con LEG activo con tratamiento.

Siendo la anexina V un marcador de apoptosis celular, su presencia en la superficie de la membrana es un indicador directo de que la célula se encuentra en apoptosis. En el estudio se observó una clara tendencia a un mayor número de células apoptóticas en el grupo de pacientes con LEG activo o inactivo que no recibían azatioprina.

Los resultados anteriores sugieren que el principal mecanismo de apoptosis en la CMNSP de pacientes con LEG y leucopenia se lleva a cabo principalmente a expensas de TRAIL y en menor grado Fas.

De manera interesante se observó el hallazgo de asociación entre los niveles elevados de anti-ADNdc (>50 UI) y los niveles de TRAIL, no así para el resto (TRAIL/Fas y Fas); muy probablemente relacionado con el grado de actividad de la enfermedad.

Tres pacientes con LEG activo presentaron neutropenia (17%) la cual se asoció a una disminución estadísticamente significativa de la expresión de Fas en la membrana celular al compararlos con los pacientes que presentaban leuco-linfopenia.

Al comparar los pacientes de LEG con leucopenia a expensas de linfopenia contra los pacientes sin linfopenia, se observó una tendencia a expresar niveles mayores de TRAIL, acompañados de incremento de anexina V y menores de Fas. Lo anterior sugiere, que el principal mecanismo de apoptosis en los linfocitos de pacientes de LEG con linfopenia, se lleva a cabo a través de TRAIL, como ha sido demostrado en otro estudio llevado a cabo por Lub-de Hooge y cols<sup>37</sup>.

En cuanto al estudio *in-vitro*, al determinar los niveles de TRAIL, TRAIL/Fas, Fas y anexina V por citometría de flujo, en cultivos de linfocitos activados o en reposo y tratados o no con el metabolito activo de la azatioprina, la 6-TG, se determinó que el compuesto no inducía la apoptosis de linfocitos obtenidos de los pacientes tratados con azatioprina pero sí en los que eran vírgenes al tratamiento o que se encontraban inactivos y sin tratamiento. Nuestros resultados contradicen los hallazgos reportados por el grupo de Cuffari y cols.<sup>38</sup>

Se encontró que los pacientes con actividad del LEG sin tratamiento tienen niveles elevados de IFN- $\alpha$  y que la adición de 6-TG a los cultivos de linfocitos activados de estos pacientes los disminuía en aproximadamente 30 veces. Este incremento en los niveles de IFN- $\alpha$ , posiblemente se relacione con la actividad y la gravedad de la enfermedad, como lo reportó previamente Kirou y cols<sup>39</sup>.

A los pacientes con actividad de la enfermedad con uso de azatioprina, se les realizó aspirado de médula ósea, considerado como el estándar de oro para determinar toxicidad. No se encontró citotoxicidad, por lo que a los pacientes se les ajustó el tratamiento farmacológico obteniendo una adecuada respuesta clínica y de los datos de laboratorio. Lo anterior confirma los hallazgos *ex vivo* e *in vitro*.

Dentro de las limitaciones del estudio, están que el número de pacientes por grupo fue pequeño, y con ello no se pudo demostrar diferencia estadísticamente significativa entre ellos, únicamente tendencias en la mayoría de los datos; además de la gran heterogeneidad de la enfermedad estudiada en cuestión, amerita el incremento en el número de pacientes por grupo. Además de la falta de un grupo de pacientes con lupus activo sin leucopenia con y sin azatioprina.

Los resultados de este trabajo sugieren que la leucopenia presente en los pacientes con LEG activo tratados con azatioprina es una propiedad inherente a la actividad de la enfermedad y no es inducida por la toxicidad del fármaco, lo cual señala a la azatioprina como un fármaco seguro. Lo anterior permite definir el papel de ésta en la toma de decisiones en cuanto a poder diferenciar entre actividad de la enfermedad o toxicidad farmacológica.

## REFERENCIAS:

- 1.- Rosenthal N, Farhi D. Bone marrow findings in connective tissue disease. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 650-654.
- 2.- Bacon BR, Truehaft WH, Goodman AM. Azathioprine-induced pancytopenia. Occurrence in two patients with connective-tissue disease. *Arch Intern Med* 1981; 141: 223-226.
- 3.- Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJ, Mysler E, Elkon KB. Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38 (12): 1735-7.
- 4.- Hsieh SC. Anti-SSB/la is one of the antineutrophil autoantibodies responsible for neutropenia and functional impairment of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2003; 131 (3): 506-16.
- 5.- Kurien BT. Association of neutropenia in lupus erythematosus (SLE) with anti-Ro and binding of an immunologically cross-reactive neutrophil membrane antigen. *Clin Exp Immunol* 2000; 120 (1): 209-17.
- 6.- Goel N, Ulrich DT, St Clair EW, Fleming JA, Lynch DH, Seldin MF. Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1995; 38 (12): 1611-2.

- 7.- Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (6): 1126-9.
- 8.- Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ & Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 309-314.
- 9.- Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T, Smolewski P. Peripheral blood lymphocyte apoptosis and circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with immunological status and disease-related symptoms. *Clin Rheumatol* 2006; 25 (2): 225-33.
- 10.- Alecu M, Coman G, Alecu S. Serological levels of apoptotic bodies, sFas and TNF in lupus erythematosus. *Rom J Intern Med* 2000-2001; 38-39: 83-8.
- 11.- Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, McConnell J, Kennedy RJ, Bell AL. Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. *Lupus* 1999; 8 (7): 508-13.
- 12.- Xue C, Lan-Lan W, Bei C, Jie C, Wei-Hua F. Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol* 2006; 239 (2): 121-8.

13.- Hartman K. Anti-neutrophil antibodies of the immunoglobulin M class in autoimmune neutropenia. *Am J Med Sci* 1994; 308: 102-105.

14.- Jonsson K, Sturfelt G. A novel assay for neutrophil clustering activity of human sera: relation to disease activity and neutropenia in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 46-50.

15.- Abramson SB, Given WP, Edelson HS, Weissmann G. Neutrophil aggregation induced by sera from patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 630-636.

16.- Martínez-Bolaños D. Moderate and severe neutropenia in patients with systemic lupus erythematosus. In press.

17.- Michael SR. The hematologic aspects of disseminated lupus erythematosus. *Blood* 1951; 6: 1059-1072.

18.- MacDuffie FC. Bone marrow depression after drug therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1965; 24: 289-292.

19.- Rivero SJ. T-lymphocyte subpopulation in untreated SLE. *Arthritis Rheum* 1977; 20 (6): 1169-73.

20.- Díaz-Jouanen E. Cold-reactive lymphocytotoxic antibodies in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 1977; 4: 4-10.

21.- Kao AH. Review of ACR hematologic criteria in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13 (11): 865-8.

22.- Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJ, Mysler E, Elkon KB. Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38 ( 12): 1735-7.

23.- Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003; 48 (10): 2888-97.

24.- Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. *Lupus* 2001; 10 (12): 866-72.

25.- Tsai HF. Induction of costimulation of human CD4 T cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: possible role in T cell activation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50 (2): 629-39.

26.- Rus V. Increased expression and release of functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by T cells from lupus patients with active disease. *Clin Immunol* 2005; 117 (1): 48-56.

27.- Amasaki Y. Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cells subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 245-50.

28.- Silvestris F. Enhancement of T cell apoptosis correlates with increased serum levels of soluble Fas (CD95/Apo-I) in active lupus. *Lupus* 2003; 12: 8-14.

29.- Cara CJ. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: Towards a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* 2004; 10(11): 247-54.

30.- Maltzman JS. Azathioprine: old drug, new actions. *J Clin Invest* 2003; 111: 1122-4.

31.- Thomas CW. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: A mechanism of immune suppression by thiopurines. *JPET* 2005; 312: 537-45.

32.- Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T, Smolewski P. Peripheral blood lymphocyte apoptosis and circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with immunological status and disease-related symptoms. *Clin Rheumatol* 2006; 25 (2): 225-33.

33.- Tiede I. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4 T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003; 111: 1133-45.

34.- Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (3): 363-369.

35.- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, et al. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25 (11): 1271-1277.

36.- Matsuyama W, Yamamoto M, Higashimoto I, Oonakahara K, Watanabe M, Machida K, Yoshimura T, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand is involved in neutropenia of systemic lupus erythematosus. *Blood* 2004; 104: 184-191.

37.- Lub-de Hooge MN. Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 854-8.

38.- Cuffari C. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48: 642-6.

39.- Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MG, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52 (5): 1491-503.