

Citocinas en médula ósea de pacientes con linfoma no Hodgkin.

Estudio por RT-PCR y revisión de la literatura

Palabras clave: Hematopoyesis, médula ósea, citocinas, linfoma no Hodgkin, PCR.

Key words: Hematopoiesis, bone marrow, cytokines, non-Hodgkin lymphoma, PCR.

Recibido: 09/11/2000
Aceptado: 14/12/2000

Nancy Muñoz Hernández,* Diana E Aguilar León,* Erasmo Martínez-Cordero,* Juan Labardini Méndez**

* Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, Tlalpan. México D.F., C.P. 14080. Tel: 5666-4539, Ext. 243.

** Instituto Nacional de Cancerología. Av. San Fernando 22, Col. Tlalpan, México, D.F. C.P. 1400. Tel: 5628-0425.

Correspondencia:

Dr. Erasmo Martínez-Cordero

Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, Tlalpan, México, D.F., México.

27

Resumen

El conocimiento de las interacciones que se llevan a cabo entre los precursores y progenitores sanguíneos con los componentes estromales y los factores solubles en la médula ósea (MO), ha sido la base para estudiar la existencia de anomalías específicas en el microambiente hematopoyético. En neoplasias hematológicas como el linfoma no Hodgkin (LNH) se desconoce si existen anomalías en cuanto a la producción de citocinas en la MO y si éstas pueden afectar el desarrollo de los progenitores linfoides predisponiéndolos a la neoplasia. Mediante el empleo de retrotranscripción y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se estudió la expresión de citocinas supresoras de la hematopoyesis como interleucina-10 (IL-10), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ) en aspirados de MO de 20 pacientes con LNH sin tratamiento previo. El grupo testigo incluyó 19 individuos clínicamente sanos pertenecientes al programa de trasplante de MO. También se determinó la expresión de TGF- β en 15 pacientes y 15 testigos mediante la misma técnica. La

Summary

The study of bone marrow in hematology has made possible the interaction's analysis of precursor and progenitors cells with stromal components and soluble factors. It has been useful to understand the existence of specific abnormalities in the hematopoietic microenvironment. In hematological malignancies like non-Hodgkin's lymphoma different abnormalities in the cytokine production may occur in the bone marrow affecting the development of lymphoid progenitors, however no previous studies about their relevance in malignancy have been made. Twenty patients with non-Hodgkin's lymphoma and nineteen healthy controls were studied. None of them received treatment. IL-10, TNF- α , IFN γ , and TGF- β that have showed hematopoietic inhibitory function were studied in bone marrow using RT-PCR. After RNA separation by the guanidine-thiocyanate method we obtained cDNA by the reverse transcriptase reaction. For PCR amplification, taq DNA polymerase, specific oligonucleotides and the control β -actin were used. The non-Hodgkin's lymphoma group

extracción de ARN se realizó con el método de isotiocianato de guanidina y el ADNc fue obtenido por retrotranscripción. La amplificación por PCR se realizó con Taq ADN-polimerasa y oligonucleótidos específicos para cada citocina y β -actina empleada como testigo interno de la síntesis de ADNc. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Se encontró una disminución en la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ ($p=0.001$) y $\text{TGF-}\beta$ ($p=0.001$) en LNH comparado con el grupo testigo. En cambio, no se observó una diferencia significativa en la presencia de IL-10 e IFN- γ entre ambos grupos. Los resultados obtenidos sugieren una expresión anormal de citocinas inhibitorias en la MO, lo que podría conducir a: 1) defectos en la diferenciación y desarrollo anormal de las células progenitoras, 2) un desbalance de los mecanismos hematopoyéticos que regulan el crecimiento celular y 3) escape de las células anormales a la apoptosis, favoreciendo la transformación neoplásica de las células linfoides y sus progenitores en linfoma no Hodgkin.

showed a negative expression of $\text{TNF-}\alpha$ ($p=0.001$) and $\text{TGF-}\beta$ ($p=0.001$) (Fisher's test). We did not observe significant differences in the expression of IL-10 and IFN- γ between both groups. These results suggest an abnormal expression of inhibitory cytokines in the bone marrow's patients with non-Hodgkin's lymphoma, which may conduce to: 1) Defects in the differentiation and development of progenitor cells, 2) Unbalanced of the hematopoietic mechanisms which regulate the cellular growth, and 3) Avoid of apoptosis that may affect the hematopoietic function.

Introducción

28

El proceso de generación de las células sanguíneas se conoce como hematopoyesis (*hemato*: sangre, *poiesis*: formación). En el humano adulto, este fenómeno tiene lugar en la médula ósea (MO) de los huesos planos y se inicia a nivel unicelular con la autoduplicación de la célula madre, seguida de diferenciación, maduración y finalmente la producción de elementos sanguíneos formes.^{1,2}

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

El MIH es un complejo heterogéneo de células y sus respectivos productos que mantiene y regula el crecimiento de la célula totipotencial hematopoyética (CTH). Está constituido por fibroblastos, células reticulares, células endoteliales y macrófagos, fibras de reticulina, colágena (tipos I, III, IV y VI), laminina, fibronectina y proteoglicanos. Las células accesorias maduras como NK (natural killer), monocitos y linfocitos

participan en la formación del MIH al secretar citocinas y factores de crecimiento, además de mantener interacciones célula-célula con los precursores en desarrollo.^{1,3}

Las citocinas son un grupo diverso de proteínas intracelulares de señalización que regulan no sólo las respuestas inmunitarias e inflamatorias locales y sistémicas, sino también la hematopoyesis. Su presencia en el microambiente de la MO es de vital importancia ya que participan como un mecanismo que controla los procesos de diferenciación, maduración, sobrevivencia y proliferación de las células madre y su progenie.^{4,5} El estroma participa activamente en la regulación de la hematopoyesis estable⁶ al producir varias citocinas en bajas concentraciones, como el factor estimulantes de colonias (CSF) de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos (G-CSF), CSF de granulocitos, monocitos (GM-CSF), factor transformante de crecimiento-beta ($\text{TGF-}\beta$), factor de necrosis tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), $\text{TNF-}\beta$, interleucina (IL)-1 β (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7,⁶ IL-11, IL-15⁸ e IL-17.⁹ Citocinas como IL-1 α , IL-2, IL-5, IL-9, IL-12 e interferón-gamma (IFN- γ)⁶ parecen no estar pre-

sentes de forma constitutiva y forman parte de la regulación autocrina o paracrina de la hematopoyesis inducible, siendo expresados como respuesta a un estímulo específico.^{6,10} Otras llegan a la MO a través de la sangre arterial y provienen de células maduras (como linfocitos, monocitos y NK) que han sido activadas en otros tejidos.^{1,4,11-14}

Se ha propuesto que diversos factores inhibidores pueden suprimir selectivamente la proliferación de las células hematopoyéticas e inducir la muerte celular por apoptosis.^{15,16} Algunos reguladores como el TNF- α , IFN- γ y TGF- β pueden bloquear el ciclo celular de los progenitores primitivos¹⁷ y el crecimiento de algunas unidades formadoras de colonias (UFC) como la de granulocitos-monocitos (UFC-GM), la de granulocitos (UFC-G), la UFC de granulocitos-eritrocitos-monocitos-megacariocitos (UFC-GEMM), la de megacariocitos (UFC-Meg), la de brotes eritroides (UFC-BE), la de linfocitos B (UFC-LB) y la de linfocitos T (UFC-LT), así como la síntesis de factores estimulantes.

El conocimiento de las complejas interacciones que se llevan a cabo entre los precursores y progenitores sanguíneos con los componentes estromales y los factores solubles en la MO, ha sido la base para estudiar la posible existencia de anormalidades específicas en el microambiente hematopoyético, particularmente en neoplasias sanguíneas como las leucemias y los mielomas. Los investigadores señalan que el efecto neto de un elevado índice de sobrevivencia y autorrenovación de las células neoplásicas puede estar relacionado con un incremento en la producción de factores estimulantes, una disminución en la producción de factores inhibidores o una combinación de ambos.¹⁸

Sin embargo, en otras neoplasias poco estudiadas como el LNH, que afecta principalmente a las células linfoides B y T,¹⁹ se desconoce la existencia de alteraciones en la producción de citocinas en MO y si éstas afectan el desarrollo temprano de los progenitores linfoides predisponiéndolos a la neoplasia.

En los pacientes con LNH puede existir cambios en la expresión de citocinas en la MO en comparación con individuos sanos, lo que podría estar relacionado con una alteración en los mecanismos de regulación hematopoyética.

Con la finalidad de conocer cómo es la expresión de algunas citocinas, especialmente inhibitorias (IL-10, TNF- α , IFN- γ y TGF- β), en la MO de pacientes con LNH en comparación con individuos sanos se realizó el presente trabajo. Los resultados pueden contribuir a la comprensión de algunos de los mecanismos que podrían estar involucrados en la patogenia de esta enfermedad y apoyar otros estudios en el campo de las neoplasias sanguíneas.

Material y métodos

Para el estudio se incluyeron los siguientes grupos:

Grupo A: 20 pacientes (10 mujeres y 10 hombres), seleccionados por el hematólogo, con diagnóstico oncológico definitivo de LNH correspondientes a cualquiera de sus diferentes tipos, sin tratamiento previo (quimioterapia o radioterapia). La edad osciló entre los 17 y los 85 años con un promedio de 53.5 años, su diagnóstico se confirmó mediante estudios clínicos, de laboratorio y gabinete.

Grupo B (grupo testigo): 19 individuos clínicamente sanos pertenecientes al programa de trasplante de MO, quienes no recibieron factores estimuladores de colonias (GM-CSF, G-CSF) antes del aspirado. La edad osciló entre 27 y 66 años.

Tanto a los pacientes con LNH como a los individuos sanos se les solicitó su consentimiento para la donación de las muestras de médula ósea y su inclusión en el protocolo, siguiendo los lineamientos de la declaración de Helsinki.²⁰

Todas las muestras de MO fueron obtenidas por aspiración de la cresta ilíaca posterior y colocadas en tubos estériles con heparina (5UI/mL). Los eritrocitos fueron eliminados con solución hipotónica de cloruro de amonio (solución de lisis)

0.15M y las células totales fueron lavadas 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos con albúmina al 0.5% (PAB) estéril y una vez con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril.

La extracción de ARN se realizó mediante el método de isotiocianato de guanidina,^{21,22} empleando el reactivo de Trizol^{23,24} (GIBCO-BRL). Para ello se adicionó 1 mL de Trizol por cada 1×10^6 células, se homogeneizó e incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Por cada mL de Trizol se adicionaron 0.2 mL de cloroformo. Se agitó e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 12 000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El ARN se recuperó de la fase acuosa y se precipitó adicionando un volumen de isopropanol e incubando a 4°C durante 15 minutos. Se centrifugó a 12 000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El ARN precipitado fue lavado con etanol al 75% (v/v), enfriado previamente a 4°C y centrifugado a 12 000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y el botón se secó con un sistema de condensación (SAVANT). El pellet fue diluido en 20 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato estéril (agua-DEPC) y se incubó a 55°C por 10 minutos para linearizar el ARN. Para cuantificar la concentración del ARN total se utilizó un equipo comercial (GENE QUANT, Pharmacia). Se procedió a verificar la integridad del ARN constitutivo (subunidades 18s y 28s) a través de un gel de agarosa al 1% (p/v).

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN extraído mediante un procedimiento con transcriptasa reversa²¹ utilizándose 5 µg de ARN total, 0.5 µg de oligo (dT) (GIBCO-BRL) y agua-DEPC estéril cbp 12 µL. Se incubó a 70°C durante 10 minutos y se colocó inmediatamente en hielo. Después se adicionaron amortiguador de reacción 1X [Tris-HCl 250 mM, (pH 8.3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM] (GIBCO-BRL), DTT 0.01 M (GIBCO-BRL) y dNTP 0.5 mM. Todo lo anterior a concentración final en un volumen total de 20 µL. Se incubó a 42°C por 2 minutos. Se agregaron 200 unidades (U) de la enzima transcriptasa inversa Super Script

II (200 U/µL) (GIBCO-BRL). Se mezcló brevemente y se incubó a 42°C durante 50 minutos. Se inactivó la enzima, incubando la mezcla a 70°C durante 15 minutos. Una vez obtenido el ADNc, el ARN restante se eliminó con 1 U de ARNasa H (GIBCO-BRL) y se incubó a 37°C durante 20 minutos. El ADNc sintetizado se almacenó a -70°C hasta su empleo.

Se realizó la determinación de las citocinas IL-10, TNF-α, INF-γ y TGF-β y el gen constitutivo de β-actina empleado como testigo interno de la síntesis del ADNc.²¹ Para ello se mezclaron los siguientes reactivos: amortiguador de PCR 1X [Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM] (GIBCO-BRL), MgCl₂ 1.5 mM (GIBCO-BRL), dNTP 0.2 mM (GIBCO-BRL), oligonucleótidos sentido y anti-sentido específicos para cada una de las citocinas y β-actina, ambos a una concentración de 3 mM, 2 µL de ADNc blanco, 0.6 U de Taq ADN polimerasa (GIBCO-BRL); todo lo anterior a concentración final, así como agua-DEPC estéril cbp 25 µL. Una vez mezclado se adicionaron 25 µL de aceite mineral (SIGMA). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador programado de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Cada experimento incluyó testigos positivo (PCR con ADNc de cada citocina) y negativo (reactivos de PCR sin ADNc).

Los resultados negativos fueron confirmados incrementando los pasos de amplificación a 40 y 60 ciclos de PCR.

Para valorar la presencia del fragmento amplificado se realizó un gel de acrilamida al 16%, empleando como referencia marcadores de peso molecular (100 pb, 0.1 µg/µL, GIBCO-BRL). El corrimiento se llevó a cabo con amortiguador de Tris-Boratos-EDTA 1X (TBE 1X) a pH de 8.0, manteniendo un voltaje constante de 100 volts durante 2 horas, en una cámara vertical. Una vez transcurrido el tiempo, la presencia de bandas se manifestó mediante tinción con sales de plata. El gel fue analizado con un programa de computadora (Kodak).

Cuadro I. Secuencia de los oligonucleótidos específicos para citocinas y β -actina.

Citocinas y β -actina	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Producto (pb)
IL-10	5'AAATTTGGTTCTAGGCCGGG3'	5'GAGTACAGGGGCATGATATC3'	264
TNF- α	5'ACAAGCCTGTAGCCCATGTT3'	5'AAAGTAGACCTGCCCAGACT3'	427
IFN- γ	5'GCAGAGCCAAATTGTCTCCT3'	5'ATGCTCTTCGACCTCGAAAC3'	290
TGF- β	5'CCAGTGGACATCAACGGGTT3'	5'GCAGGAGCGCACGATCATGT3'	465
β -actina	5'GGTCTCAAACATGATCTGGG3'	5'GGGTCAAGGATTTCCTATG3'	310

pb: pares de bases

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el RT-PCR y el tamaño del producto de amplificación se presentan en el *cuadro I*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de citocinas se realizó mediante la prueba exacta de Fisher²⁵ tomando en cuenta un α igual o menor a 0.05 como valor significativo.

Resultados

Se determinó de manera cualitativa, mediante la técnica de RT-PCR, la expresión de IL-10, TNF- α , IFN- γ y TGF- β en células totales de MO.

Los resultados de las citocinas fueron obtenidos usando un estándar de 35 ciclos de PCR. Los resultados negativos fueron confirmados mediante 40 y 60 ciclos de amplificación por PCR.

Todas las muestras sometidas al estudio, tanto del grupo A como del grupo B fueron positivas para β -actina, lo cual nos permitió comprobar que la extracción del ARN y la síntesis de ADNc fue adecuada.

Los resultados de la expresión individual de cada una de las citocinas en los pacientes con LNH se muestran en el *cuadro II*, así como los resultados obtenidos en los testigos.

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

El TNF- α no se detectó en ninguno de los pacientes (0%) pero sí en 8 de los 19 (42%) testigos (*cuadro II*), lo que señala una importante diferencia de su expresión entre ambos grupos ($p = 0.001$).

En lo que respecta al TGF- β , no se detectó la presencia del amplificado en ninguno de los 15 pacientes (0%), pero sí en 8 de los 15 individuos sanos (53%) (*cuadro II*). La diferencia mostrada en la expresión de TGF- β entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa ($p = 0.001$).

No hubo diferencia en la expresión de IL-10 entre el grupo testigo y el grupo de LNH ($p = NS$) ya que fue expresado en 11 de los 20 pacientes (55%) y en 11 de los 19 testigos (58%).

La diferencia en la expresión del IFN- γ tampoco resultó estadísticamente significativa, puesto que fue positivo en 6 de los 20 pacientes (30%) y en 7 de los 19 testigos estudiados (37%).

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

De manera interesante, todos los pacientes con un fenotipo de LNH de células B (pacientes 4, 8, 10, 13 y 15) presentaron con frecuencia resultados positivos para IL-10

En la *figura 1* se muestra un gel representativo en donde puede observarse el corrimiento característico del segmento amplificado específico para cada citocina.

Cuadro II. Expresión de citocinas en médula ósea de pacientes con linfoma no Hodgkin y de testigos por RT-PCR.

Paciente	Edad/Sexo	Diagnóstico histológico de LNH	IL-10	TNF- α	IFN- γ	TGF- β
1	76/F	Difuso de células grandes inmunofenotipo T	+	-	-	-
2	54/M	Difuso folicular de células pequeñas	-	-	+	ND
3	29/F	Difuso de células grandes inmunofenotipo T	-	-	-	ND
4	38/M	Difuso de células pequeñas inmunofenotipo B	+	-	-	-
5	45/M	Gástrico	+	-	+	-
6	60/F	Cutáneo de células T (micosis fungoide)	-	-	-	-
7	36/M	Difuso de células grandes	+	-	-	-
8	49/M	Células grandes inmunofenotipo B	+	-	-	-
9	36/F	Angiocéntrico	-	-	-	ND
10	85/F	Células pequeñas inmunofenotipo B	+	-	+	-
11	52/M	Células grandes, tipo sarcoma inmunoblástico	-	-	-	-
12	66/F	Intestinal de células grandes, difuso no inmunoblástico	+	-	-	-
13	73/M	Difuso de células grandes inmunofenotipo B	+	-	-	-
14	58/F	Inmunoblástico	-	-	-	ND
15	37/F	Difuso de células grandes inmunofenotipo B	+	-	-	-
16	57/F	Difuso de células grandes y pequeñas hendidas, angiocéntrico	+	-	-	-
17	17/M	Células grandes inmunofenotipo T, tipo sarcoma inmunoblástico	-	-	+	-
18	69/M	No clasificable	-	-	+	-
19	59/F	Folicular de células pequeñas	-	-	-	ND
20	74/M	Cutáneo difuso de células grandes inmunofenotipo T	+	-	+	-
Total			11/20	0/20	6/20	0/15
Testigos:						
Hombres: 10						
Mujeres: 9						
Edad: 27 a 66 años						
Individuos sanos			11/19	8/19	7/19	8/15

ND: No determinado. Presencia de 2 o más citocinas: LNH= 3/10(15%); Testigos= 12/19 (63%).

IL-10: interleucina 10 TNF- α : factor de necrosis tumoral α IFN- γ : interferón γ TGF- β : factor transformante de crecimiento β .

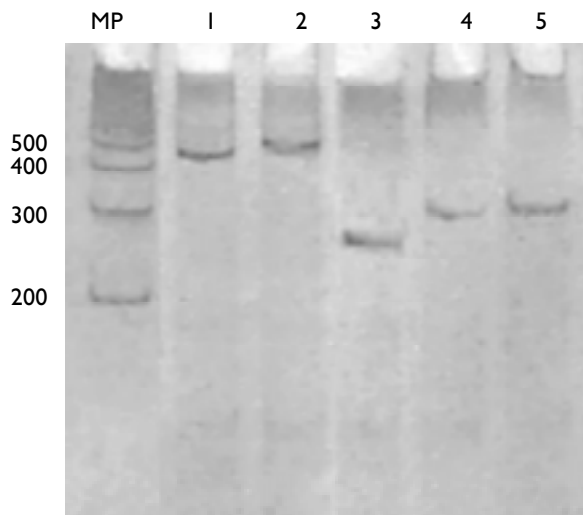
Discusión

En neoplasias hematológicas como las leucemias^{26,27} y los mielomas,²⁸ la alteración en la producción de citocinas en MO, tanto estimulantes como inhibitorias, ha sido relacionada con el origen y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en otras malignidades, como los linfomas, el estudio de estos factores se ha limitado a ganglios linfáticos y sangre periférica (SP).

La presente investigación se realizó con el objetivo de detectar a través de RT-PCR la existencia de anomalías en la producción de citocinas, específicamente inhibitorias (IL-10, TNF- α , IFN- γ y TGF- β), en MO de pacientes con LNH.

El TNF- α es producido por las células estromales de la MO en los sujetos sanos, como ha sido demostrado por otros autores²⁵ mediante RT-PCR, lo cual concuerda con los resultados presentados en este trabajo.

En la hematopoyesis normal, el TNF- α inhibe directamente la proliferación de los progenitores pluripotenciales y favorece de la misma forma el crecimiento y la diferenciación de las células pre-B a linfocitos B maduros.²⁹ El TNF- α también muestra efectos inhibitorios de la proliferación sobre la UFC-eritroides (UFC-E) y suprime la expansión de las células progenitoras inducida por IL-3 y la producción de progenitores comprometidos, disminuyendo la expresión de receptores para SCFs.³⁰ Además



Carril MP: Marcadores de peso molecular para ADN en pares de bases (pb); carril 1: muestra positiva para IFN α ; carril 2: muestra positiva para TGF- β ; carriles 3 y 4: muestras correspondientes a pacientes positivos para IL-10 e INF γ respectivamente y carril 5: corrimiento positivo de β -actina.

Figura 1. Corrimiento electroforético de los amplificados obtenidos mediante RT-PCR.

el TNF- α actúa sinérgicamente con el IFN- γ para suprimir el crecimiento de la UFB-E, UFC-GEMM y UFC-GM.³¹

Por otra parte, el TNF- α participa como factor de crecimiento de blastos en leucemia mieloide aguda³² y su expresión en tumores de pacientes con LNH,^{33,34} empleando inmunohistoquímica y RT-PCR. También se han encontrado niveles elevados en el suero de pacientes con mieloma múltiple³⁵ y LNH.^{36,37} En cambio, otros investigadores han mencionado que posee un efecto inhibitorio del crecimiento *in vivo* tanto en la MO normal como de pacientes leucémicos,³⁸ en cuyo último caso el TNF- α induce la fragmentación del ADN y la muerte de las células malignas por apoptosis.¹⁴ Una población de células CD34⁺/c-kit⁺ de leucemia mieloide expuesta a TNF- α también muestran una disminución a la respuesta proliferativa inducida por factores solubles de la célula madre (SCF).³⁹

La ausencia de esta citocina en LNH podría contribuir a la proliferación descontrolada de los pro-

genitores pluripotenciales, afectar la diferenciación de las células B (las cuales se multiplican por la influencia temprana de factores como IL-10 e IL-4) y la alteración de los mecanismos inmunológicos que inducen la apoptosis en los precursores linfoides anormales.

En lo que respecta al TGF- β , el ARNm fue encontrado en más de la mitad de los testigos y estuvo ausente en todos los casos con LNH. Informes anteriores han mencionado que es expresado normalmente en la MO de sujetos sanos,⁶ lo que se confirmó en este estudio, donde además se observó una mayor tendencia hacia su expresión en comparación con TNF- α e IFN- γ . El TGF- β es de vital importancia en el control de la hematopoyesis normal. Posee acciones inhibitorias sobre la célula hematopoyética primitiva⁴⁰ y los progenitores como UFC-GEMM, Unidad Formadora de Brotes de megacariocitos (UFB-Meg), UFC-Meg, UFC-G y UFB-E. En la población linfoide, bloquea los efectos proliferativos de IL-2 sobre la UFC-LT y, probablemente, la UFC-LB.^{1,16} Además, puede inducir la apoptosis en varios sistemas celulares, incluyendo linfocitos B humanos.

Aunque anteriormente no se habían notificado evidencias semejantes a las encontradas en este trabajo, existen diversos estudios que sustentan la participación de TGF- β en diversas patologías tumorales. En leucemia linfóide aguda,⁴¹ y leucemia mieloide aguda⁴² inhibe el crecimiento de precursores de células B malignas induciendo la apoptosis y produce un bloqueo del crecimiento favorecido por G-CSF;^{26,42} en cambio no tiene un efecto similar en las células B CD5⁺ de leucemia linfóide crónica que además de producir TGF- β ,⁴³ disminuyen la expresión de sus receptores⁴⁴ y presentan una respuesta anormal a la inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis *in vitro* por esta citocina.⁴⁵ Otras evidencias incluyen la presencia de niveles séricos elevados en mieloma múltiple²⁸ y la detección, mediante RT-PCR, del ARNm en células pre-B y células B maduras neoplásicas en linfomas humanos y plasmocitomas murinos.⁴⁶

En LNH, la ausencia de TGF- β en la MO podría estar involucrada con: a) la inhibición de la apoptosis de precursores “anormales” que pudieran estar presentes, y contribuir, al menos en parte, a la proliferación descontrolada de las células madre hematopoyéticas y su progenie, y b) si el TGF- β suprime la síntesis de la mayoría de las citocinas liberadas por linfocitos y macrófagos, una producción descontrolada de los reguladores positivos en la MO conduciría a la proliferación excesiva de progenitores y precursores hematopoyéticos. También es probable que las células neoplásicas de LNH puedan sintetizar TGF- β ⁴⁶ e inhibir la generación de las células T citotóxicas (Tc) y la inducción de las actividades de las células NK y LAK (células asesinas activadas por linfocinas) por parte de la IL2,^{3,10,14,29} contribuyendo al desarrollo del tumor. Además, su llegada por vía sanguínea hasta la MO podría bloquear la síntesis del ARNm de citocinas inhibitorias como IFN- γ y TNF- α , en tanto que la ausencia del TGF- β constitutivo o endógeno parece indicar la presencia de otros factores en el microambiente que bloquean su síntesis.

El IFN- γ es otro de los inhibidores específicos^{16,31,47} particularmente en las fases iniciales de la diferenciación de los progenitores primitivos.³⁰

Aunque la expresión de IFN- γ comparada con el grupo testigo fue relativamente semejante y no señala su involucramiento en alteraciones a nivel de MO en LNH, se ha resaltado su participación en estados patológicos como la leucemia linfoide crónica, donde inhibe la muerte por apoptosis de los linfocitos B malignos CD5⁺ *in vitro*.⁴⁸ En contraparte, el IFN- γ detiene el crecimiento de células Daudi derivadas de linfoma de Burkitt⁴⁹ y su acción conjunta con TNF- α y TGF- β inhibe la proliferación *in vitro* de líneas celulares derivadas de mieloma humano e hibridomas/plasmocitomas murinos.⁵⁰ Además, se ha demostrado que el IFN- γ favorece la fagocitosis de células B malignas en LNH por macrófagos activados.⁵¹ Estos hallazgos orientan la interpretación de los resultados obtenidos hacia dos vertientes:

a) La presencia de IFN- γ en MO de pacientes con LNH puede facilitar la actividad fagocítica de los macrófagos sobre las células o sus precursores con elevado potencial neoplásico, en cuyo caso esta citocina sería un factor indicativo de la respuesta del sistema inmune que intenta detener la proliferación de células malignas o de los precursores que pueden posteriormente convertirse en células tumorales.

b) El IFN- γ en LNH, de manera semejante a lo que ocurre en leucemia linfoide crónica,⁴⁸ puede inhibir la apoptosis de linfocitos malignos.

Tales especulaciones deberán ser demostradas en investigaciones posteriores. Además, la presencia de IFN- γ fue detectada débilmente en nuestros pacientes, incluso después de 60 ciclos de amplificación, lo que hace necesario particularizar en su estudio o emplear otras variantes de PCR.

Por otra parte, cabe la posibilidad de que las células T (específicamente las de tipo Th I) y macrófagos que se encuentran en la MO hayan sido previamente activados y sean la fuente del IFN- γ encontrado en algunos de los pacientes (*cuadro II*).

No se encontró una diferencia significativa en la expresión de IL-10 entre los grupos estudiados. Al ser un importante factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos B humanos, es razonable su hallazgo en la MO de individuos sanos, como ha sido notificado por otros autores empleando RT-PCR.⁶ El interés de su estudio en LNH se debió a que posee efectos inhibitorios en el sistema inmunológico y en la hematopoyesis, además de las varias evidencias notificadas acerca de su presencia en el suero de pacientes con LNH⁵² asociada al virus Epstein-Barr.^{46,52} El empleo de RT-PCR ha revelado un incremento en la producción de IL-10 en tumores linfocíticos de origen B,⁴⁶ lo que sugiere un mecanismo de evasión por el cual las células neoplásicas suprimen la respuesta inmune celular al inhibir la producción de IL-2, TNF- α e IFN- γ por los linfocitos Th I y la activación de linfocitos T citotóxicos (LTc), células NK y células LAK implicadas en la respuesta antitumoral, con-

tribuyendo a la progresión del linfoma.^{10,14,29} Esto ocurre también en pacientes con leucemia de células T adultas infectadas con el virus de la leucemia humana de células T (HTLV-I),⁵³ en algunas líneas celulares de linfoma de Burkitt transformadas y no transformadas por el virus de Epstein-Barr^{54,55} y en células B infectadas con el mismo virus provenientes de enfermos con SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida).⁵⁶

Si bien está claro que la IL-10 participa en el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos por los hallazgos encontrados en suero y células tumorales, los datos que aquí se notifican sugieren que no parece ocurrir lo mismo en MO. Sin embargo, se piensa que puede actuar como un factor de crecimiento de células pro-B en MO normal y, en neoplasias malignas, como un inhibidor de la síntesis de IFN- γ y TNF- α por linfocitos Th1 y macrófagos activados. Asimismo, la IL-10 puede inhibir la síntesis y liberación de IL-2, implicada en el crecimiento y desarrollo normal de células del linaje mieloide y linfoide,⁵⁷ específicamente la UFC-GM, UFC-LB y UFC-LT y en la liberación de IFN- γ y TGF- β por células NK. También es factible que las células neoplásicas produzcan IL-10 y ésta llegue a la MO a través de la circulación e inhiba la producción de citocinas.

Al analizar la expresión individual de TNF- α , IFN- γ e IL-10 en el grupo testigo, se observó que las tres ocurrían casi con la misma frecuencia, siendo ligeramente más prominente la de IL-10 en comparación con IFN- γ . En cambio, en LNH, se encontró una total polarización hacia la falta de TNF- α y una mayor presencia de IL-10 con respecto a IFN- γ , lo que podría indicar que en los pacientes la IL-10, ya sea endógena o exógena, inhibe más profundamente la expresión de TNF- α que la de IFN- γ . Sin embargo, aunque el IFN- γ parece ser capaz de bloquear la síntesis de la IL-10 endógena en algunos casos (pacientes 2, 17 y 18), la falta de TNF- α en los mismos sugiere la presencia de otros factores, entre ellos posiblemente la IL-10 producida por células tumorales, que están suprimiendo la producción de TNF- α .

Agradecimientos:

Al Dr. Alberto Zamora Palma por su apreciable ayuda.

Trabajo apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México (DIII-903735 y F643-M9406).

Referencias

1. Ruiz AGJ. *Fundamentos de hematología*. México. Editorial Médica Panamericana; 1993: 15-23.
2. Richard G, Bithell C, Wintröbe's T. *Clinical Hematology*. 9ª edición. USA. Lea and Febiger; 1993: 1: 48-62.
3. Bautler E, Lichtman A, Caller S, Kipps J, Williams J. *Hematology*. Chapter 22. 5ª edición. USA. McGraw-Hill; 1995: 211-228.
4. Testa GN, Lord BI, Dexter MT. *Hematopoietic lineages in health and disease*. Chapter 1 and 2. USA. Marcel Dekker; 1997: 1-45.
5. Tavassoli M, Fredenstein A. Hematopoietic stromal microenvironment. *Am J Hematol* 1983; 15: 195.
6. Cluitmans M, Esendam J, Landegent E, Willemze R, Falkenburg F. Constitutive *in vivo* cytokine and hematopoietic growth factor gene expression in the marrow and peripheral blood of healthy individuals. *Blood* 1995; 85: 2038.
7. Paul S, Bennett F, Calvetti J, Kelleher K, Wood C, O'Hara R, Leary A, Sibley B, Clark S, William D, Yang Y. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin-11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7512.
8. Mrózek E, Anderson P, Caligiuri A. Role of interleukin 15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87: 2632.
9. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin J-J, Garrone P, García E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Mahapatra D, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593.
10. Abbas KA, Lichtman HA, Pober SJ. *Cellular and molecular immunology*. 2ª edición. USA. Saunders Company; 1994: 268-292.
11. James H. *Blood cell formation*. Chapter 1. 3ª edición. USA. Bacrweell Scientific Publications; 1993: 7-22.
12. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844.
13. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 1993; 82: 3523.
14. García T. *Fundamentos de inmunobiología*. México. UNAM; 1997: 349-393.
15. Moore S. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991; 78: 1.
16. Horst I. Dictionary of cytokines. Editorial VCH Verlagsgesellschaft mbH. Germany 1995: 313-321.
17. Leary A, Zeng H, Clark S, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cycle of primitive human hematopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4013.
18. Dührsen U, Knieling G, Beecken W, Neumann S, Hossfeld K. Chimaeric cultures of human marrow stroma and murine leukemia cells: evidence for abnormalities in the haemopoietic microenvironment in myeloid malignancies and other infiltrating marrow disorders. *Brit J Haematol* 1995; 90: 502.

19. Jiménez-Zepeda V, Jiménez-Zepeda R. Linfoma no Hodgkin: clasificación biológica, diagnóstico y tratamiento. *Gaceta Médica de México* 1998; 134: 443.
20. World Medical Association: Declaration of Helsinki. Recommendation guide doctors in clinical research. *World Med J* 1964; 11: 281.
21. Maniatis T, Fritsh E, Sambrook T. (Eds). Molecular cloning. An laboratory manual. Chapter 7 "Extraction, purification and analysis of Messenger RNA from eukaryotic cells, 2ª edición. NY. Cold Spring, Harborg Laboratory; 1898: 7.1-7.25.
22. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidin thiocyanate phenol-choloform extitiation. *Ann Biochem* 1987; 162: 156.
23. Simms D, Cizdziel E, Chomczynski P. TRIzol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus* 1993; 15: 99.
24. Sewall A, McRae S. RNA isolation with Trizol reagent. *Focus* 1998; 20: 36.
25. Siegel S. *Estadística no paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta*. Capítulo 6 "El caso de dos muestras independientes". México. Trillas; 1991: 120-30.
26. Rowe J, Liosveld J. Hematopoietic growth factors in acute leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 328.
27. Ailles E, Gerhard B, Hogge E. Detection and characterization of primitive malignant and normal progenitors in patients with acute myelogenous leukemia using long-term coculture with supportive feeder layers and cytokines. *Blood* 1997; 90: 2555.
28. Kröning H, Täger M, Thiel U, Ittenson A, Reinhold D, Bühling F, Ketter E, Ansorge S. Over production of IL-7, IL-10 and TGF- β in multiple myeloma. *Acta Haematol* 1997; 98: 116.
29. Stites P, Abba J. *Basic and clinical immunology*. 7ª edition. Appleton and Lange. Norwalk. 1991.
30. Jacobsen W, Rothe M, Rostein L, Goeddel V, Simeland B, Veyby P, Siørland L, Jacobsen W. Role of the 75 Kda tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10695.
31. Broxmeyer H. Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis. *Am J Ped Hematol / Oncol* 1992; 14: 22.
32. Löwenberg B, Touww P. Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* 1993; 81: 281.
33. Voorzanger N, Toutitout R, García E, Delecluse H, Rousset F, Joab I, Favrot C, Blay Y. Interleukin (IL)-10 and IL-6 produced *in vivo* by Non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors. *Cancer Res* 1996; 56: 5499.
34. Sappino A, Seelentag W, Pelte M, Alberto P, Vassalli P. Tumor necrosis factor / cachectin and lymphotoxin gene expression in lymph nodes from lymphoma patients. *Blood* 1990; 75: 958.
35. Filella X, Blade J, Guillermo A, Molina R, Rozman C, Ballesta A. Cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 α) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markes in multiple myeloma. *Cancer Detec Preven* 1996; 20: 52.
36. Marcia J, Gómez X, Esquerda A, Pérez B, Callao V, Marzo C. Value of the determination of TNF- α in the plasma of patients with non-Hodgkins lymphoma. *Leuke Lymph* 1996; 20: 481.
37. Zinzani P, Baccini C, Zaccaria A, Visani G, Buzzi M, Morelli A, Molinari A, Salvucci M, Bendandi M, Rubbodi D, Gherlinzoni F, Zanchini R, Tura S. Clinical implications of serum levels of soluble CD23 and tumor necrosis factor alpha in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Europ J Haemat* 1996; 57: 335.
38. Broxmeyer H, Williams E, Lu S, Cooper S, Anderson L, Beyer S, Hoffman R, Rubin Y. The suppressive influence of human tumor necrosis factor on the bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon- γ . *J Immunol* 1986; 136: 4487.
39. Khoury E, Andre C, Pontvert-Delucq S, Drenou B, Baillou C, Guigon M, Najman A, Lemoine FM. Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) downregulates c-kit proto-oncogen product expression in normal and acute myeloid leukemia CD34 $^{+}$ cells via p55 TNF alpha receptors. *Blood* 1994; 84: 2506.
40. Sporn M, Roberts A. Transforming growth factor- β : multiple actions and potential clinical applications. *JAMA* 1989; 262: 938.
41. Buske C, Becker D, Feuring-Buske M, Hanning H, Wulf G, Schafer C, Hiddemann W, Wormann B. TGF-beta inhibits growth and induces apoptosis in leukemic B cells precursors. *Leukemia* 1997; 11: 386.
42. Taetle R, Payne C, Dos Santos B, Rusesell M, Segarini P. Effects of transforming growth factor beta 1 on growth and apoptosis of acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 1993; 53: 3386.
43. Kremer J, Reisbach G, Nerl C, Dormer P. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells express and release transforming growth factor-beta. *Br J Haematol* 1992; 80: 480.
44. Lagneaux L, Delforge A, Bernier M, Stryckmans P, Bron D. TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 1998; 31: 99.
45. Nowell P, Moore J. Aberrant responses of human lymphocytic neoplasms to cytokine regulation. *Immunol Res* 1998; 17: 171.
46. Bost L, Bielig C, Jaffe M. Lymphokine mRNA expression by transplantable murine B lymphocytic malignancies. *J Immunol* 1995; 154: 715.
47. Snoeck H, Van Bockstaele R, Nys G, Lenjou M, Lardon F, Haenen L, Rodrigus I, Peetermans E, Berneman N. Interferon γ selectively inhibits very primitive CD34 $^{+}$ CD38 $^{-}$ and not more mature CD34 $^{+}$ CD38 $^{+}$ human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1994; 180: 1177.
48. Buschle M, Campana D, Carding R, Richard C, Hoffbrand V, Brenner K. Interferon γ inhibits apoptotic cell death in B cell choronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1993; 177: 213.
49. Yamada H, Ochi K, Nakada S, Takahara S, Nemoto T, Sekikawa T, Horiguchi-Yamada J. Interferon modulates the messenger RNA of G1-controlling genes to suppress the G1-to-S transition in Daudi cells. *Mol Cell Biochem* 1995; 152: 149.
50. Schwabe M, Cox W, Bosco C, Prohaska R, Kung H. Multiple cytokines inhibit interleukin-6-dependent murine hybridoma / plasmocytoma proliferation. *Cell Immunol* 1996; 168: 117.
51. Ely P, Wallace K, Givan L, Graziano F, Guyre M, Fanger W. Bispecific-armed, interferon γ -primed macrophage-mediated phagocytosis of malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996; 87: 3813.
52. Blay J, Burdin N, Rousset F, Lanoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Faurot C. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996; 88: 1035.
53. Mori N, Gill S, Moudgil T, Murakami S, Eto S, Prager P. Interleukin-10 gene expression in adult T cell leukemia. *Blood* 1996; 88: 1035.
54. Burdin N, Peronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med* 1993; 177: 295.
55. Finke J, Ternes P, Lange W, Mertelsman R, Dölker G. Expression of interleukin-10 in lymphocytes of different origin. *Leukemia* 1993; 7: 1852.
56. Benjamin D, Knobloch J, Dayton A. Human B-cell interleukin 10: B-cell lines derived from patients with acquired immune deficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood* 1992; 80: 1289.
57. Reya T, Contractor V, Couzens S, Wasik A, Emerson G, Carding R. Abnormal myelocytic cell development in interleukin-2 (IL-2) deficient mice: evidence for the involvement of IL-2 in myelopoiesis. *Blood* 1998; 91: 2935.