

31. Salud Humana

**EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO E  
INFLAMACIÓN EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS**

Casas Silva, María Jimena; Agüero Aguilera, Ana Carolina; Terán, Magdalena María; Haro, Ana Cecilia (Orientador); Lazarte, Sandra Stella (Orientador)

jimenacasassilva@gmail.com; aguilerana.carolina.aa@hotmail.com;

magdalenateran@hotmail.com; anaharo@fbqf.unt.edu.ar; slazarte@fbqf.unt.edu.ar

Instituto de Bioquímica Aplicada. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán

**Resumen**

**Objetivos:** Analizar la expresión de los genes de enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y peroxiredoxina-2 (PRX-2); y de los genes de IL-6 y TNF- $\alpha$ , y relacionarla con el nivel de expresión del gen Nrf2; establecer la prevalencia de las neoplasias hematológicas (NH) en Tucumán, describir las características demográficas y reconocer factores de riesgo de la población bajo estudio,

**Metodología:** Se realizó un estudio descriptivo, entre junio 2017 y mayo 2018. Los sujetos respondieron una encuesta sobre datos personales y factores de riesgo. Se realizó hemograma, técnicas citoquímicas e inmunofenotipo mediante citometría de flujo. Se evaluó la expresión génica de CAT, SOD, PRX-2, IL-6, TNF- $\alpha$  y Nrf2 por RetroTranscripción-PCR tiempo real.

**Resultados:** Se estudiaron 33 pacientes con NH y 22 controles sanos en el Instituto de Bioquímica Aplicada de UNT. La prevalencia obtenida fue: leucemias agudas 70%, neoplasias linfoproliferativas (NLP) 12%, síndromes mielodisplásicos (SMD) 9% y neoplasias mieloproliferativas (NMP) 9%. Se detectó asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre padecer NH con menor nivel educativo, no poseer obra social, tener hábitos tóxicos y no realizar actividad física. El análisis comparativo de los grupos NH mostró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la expresión de los genes de las enzimas y TNF- $\alpha$  en los grupos SMD, NLP y NMP. El nivel de expresión del gen de Nrf2 demostró influencia significativa sobre los niveles de expresión del gen de la PRX-2 ( $R^2 = 0,73$ ).

**Conclusiones:** Estos hallazgos sentarían las bases de un potencial vínculo entre la disminución de los antioxidantes y el aumento de los niveles de EOX en las NH, además de señalar a Nrf2 como posible gen regulador del sistema antioxidante.

**Palabras clave:** Neoplasias hematológicas; estrés oxidativo; inflamación; expresión génica

## Introducción

Las neoplasias hematológicas comprenden un grupo heterogéneo de trastornos neoplásicos clonales que surgen de los tejidos hematopoyéticos y linfoides. Representan un amplio espectro de enfermedades, desde leucemias crónicas lentamente progresivas hasta leucemias agudas y linfomas de alto grado, y se encuentran entre los cánceres humanos más rápidamente progresivos. Al igual que con otros cánceres, el diagnóstico y la clasificación de las neoplasias hematológicas se han basado tradicionalmente en la morfología celular. Por el contrario, la clasificación basada en la patogenia molecular probablemente sea más informativa, proporcione una mejor estratificación pronóstica y oriente el tratamiento dirigido. Los avances en las tecnologías genómicas ahora lo hacen posible (Jakobsen y Vyas, 2018). Durante décadas, la idea general de las terapias contra el cáncer fue erradicar un porcentaje tan alto como fuera posible de las células tumorales aplicando la dosis máxima tolerada de un agente tóxico. Una de las observaciones inmediatas fue, sin embargo, que incluso una gran reducción del contenido de células cancerosas en el organismo del paciente puede ser transitoria y puede producirse una recurrencia posterior (Zagozdzon y Golab, 2015). Por lo tanto es importante el

desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir las neoplasias hematológicas, las cuales deberían basarse en el conocimiento de los distintos factores que participan en el complejo proceso de la leucemogénesis.

En muchos tipos de cáncer se ha encontrado evidencia de estrés oxidativo (EOx) crónico, incluyendo varias neoplasias hematopoyéticas como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), síndrome mielodisplásico (SMD), y leucemias mieloides, incluyendo la leucemia mieloide crónica (LMC) y la leucemia mieloide aguda (LMA). Existen pruebas de que las especies reactivas de oxígeno (EROS) derivadas de tumor podrían promover la supervivencia celular, la migración y metástasis, la proliferación, e incluso la resistencia a las drogas, dependiendo del origen del cáncer. Por otro lado, la producción en exceso de EROS está vinculada a la inflamación no resuelta, debido a que al reaccionar covalentemente con moléculas de muy diversa índole dañan los tejidos y pueden llevar a la necrosis celular y tisular. Por ello la resolución de la inflamación y la supervivencia dependen en gran medida de los mecanismos de remoción de las EROS (Pavón Romero y col, 2016). Varios estudios han demostrado que el factor de transcripción Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) contribuye al

proceso antiinflamatorio orquestando el reclutamiento de células inflamatorias y regulando la expresión génica a través de elementos de respuesta antioxidante (Ahmed *et al*, 2016).

Las EROS desempeñan acciones tanto positivas como negativas en la proliferación y supervivencia de una célula. Esta doble naturaleza ha sido explotada por las células leucémicas para promover su crecimiento, supervivencia e inestabilidad genómica. Actualmente, está bien reconocido que las EROS y los radicales libres producidos por el metabolismo del oxígeno son iniciadores y promotores importantes de la carcinogénesis y contribuyen a la progresión del tumor. Las EROS son generadas principalmente por la mitocondria, el retículo endoplásmico y la NADPH oxidasa unida a la membrana (Hole *et al*, 2011). Las células normales regulan el contenido intracelular de EROS, balanceando la generación de EROS y los sistemas depuradores. Juntos, la producción de EROS y la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes constituyen el control redox primario de las células leucémicas (Irwin *et al*, 2013). Entre las principales enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxiredoxina. La superóxido dismutasa fue una de las primeras enzimas antioxidantes caracterizadas y es capaz de dismutar dos aniones superóxido en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular

( $O_2$ ). La catalasa, una enzima hemo que cataliza la reacción que convierte dos moléculas de  $H_2O_2$  en  $O_2$  y dos moléculas de agua ( $H_2O$ ), es responsable de la desintoxicación de diversos fenoles, alcoholes y peróxido de hidrógeno. Las peroxiredoxinas son una familia de seis isoenzimas capaces de reducir hidroperóxidos de alquilo y  $H_2O_2$  a su correspondiente alcohol o  $H_2O$  (Marengo *et al*, 2016).

Estudios recientes han revelado que Nrf2 regula la expresión de enzimas desintoxicantes y los genes antioxidantes que protegen las células de varias lesiones, a través de sus efectos antiinflamatorios, influyendo así en el curso de la enfermedad (Chen *et al*, 2006). Nrf2 es referido como el "regulador maestro" de la respuesta antioxidante, modulando la expresión de cientos de genes que aparentemente controlan procesos no relacionados tales como la respuesta inmune e inflamatoria, la remodelación y la fibrosis de tejido, la carcinogénesis y la metástasis, e incluso la disfunción cognitiva y la conducta adictiva (McCord y Fridovich, 2014).

Recientemente, los avances en las tecnologías moleculares han dado lugar a importantes mejoras en la comprensión de la patogénesis molecular de las neoplasias hematológicas, pero la asociación entre el EOX, la inflamación y la malignidad todavía no está clara. En la actualidad, existen terapias productoras de EROS que emplean el EOX para

inclinan el balance entre el crecimiento y la supervivencia hacia la muerte celular.

Por otro lado, la mayoría de estas neoplasias están relacionadas también con hábitos personales y factores medioambientales como consumo de tabaco, alcohol y dietas carentes de nutrientes, exposición a la luz solar y diversos agentes nocivos que los hace susceptibles a la prevención primaria (Sarabia-Cadena y col, 2013).

### **Objetivos**

El propósito de este estudio fue analizar la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y peroxiredoxina- 2 (PRX-2), y de los genes de proteínas inflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y relacionarla con los niveles de expresión del gen Nrf2. Además se estableció la prevalencia de las neoplasias hematológicas, así como las características demográficas y los factores de riesgo en la población bajo estudio en la provincia de Tucumán.

### **Materiales y Métodos**

#### Diseño, Población y Muestra

Se realizó un estudio descriptivo de prevalencia y asociación cruzada entre junio de 2017 y mayo 2018 en el Instituto de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT).

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de neoplasia hematológica de 2 hospitales pertenecientes al Sistema Provincial de Salud de la provincia de Tucumán,

Hospital Néstor Kirchner y Hospital Centro de Salud “Zenón Santillán”; los cuales fueron detectados en los Servicios de Hemato-Oncología de cada uno de ellos. Los individuos sanos fueron reclutados en el Instituto de Bioquímica Aplicada mediante invitación oral, siendo estudiantes y empleados de la UNT la gran mayoría.

Criterios de inclusión: mujeres y hombres con edad  $\geq 16$  años con diagnóstico de neoplasia hematológica, y que no estaban recibiendo tratamiento anti-neoplásico. Los sujetos saludables debían ser  $\geq 18$  años y poseer un hemograma normal.

Criterios de exclusión: presencia de diabetes, enfermedad coronaria, artritis reumatoidea, dislipemia, hipertensión, malignidades, hepatopatía crónica, o disfunción renal.

La muestra fue intencional de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. La unidad de análisis fue una encuesta y la muestra de sangre de cada paciente y sujeto sano que cumplió con los criterios de inclusión. Por otro lado, para los estudios de citometría de flujo y citogenético se empleó muestra de médula ósea del paciente, obtenida y derivada por el médico hematólogo tratante. La encuesta fue administrada por el investigador principal y sus colaboradores. En ella se registraron los siguientes datos: edad, sexo, estado civil, nivel educativo, ocupación, obra social y lugar de residencia, antecedentes personales de neoplasias, hábitos tóxicos,

tipo de alimentación, actividad física y exposición a tóxicos.

#### Estudios hematológicos

Se realizó hemograma automatizado en contadores hematológicos (Sysmex KX-21N y Abbott Cell-Dyn Ruby). Los blastos fueron cuantificados mediante recuento manual en frotis teñidos con coloración May-Grünwald Giemsa. Las técnicas citoquímicas de mieloperoxidasa (MPO) y ácido periódico de Schiff (PAS) siguieron el protocolo de Swirsky y Bain (2008).

#### Estudio del Inmunofenotipo

Se realizó en citómetro de flujo de ocho colores BD FACSCANTO™ II (BD Biosciences), el cual posee 3 láseres. Los principales marcadores de linaje de las distintas series usados fueron:

- Linaje B: CD22, CD 79a (c), Ig sup, C $\mu$  y CD19.
- Linaje T: CD3 m/c, TCR, CD2, CD7 y CD5.
- Linaje dendrítico: CD123, CD11c, HLA-DR.
- Linaje mielóide: MPO, CD13, CD33, CD65, CD117, CD15.
- Linaje monocitoide: CD14, CD64, CD33, HLA-DR, CD35, IREM
- Linaje megacarioblástico: CD41a, CD42b y CD61.
- Linaje eritroide: CD71, CD36, CD105

#### Estudios moleculares

La expresión de los genes de CAT, SOD, PRX-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , y Nrf2 se analizó por RetroTranscripción-PCR tiempo real (RT-qPCR). Para la comparación relativa de

los niveles de expresión del ARNm de estos genes, los datos obtenidos a partir de la PCR tiempo real, se normalizaron con respecto a la expresión del gen de la gliceraldeído 6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (cuantificación relativa). El punto final cuantitativo para la PCR en tiempo real es el ciclo umbral (Ct, del inglés *threshold cycle*). El Ct se define como el ciclo de PCR en el que la señal fluorescente del colorante informador cruza un umbral arbitrariamente colocado. Se obtuvo ARN de glóbulos blancos de sangre entera anticoagulada con EDTA-K<sub>2</sub>, empleándose Trizol para la extracción (protocolo de INVITROGEN). La PCR, las curvas de “melting” (disociación) y su análisis posterior se realizaron en el equipo COBAS z480 (Roche). Los amplicones fueron sometidos a un análisis de temperatura de “melting” para establecer la especificidad de los fragmentos amplificados y la identidad de los mismos. Los cebadores y condiciones de la PCR se tomaron de Franco *et al* (2014) para CAT y PRDX-2, Rybicka *et al* (2011) para SOD-2, Macari y Lowrey (2011) para Nrf2, y Han *et al* (2015) para IL-6 y TNF-alfa. La expresión génica se calculó con la siguiente fórmula:

Nivel de expresión del gen bajo estudio =  $2^{-\Delta Ct}$ , es decir:  $[2^{-(Ct \text{ gen bajo estudio} - Ct \text{ GAPDH})}]$

#### Variables

Las variables bajo estudio fueron:

-Neoplasia hematológica (NH): se consideró que el paciente padecía de NH cuando las pruebas hematológicas y el

inmunofenotipo así lo demostraron. El diagnóstico y clasificación de las NH se realizó en base a los criterios de la clasificación de neoplasias linfoides y de neoplasias mieloides y leucemias agudas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016 (Swerdlow *et al*, 2016; Arber *et al*, 2016).

Las mismas se categorizaron de la siguiente manera para el estudio estadístico comparativo:

-Grupo leucemias agudas, LA (incluyó LMA y LLA)

-Grupo SMD

-Grupo neoplasias linfoproliferativas, NLP

-Grupo neoplasias mieloproliferativas, NMP [incluyó leucemia mieloide crónica (LMC) y SMD/NMP]

-Características demográficas

1) Edad: <20 años, 20-30 años, 31-40 años, 41-50 años, 51-60 años, 61-70 años, >70 años

2) Sexo: -Femenino; -Masculino

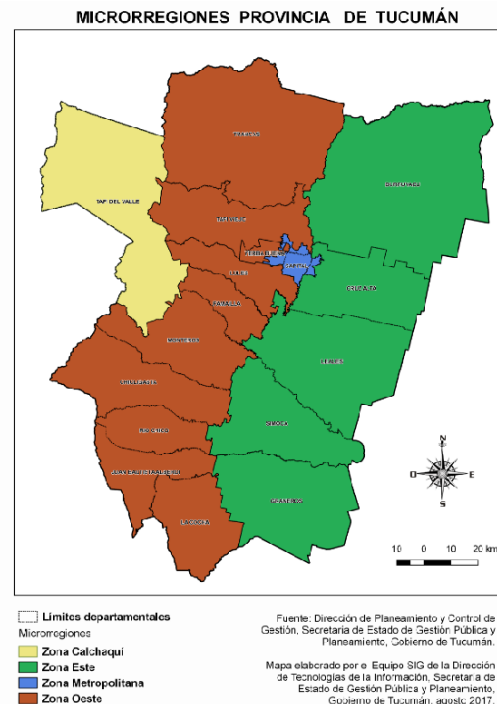
2) Estado civil: - Soltero; - Casado; - Unión de hecho; - Otro

3) Nivel educativo: -Sin estudios; - Estudios Primarios Completos (Si o no); - Estudios Secundarios Completos (Si o no); -Estudios Terciarios y/o Universitarios (Si o no)

4) Obra social: -Si tiene; -No tiene

5) Situación laboral: - Trabaja (Si/No)

6) Lugar de residencia: - Provincia; - Zona: Metropolitana, Este, Oeste y Calchaquí



-Factores de riesgo

1) Hábitos tóxicos: - Consumo de tabaco; - Consumo de alcohol; - Consumo de drogas

2) Exposición a tóxicos: - Pesticidas, Fungicidas y Herbicidas; - Pinturas o solventes; - Radiaciones

3) Actividad Física, Si/No

4) Tipo de Alimentación: - Vegetariana; - Omnívora

5) Antecedentes personales de neoplasias: Si/No. Si la respuesta fue afirmativa: ¿Cuál?..... ¿Recibió o no tratamiento? Si/No

6) Otras enfermedades que padece, Si/No; si la respuesta fue afirmativa se indicó de cual se trataba.

#### Consideraciones éticas

Se obtuvo un consentimiento informado y asentimiento (en el caso de los menores de edad) de todos los pacientes para el uso de los resultados obtenidos, y se

garantizó el anonimato y confidencialidad de los mismos. Ambos documentos, el consentimiento y el asentimiento, fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán.

#### Análisis de los resultados

El estudio estadístico se realizó mediante el Programa Estadístico SPSS 23.0 (Chicago, USA). Para el análisis estadístico inferencial la variable de resultado (dependiente) fue padecer NH, mientras que las variables de exposición (independientes) fueron las características demográficas y los factores de riesgo. Se usó el modelo de Chi-cuadrado para determinar asociaciones entre las variables categóricas, y se calculó el coeficiente de contingencia Q cuando el número de observaciones fue  $\leq 5$ . Para el coeficiente de contingencia se consideró que no existe asociación si  $0 < Q < 0,1$ ; asociación débil,  $0,1 \geq Q < 0,3$ ; asociación moderada,  $0,3 \geq Q < 0,6$ ; y asociación fuerte,  $Q \geq 0,6$ .

Los parámetros hematológicos y los niveles de expresión génica se indicaron como mediana y rango, y se compararon mediante la prueba U de Mann Whitney. Las pruebas se realizaron con un nivel de significación de  $p < 0,05$ . La influencia de los niveles de expresión del gen de Nrf2 sobre los genes de las enzimas antioxidantes y de las proteínas inflamatorias, independiente del grupo (NH o control), fue evaluada por análisis de regresión simple.

## **Resultados y Discusión**

Durante el período analizado se estudiaron 33 pacientes (30 hombres y 3 mujeres) con diagnóstico de neoplasia hematológica (NH) y 22 sujetos aparentemente sanos (9 hombres y 13 mujeres). La NH más prevalente fue la leucemia aguda (Tabla 1). Las LLA fueron todas a células B (LLA-B). La reacción de MPO fue positiva en el 92% (11/12) de las LMA, mientras que el PAS fue positivo en el 70% (7/10) de las LLA.

El análisis citogenético detectó el gen de fusión BCR/ABL en 4 LLA-B, la delección (5) en LA bifenotípica, la translocación (15;17) en 2 LMA promielocíticas, la translocación (11;14) en un linfoma, la inversión del cromosoma 9 en una LLA y la delección (11) en una LMA.

En el grupo NH se observó un neto predominio masculino con una tasa masculino/femenino (TM/F) de 10/1. Sólo el 15% (5/33) de los pacientes poseía obra social, el 52% (17/33) no tenía estudios o solo tenía instrucción primaria, el 70% (23/33) eran mayores de 30 años y el 58% (19/33) no trabajaba (Tabla 2). Con respecto al lugar de residencia, el 48% (16/33) pertenecía a la zona Metropolitana, 21% (7/33) a la zona Oeste, 18% (6/33) a la zona Este y 12% (4/33) provenía de la provincia de Santiago del Estero. Todos los controles sanos residían en la zona Metropolitana.

**TABLA 1: Prevalencia y distribución de las neoplasias hematológicas (Tucumán, 2018)**

GRUPO	PREVALENCIA [%; IC95%]	DIAGNÓSTICO	EDAD* [años]	SEXO FEMENINO	SEXO MASCULINO
LA n= 23	70 52,5-82,6	LMA	36 (18-67)	1	11
		LLA	32 (21-55)	1	9
		LA bifenotípica	41	0	1
SMD n= 3	9 2,4-24,3	SMD	19 (18-21)	1	2
NLP n= 4	12 4,2-27,3	Linfoma	72 (59-84)	0	2
		LLC	65	0	1
		GMSI	52	0	1
NMP n= 3	9 2,4-24,3	LMC	63 (61-65)	0	2
		SMD/NMP	23	0	1

\*Mediana y rango. Fuente: Elaboración propia a partir de datos recopilados en el estudio  
Abreviaturas: IC95%, intervalo de confianza 95%; LA, leucemia aguda; LMA, leucemia mieloide aguda; LLA, leucemia linfocítica aguda; SMD, síndrome mielodisplásico; NLP, neoplasia linfoproliferativa; LLC, leucemia linfática crónica; GMSI, gammapatía monoclonal de significado incierto; NMP, neoplasia mieloproliferativa; LMC, leucemia mieloide crónica.

**TABLA 2: Características demográficas de la población bajo estudio (Tucumán, 2018)**

PARÁMETROS ANALIZADOS	NH	SIN NH	P	Q
RANGO DE EDAD			0,205	0,365
< 20 AÑOS	3	0		
20-30 AÑOS	7	7		
31-40 AÑOS	9	7		
41-50 AÑOS	2	2		
51-60 AÑOS	5	6		
61-70 AÑOS	6	0		
> 70 AÑOS	1	0		
ESTUDIOS COMPLETADOS			0,000	0,555
SIN ESTUDIOS	7	0		
PRIMARIOS	10	0		
SECUNDARIO	9	6		
TERCIARIO	7	8		
UNIVERSITARIOS	0	8		
ESTADO CIVIL			0,655	0,060
SOLTERO	20	12		
CASADO	13	10		
OCUPACIÓN			0,061	0,245
TRABAJA	14	15		
NO TRABAJA	19	7		
OBRA SOCIAL			0,000	0,639
SI TIENE	5	22		
NO TIENE	28	0		



Las leucemias agudas son las principales causas de ingreso, morbilidad y mortalidad en unidades de Hemato-Oncología. Datos recientes de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, sus siglas en inglés) indican que LMA es un cáncer común en adultos y la segunda leucemia más frecuente en la infancia. La LLA ocurre con mayor frecuencia en niños, con una alta incidencia en países de Latinoamérica y Asia. En cambio, la incidencia de LLC tiende a ser más alta en hombres adultos mayores, mientras que la incidencia de LMC es más alta en hombres adultos (Miranda-Filho *et al*, 2018). Así, en el trabajo actual LMA fue la patología más frecuente, con neto predominio en el sexo masculino, y presentó un rango etario menor a LLC y LMC.

El nivel socio-económico y el hábito de fumar han sido relacionados con la presencia de hemopatías malignas<sup>27</sup>. Precisamente, cuando se analizaron los factores de riesgo se observó que el 39% tenía hábitos tóxicos (12 fumaban y 1 consumía alcohol), el 94% (31/33) eran omnívoros, 12% reportaron que habían recibido terapia antineoplásica debido a malignidades hematopoyéticas previas (2 LMA, 1 SMD y 1 mieloma múltiple) y el 36% de ellos relató exposición a agentes nocivos (5 a pinturas, 5 a solventes, 1 a radiaciones y 1 a humo) (Tabla 3). Un paciente recibía tratamiento con metformina y tiroxina.

Se detectó asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre padecer NH y no tener estudios o sólo educación primaria, no poseer obra social,

tener hábitos tóxicos y no realizar actividad física. Con el coeficiente Q se descubrió una débil asociación ( $0,1 \geq Q < 0,3$ ) de NH con haber padecido una neoplasia previa y una asociación moderada ( $0,3 \geq Q < 0,6$ ) con un mayor rango etario (Tabla 3).

La incidencia de LA en los adultos aumenta con la edad: 1/100.000 habitantes/año en la 4ª década de vida y de 10/100.000 habitantes/año en los mayores de 70 años (Bain, 2010). Un estudio realizado en el Hospital Centro de Salud "Zenón Santillán" analizó las historias clínicas de pacientes con LA entre 2008-2015 de 2 centros de Tucumán. Se diagnosticaron 165 LA, con una incidencia de 2,4 casos nuevos/100.000 habitantes/año. La mediana de edad fue 44 años, el 51,5% era de sexo masculino, el 37% de las LLA fueron cromosoma Philadelphia positivas (Phi), y 26% tenía antecedentes de enfermedades previas o de exposición a tóxicos (Bendek y col, 2015). El informe del Grupo Hematológico del Sur de Argentina reportó 675 casos de leucemia (392 agudas y 283 crónicas), 133 desórdenes mieloproliferativos crónicos y 100 SMD en un período de 5 años (1998-2002), con una TM/F de 1,34 (Raña, 2003). Asimismo, un estudio de la incidencia de cáncer en la zona oeste del Amazonas en Brasil, detectó que la leucemia fue la neoplasia maligna más frecuente entre los hombres en los grupos de edad de 0 a 14 años y de 15 a 39 años (Nakashima *et al*, 2012). En Pakistán, la LMC y la LMA fueron los cánceres más comunes en hombres y

mujeres, seguidos por LLA, con una TM/F de 7/1 (Sultan *et al*, 2018). El presente estudio exhibe similitudes con estos trabajos previos, ya que la NH más frecuente fue también la LA, pero los factores de riesgo se presentaron con porcentajes más bajos y la TM/F fue más alta.

Los datos hematológicos y nivel de expresión del gen de Nrf2 de los individuos con NH y de los controles saludables pueden observarse en la Tabla 4.

Los grupos LA, SMD y NMP presentaron valores similares de hemoglobina y recuento de plaquetas. Sin embargo, solo se observó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de hemoglobina y recuento de plaquetas del grupo LA con los del grupo control y con el grupo NLP. Los leucocitos del grupo NMP demostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control. No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la expresión de Nrf2 entre los grupos.

Los sujetos con NH presentaron una disminución significativa de la expresión génica de PRX-2 ( $p = 0,014$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,018$ ) y SOD ( $p = 0,003$ ). Las células leucémicas frecuentemente alteran la expresión y la actividad de una variedad de vías antioxidantes, entre ellas las enzimas depuradoras SOD, CAT y PRX-2 (Irwin *et al*, 2011). Los reportes al respecto son discordantes, ya que algunos informan aumento de la actividad enzimática, mientras que otros la encuentran disminuida. En el presente trabajo no se observaron cambios en el nivel de expresión de los

genes de CAT, SOD y PRX-2 con respecto a los sujetos saludables en los individuos con LA. En cambio, se detectó una disminución significativa en la expresión génica de una o todas las enzimas en SMD, NLP y NMP (Gráfico 1). En coincidencia, Oltra *et al* (2001) detectaron una disminución de la actividad de SOD y CAT en los linfocitos de sujetos con LLC. Por el contrario, Kazama *et al* (2014) han comunicado que la expresión de PRX-2 estuvo aumentada en los neutrófilos del SMD denominado citopenia refractaria con displasia multilineaje (CRDM) en comparación con controles sanos. La diferencia con este último podría deberse a que no se incluyó ningún caso de CRDM en este estudio.

El papel de la inflamación en el inicio y la progresión de muchos tumores sólidos está bien establecido (Craver *et al*, 2018). Sin embargo, la comprensión de cómo la inflamación promueve la iniciación y la progresión de neoplasias hematológicas es un campo emergente. El análisis de la expresión de los genes de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  reveló una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de este último en SMD, NLP y NMP y no detectó variaciones de IL-6 en ninguno de los grupos bajo estudio (Gráfico 1). Según algunos autores, una sobreproducción de TNF- $\alpha$  e IL-6 se observa con mayor frecuencia en pacientes con neoplasias mieloides, lo que sugiere que estas citoquinas desempeñan un papel en los aspectos fundamentales del desarrollo y/o manifestaciones de la malignidad hematológica (Sanchez-Correa

*et al*, 2013; Craver *et al*, 2018). Si bien sólo se midió la expresión de los genes de TNF- $\alpha$  e IL-6, es evidente que los resultados actuales están en desacuerdo y podrían estar relacionados con terapia anti-inflamatoria previa. Si bien ningún paciente indicó el uso de dicha medicación, podrían haberla obviado debido a un uso esporádico. Es importante destacar que en pacientes con LMA, niveles elevados de IL-10 y disminuidos de IL-6 se correlacionaron con una mayor supervivencia del paciente (Sanchez-Correa *et al*, 2013). El nivel de expresión del gen de Nrf2 demostró influencia significativa sobre los niveles de expresión del gen de la PRX-2 ( $R^2= 0,73$ ), mientras que no intervino sobre la expresión del resto de los genes ( $R^2$  CAT= 0,26;  $R^2$  SOD= 0,29;  $R^2$  TNF- $\alpha$ = 0,26;  $R^2$  IL-6= 0,25). En un modelo murino de  $\beta$ -

talasemia, Mate *et al* han comunicado que los efectos de PRX-2 en respuesta al EOX están mediados por la activación de Nrf2 (Matte *et al*, 2015). También PRX-1 y PRX-6, otros miembros de la familia de las peroxiredoxinas, han sido reportadas como proteínas inducibles por EOX y reguladas por Nrf2 (Park *et al*, 2016).

El estudio tiene ciertas limitaciones como un tamaño de muestra relativamente pequeño, y población normal con sesgo para evaluar algunos de los factores de riesgo debido a que fue escogida en el ámbito académico y residían sólo en la zona Metropolitana. Futuros trabajos deberían seleccionar un grupo control entre pacientes que concurren a hospitales públicos, y que presenten factores socio-económicos semejantes.

**TABLA 3:** Factores de riesgo en los sujetos con y sin NH (Tucumán, 2015)

FACTORES ANALIZADOS	NH	SIN NH	P	Q
HÁBITOS TÓXICOS			0,013	0,316
Si	13	2		
No	20	20		
TIPO DE DIETA			0,672	0,057
OMNÍVORA	31	20		
VEGETARIANA	2	2		
ACTIVIDAD FÍSICA			0,000	0,475
Si	14	21		
No	19	1		
EXPOSICIÓN A TÓXICOS			0,481	0,094
Si	12	6		
No	21	16		
ANTECEDENTES DE NEOPLASIA			0,090	0,223
Si	4	0		
No	29	22		

Fuente: Elaboración propia a partir de datos recopilados en el estudio

**TABLA 4:** Parámetros hematológicos y expresión de Nrf2 de la población analizada (Tucumán, 2018)

GRUPO NH	HEMOGLOBINA [g/L]	LEUCOCITOS [ $\times 10^9/L$ ]	PLAQUETAS [ $\times 10^9/L$ ]	BLASTOS EN SP [%]	BLASTOS EN MO [%]	Nrf2
LA	82*† (49-100)	14,0 (1,5-118,0)	26*† (2-124)	38 (1-89)	52 (20-96)	0,25 (0,007-0,13 $\times 10^6$ )
SMD	80 (72-130)	4,6 (0,7-24,0)	26 (17-290)	22 (0-40)	2 (1-15)	0,075 (0,02-0,11)
NLP	107 (90-138)	11,5 (4,5-62,0)	136 (89-307)	0	0	0,10 (0,02-0,23)
NMP	85 (75-145)	67,0* (19,0-70,0)	34 (16-430)	5 (2-12)	0 (0-6)	0,079 (0,076 $\times 10^{-4}$ -1,12)
GRUPO CONTROL	125 (107-161)	7,0 (4,6-9,7)	222 (161-442)	0	0	1,10 (1,3 $\times 10^{-8}$ -5,78)

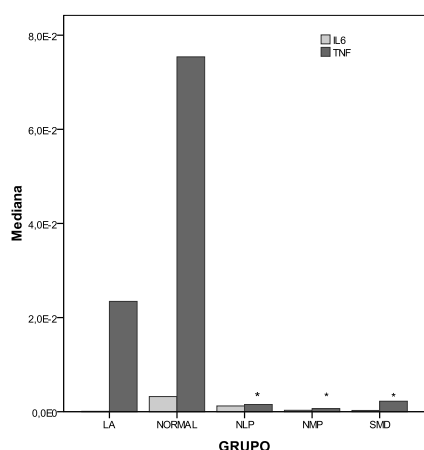
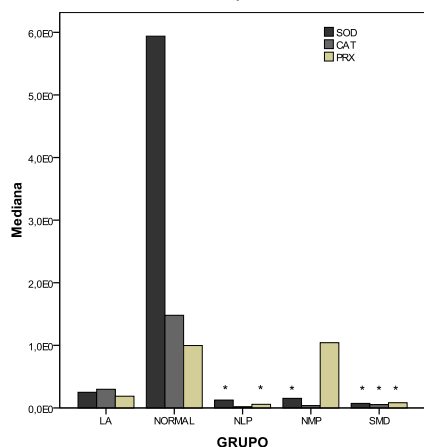
Fuente: Elaboración propia a partir de datos recopilados en el estudio

\*p< 0,05 con respecto al grupo control

†p<0,05 con respecto al grupo NLP

Abreviaturas: NH, neoplasia hematológica; LA, leucemia aguda; SMD, síndrome mielodisplásico; NLP, neoplasia linfoproliferativa; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SP, sangre periférica; MO, médula ósea.

**Gráfico 1:** Expresión de los genes de enzimas antioxidantes y de proteínas inflamatorias en la población estudiada (Tucumán, 2018)



Fuente: Elaboración propia a partir de datos recopilados en el estudio

\*p<0,05 con respecto al grupo control

Abreviaturas: LA, leucemia aguda; SMD, síndrome mielodisplásico; NLP, neoplasia linfoproliferativa; NMP, neoplasia mieloproliferativa; CAT, catalasa; SOD, superóxido dismutasa; PRX, peroxiredoxina- 2; TNF, factor de necrosis tumoral alfa; IL-6, interleuquina- 6.

## Conclusiones

Este trabajo determinó la prevalencia de las NH en 2 centros asistenciales de la provincia de Tucumán y detectó una asociación significativa entre padecer NH y algunos factores personales y de riesgo. Este tipo de estudios descriptivos son necesarios para la obtención de datos epidemiológicos útiles para el establecimiento de estrategias en salud pública, para la confirmación de datos obtenidos de poblaciones mayoritariamente europeas y norte-americanas a fin de adaptar apropiadamente los esquemas terapéuticos basados en riesgo a nuestra población. En ese sentido, los resultados del estudio han demostrado que los factores socio-económicos son determinantes de salud muy importantes, ya que conllevan un mayor riesgo para padecer neoplasia hematológica.

Por otro lado, se reveló una disminución de la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes y de TNF- $\alpha$  en algunas de las NH, y la expresión de Nrf2 se asoció a la de PRX-2. La regulación terapéutica de la

expresión de Nrf2 podría ser una futura e importante herramienta en el control de la progresión de las hemopatías malignas.

### Bibliografía

- Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 Signaling Pathway: Pivotal Roles in Inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2016; pii: S0925-4439(16)30286-1.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016; 127 (20): 2391-405.
- Bain B. The nature of leukaemia, cytology, cytochemistry and the FAB classification of acute leukaemia. En: *Leukaemia diagnosis*, 4th edition, Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2010; pp: 1-63.
- Bendek G, Riscalá C, Figueroa MF, Lepera M, Gómez RA, Golubisky V, et al. Leucemias agudas: experiencia de 8 años en Tucumán. Hospital Centro de Salud. Hemobanco. Facultad de Medicina y Bioquímica, UNT. Tucumán, 2015.
- Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 290 (5): H1862-70.
- Craver BM, El Alaoui K, Scherber RM, Fleischman AG. The critical role of inflammation in the pathogenesis and progression of myeloid malignancies. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(4).
- Franco SS, De Falco L, Ghaffari S, Brugnara C, Sinclair DA, Matte' A, Iolascon A, Mohandas N, Bertoldi M, An X, Siciliano A, Rimmelé P, Cappellini MD, Michan S, Zoratti E, Anne J, De Franceschi L. Resveratrol accelerates erythroid maturation by activation of FoxO3 and ameliorates anemia in  $\beta$ -thalassemic mice. *Haematologica*. 2014; 99(2):267-75.
- Han X, Han Y, Jiao H, Jie Y. 14-3-3 $\zeta$  regulates immune response through Stat3 signaling in oral squamous cell carcinoma. *Molecules and Cells*, 2015; 38 (2): 112-121.
- Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood*, 2011; 117 (22): 5816-26.
- Irwin ME, Rivera-Del Valle N, Chandra J. Redox control of leukemia: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2013; 18 (11): 1349-83.
- Jakobsen NA, Vyas P. From genomics to targeted treatment in haematological malignancies: a focus on acute myeloid leukaemia. *Clin*

- Med (Lond). 2018; 18 (Suppl 2): s47-s53.
- Kazama H, Teramura M, Kurihara S, Yoshinaga K, Kato T, Motoji T. Peroxiredoxin 2 expression is increased in neutrophils of patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia. *Br J Haematol*. 2014; 166 (5): 720-8.
  - Macari ER, Lowrey CH. Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. *Blood*. 2011; 117(22):5987-97.
  - Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis CD, Marinari UM, *et al*. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2016; 2016: 6235641.
  - Matte A, De Falco L, Iolascon A, Mohandas N, An X, Siciliano A, Leboeuf C, Janin A, Bruno M, Choi SY, Kim DW, De Franceschi L. The interplay between peroxiredoxin-2 and nuclear factor-erythroid 2 is important in limiting oxidative mediated dysfunction in  $\beta$ -thalassemic erythropoiesis. *Antioxid Redox Signal*. 2015; 23 (16): 1284-97.
  - McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutases: you've come a long way, baby. *Antioxid Redox Signal*, 2014; 20 (10): 1548-9.
  - Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2018; 5 (1): e14-e24.
  - Nakashima JP, Koifman RJ, Koifman S. Cancer incidence in the Western Amazon: population-based estimates in Rio Branco, Acre State, Brazil, 2007-2009. *Cad Saude Publica*. 2012; 28 (11): 2125-32.
  - Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30 (11): 1286-92.
  - Park MH, Jo M, Kim YR, Lee CK, Hong JT. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacol Ther*. 2016; 163: 1-23.
  - Pavón Romero L, Jiménez Martínez MC, Garcés Álvarez ME. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. 1ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Health, México, 2016; pp: 106-10.
  - Raña RJ. Epidemiología de enfermedades linfó y mieloproliferativas en Argentina meridional. *Hematología*, 2003; 7 (2): 35-9.
  - Rybicka M, Stachowska E, Gutowska I, Parczewski M, Baśkiewicz M,

- Machaliński B, Boroń-Kaczmarzka A, Chlubek D. Comparative effects of conjugated linoleic acid (CLA) and linoleic acid (LA) on the oxidoreduction status in THP-1 macrophages. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 (8): 4095-10.
- Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, Gayoso I, Arcos MJ, Bañas H, Morgado S, Casado JG, Solana R, Tarazona R. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine.* 2013; 61 (3): 885-91.
  - Sarabia-Cadena MB, Hernández-Muñoz A, Rangel-Peniche B, García Obregón OP, Ferriz-Martínez R, García-Gasca T. Antioxidantes, especies reactivas de oxígeno y cáncer: ¿el bueno, el malo y el feo? *Ciencia UAQ Multidisciplinaria,* 2013; 6 (2).
  - Sultan S, Irfan SM, Ali N, Nawaz N. Institutional-based tumor registry of hematopoietic malignancies: A 4 years' preliminary report from Karachi. *J Lab Physicians.* 2018; 10 (2): 168-72.
  - Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood,* 2016; 127 (20): 2375-90.
  - Swirsky D, Bain BJ. Erythrocyte and leucocyte cytochemistry. En: Lewis M, Bain BJ, Bates I. *Dacie y Lewis. Hematología Práctica.* 10<sup>th</sup> ed. Madrid, España: Elsevier, 2008:311-333.
  - Zagodzón R, Golab J. Cancer stem cells in haematological malignancies. *Contemp Oncol (Pozn).* 2015; 19 (1A): A1-6.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Director del Laboratorio Tucumán, Bioq. Esp. Fabián Vechetti, por el uso del Laboratorio de Biología Molecular, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

### **Financiamiento**

El presente trabajo de investigación fue realizado con el apoyo de las Becas SALUD INVESTIGA “Dr. Abraam Sonis”, categoría individual, otorgada por el Ministerio de Salud de la Nación, a través de la Dirección de Investigación para la Salud y por la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT), PIUNT 26/D520.