

Tesis Doctoral

Estudios genéticos y citogenéticos en Aplasia Medular

Bestach, Yesica Soledad

2015-03-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bestach, Yesica Soledad. (2015-03-26). Estudios genéticos y citogenéticos en Aplasia Medular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bestach, Yesica Soledad. "Estudios genéticos y citogenéticos en Aplasia Medular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-26.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudios genéticos y citogenéticos en Aplasia Medular

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Yesica Soledad Bestach

Director de tesis: Irene Beatriz Larripa
Director Asistente: Carolina Bárbara Belli
Consejero de Estudios: Elba Susana Vázquez

Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET/
Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2015

Estudios genéticos y citogenéticos en Aplasia Medular

Resumen

La Aplasia Medular o Anemia Aplásica adquirida (AA) es una insuficiencia medular global cuantitativa, caracterizada por una médula ósea hipo-celular, pancitopenia y riesgo de progresión a Síndromes Mielodisplásicos (SMD). El 80% de los casos de AA son de etiología idiopática, vinculados a un desorden autoinmune subyacente. Los principales mecanismos relacionados a la supresión hematopoyética en AA involucran un incremento de las citoquinas TNF- α e IFN- γ producidas por linfocitos T citotóxicos y T helper (Th) 1, y el consecuente aumento de la apoptosis. También se observa un desbalance entre los diferentes *subsets* de linfocitos T y la desregulación de otras citoquinas como IL-6 y TGF- β 1.

El objetivo fue estudiar polimorfismos asociados con la expresión diferencial de los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*, y establecer su relación con susceptibilidad y/o características clínico-patológicas en pacientes con AA y SMD. Además, determinar los niveles de expresión de estas citoquinas y de los factores de transcripción Foxp3, T-bet, GATA-3 y ROR γ t en AA, a fin de caracterizar el desbalance entre los linfocitos T regulatorios (Treg), Th1, Th2 y Th17, respectivamente.

Los resultados sugieren que los polimorfismos estudiados no estarían asociados con susceptibilidad a AA; mientras que, existiría una relación entre los polimorfismos de los genes *TNF* e *IL6* y riesgo a SMD, en nuestra población. Las variantes polimórficas estudiadas estarían relacionadas con la severidad de las citopenias tanto en AA como en SMD, pudiendo actuar como modificadores genéticos de la enfermedad. Los hallazgos del análisis de expresión en AA muestran un incremento de *TNF* e *IL6*, y una disminución de *TGFB1*. La relación entre los factores de transcripción reflejaría una disminución en la diferenciación y/o función de células Treg favoreciendo un estado pro-inflamatorio, principalmente Th1 y Th2, lo cual podría contribuir con los mecanismos patogénicos relacionados a la falla medular en los pacientes con AA.

Palabras claves: Aplasia Medular, Síndromes Mielodisplásicos, polimorfismos, citoquinas, expresión génica

Genetics and cytogenetics studies in aplastic anemia

Abstract

Acquired aplastic anemia (AA) is a marrow failure characterized by a hypocellular bone marrow, pancytopenia and risk of progression to Myelodysplastic Syndromes (MDS). Around 80% of AA cases are idiopathic, linked to an underlying autoimmune disorder. The main mechanisms related to the hematopoietic suppression in AA involve an increase of the cytokines TNF- α and IFN- γ produced by cytotoxic T and T helper (Th) 1 cells and, therefore, an apoptosis rise. Furthermore, perturbations of the T cell balance and abnormal regulation of other cytokines such as IL-6 and TGF- β 1 play important roles to the development of immune disorders in AA.

The aim of this work was to study the polymorphisms associated with differential expression of *TNF*, *IFNG*, *IL6* and *TGFB1* genes and to establish its relationship with susceptibility and/or clinic-pathologic features in patients with AA and MDS. In addition, to determine the expression levels of these cytokines and of the transcription factors Foxp3, T-bet, GATA-3 and ROR γ t in AA, in order to characterize the imbalance among regulatory T cells (Treg), Th1, Th2 and Th17, respectively.

The obtained results suggest that, in our population, the studied polymorphisms would not be associated with susceptibility to AA; while polymorphisms in *TNF* and *IL6* genes may increase propensity to MDS. Furthermore, these polymorphic variants could be related to severity of the cytopenias in AA and MDS, and may act as genetic modifiers of the diseases. Moreover, the analysis of cytokine expression in AA shows an increase of *TNF* and *IL6*, and a decreased of *TGFB1*. Finally, the ratio among transcription factors might reflect a Treg deficiency impairment, supporting a pro-inflammatory state, mainly Th1 and Th2, which may contribute to the pathogenic mechanisms related to the bone marrow failure observed in patients with AA.

Keywords: Aplastic Anemia, Myelodysplastic Syndromes, polymorphisms, cytokines, gene expression

Agradecimientos

A la Dra. Irene Larripa por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de Tesis, y haberme guiado y apoyado con su confianza durante su realización.

A la Dra. Carolina Belli por haberme enseñado tanto las artes de la Biología Molecular como de la Citogenética, por sus valiosos aportes y fundamental contribución al presente trabajo de Tesis y, sobre todo, por haberme acompañado y apoyado incondicionalmente día y día durante su desarrollo.

A la Dra. Elba Vázquez por haberme guiado y aconsejado durante la realización de la presente Tesis.

A toda mi familia: mi hija, mi mamá y mi papá, mis hermanas, mis sobrinas, mi abuela y mi abuelo (aunque ya no esté), por todo el apoyo recibido; muy especialmente a mi mamá por estar siempre dispuesta a ayudarme para poder seguir adelante.

A Daniel por su apoyo, comprensión, paciencia y, sobre todo, por su amor.

A mis amigas de toda la vida, sólo por ser mis amigas y regar nuestra amistad.

Al Dr. Cristian Ferri por su aporte en el desarrollo de los estudios de expresión génica, por su calidez humana y predisposición para ayudar a los demás.

A la Lic. Virginia Palau Nagore por su colaboración en la detección de los polimorfismos de *TGFB1*, por acompañarme día a día y brindarme todo su apoyo.

Al Dr. Carlos De Brasi por su paciencia para solventarme las dudas y a la Dra. Liliana Rossetti por su asesoramiento en la detección del polimorfismo de *TNF*.

A mis actuales compañeros de laboratorio, y a aquellos que se fueron en busca de otros rumbos, por estar conmigo día a día.

A los profesionales de los Servicios de Hematología de las siguientes instituciones por su colaboración en el aporte de datos clínicos fundamentales para la realización de la Tesis: Hospital Interzonal General de Agudos "Gral. San Martín" y Hospital de Niños "Sor María Ludovica" de La Plata, Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez", Hospital Nacional "Prof. Dr. A. Posadas", Hospital General de Agudos "C. G. Durand", Hospital General de Agudos "J.M. Ramos Mejía", Instituto de Investigaciones Hematológicas/ Academia Nacional de Medicina (ANM), entre otros.

A la Dra. Gabriela Salamone y a la Lic. Soledad Gori, Laboratorio de Células Presentadoras de Antígenos e Inflamación, IMEX-CONICET/ ANM, por la colaboración en la cuantificación de las citoquinas en plasma.

Al IMEX-CONICET/ ANM por haberme brindado la posibilidad de realizar el presente trabajo de Tesis.

Este trabajo fue realizado con fondos aportados por: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT); el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), el Instituto Nacional del Cáncer y la Fundación "Roemmers".

Dedicado a mi hija, Milena

Parte de los resultados presentados en este trabajo dieron lugar a:

Publicaciones científicas:

- **Bestach Y***, Belli CB*, Sieza Y, Gelemur M, Giunta M, Flores MG, Watman N, Bengió R, Larripa I. *The presence of -308A TNF α is associated with anemia and thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndromes.* *Contribución igualitaria. Blood Cells Mol Dis 2011; 47:255-258.

- **Bestach Y**, Sieza Y, Attie M, Riccheri C, Verri V, Bolesina M, Bengió R, Larripa I, Belli C. *Polymorphisms in TNF and IFNG are associated with clinical characteristics of aplastic anemia in Argentinean population.* Leuk Lymphoma 2015; 21:1-6.

Artículos de divulgación:

- **Bestach Y***, Belli C*, Flores MG, Sieza Y, Gelemour M, Venturini C, Negri Aranguren P, Watman N, Bengió R, Larripa I. *La presencia del alelo -308A del TNF α se asocia con anemia y plaquetopenia en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos.* Por invitación de la Editorial por su selección para la Sesión Plenaria del XX Congreso de Hematología con opción a premio. *Contribución igualitaria. Hematología 2012; 16:147-153.

Capítulos en libros:

- **Bestach Y**, Flores MG, Sakamoto F, Bengió R, Larripa I, Belli CB. *The presence of -308A TNF allele is associated with clinical parameters of Myelodysplastic Syndromes.* Ed. Escarra A. En: *Tumor Necrosis Factor: Structure, Enzyme Regulation and Role in Health and Disease.* Nova Biomedical Books, pp 75-92; 2013.

Comunicaciones a Congresos publicadas como resúmenes:

- **Bestach Y**, Sieza Y, Sciuccati G, Bengió R, Verri V, Giunta M, Larripa I, Belli C. *Análisis de polimorfismos en los genes Tumor Necrosis Factor-alpha e Interferon-gamma en pacientes con falla medular: Anemia Aplásica y Síndromes Mielodisplásicos.* Congreso Conjunto SAIC, SAFE, SAFIS. Mar del Plata: 17 al 20 de Noviembre. Medicina 2010; 70 (S2): 196.

- **Bestach Y**, Sieza Y, Bolesina M, Aversa L, Attie M, Riccheri C, Verri V, Rivas M, Larripa I, Belli C. *Estudio de polimorfismos en los genes de las citoquinas Tumor Necrosis Factor-alpha e Interferon-gamma en pacientes con Síndromes de Falla Medular Adquirida de la República Argentina.* XX Congreso Argentino de Hematología. Mar del Plata: 17 al 22 de Noviembre. Hematología 2011; 15(2): 73.

- Belli C, **Bestach Y**, Flores G, Sieza Y, Gelemour M, Venturini C, Negri Aranguren P, Watman N, Bengió R, Larripa I. *La presencia del alelo -308A del TNF α se asocia con anemia y plaquetopenia en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos.* XX Congreso Argentino de Hematología. Mar del Plata: 17 al 22 de Noviembre. Hematología 2011; 15(2): 45.

- **Bestach Y**, Bengió R, Riccheri C, Flores MG, Negri Aranguren P, Aversa L, Watman N, Sieza Y, Larripa I, Belli C. *Frecuencia diferencial de polimorfismos en genes de citoquinas en pacientes con síndromes de falla medular hipoplásica.* LVII Reunión Científica de SAIC, LX de la SAI. Mar del Plata: 14 al 17 de Noviembre. Medicina 2012; 72 (S2): 197.

- Belli CB, **Bestach Y**, Palau Nagore MV, Negri Aranguren P, Giunta M, Bolesina M, Sieza Y, Verri V, Bengió R, Larripa I. *Análisis de polimorfismos en los genes TNF, IFNG y TGFB1 en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos.* XXI Congreso Argentino de Hematología. Mar del Plata: 29 de Octubre al 1 de Noviembre. Hematología 2013; 17:144.

- **Bestach Y**, Attie M, Cocca A, Riccheri C, Gonzalez J, Bolesina M, Arbelbide J, Sakamoto F, Larripa I, Belli CB. *Estudio de los niveles de expresión del gen TGFB1 en pacientes con síndromes de falla medular adquirida: Anemia Aplásica y Síndromes Mielodisplásicos.* XXI Congreso Argentino de Hematología. Mar del Plata: 29 de Octubre al 1 de Noviembre. Hematología 2013; 17:192.

- **Bestach Y**, Palau Nagore V, Cocca A, Riccheri C, Gonzalez J, Bolesina M, Sieza Y, Rivas M, Larripa I, Belli C. *Estudio de polimorfismos en los genes TGFB1 e IL6 en pacientes con Aplasia Medular adquirida.* Congreso Conjunto SAIC, SAI. Mar del Plata: 19 al 22 de Noviembre. Medicina 2014; 74 (S2), 169-170.

Índice

Introducción: La Aplasia Medular adquirida	1
1. Definición e historia	2
2. Etiología	3
3. Incidencia y epidemiología	3
4. Diagnóstico	5
5. Tratamiento	6
5.1. Terapias inmunosupresoras	7
5.2. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas	8
5.2.1. TCPH con donante relacionado	8
5.2.2. TCPH con donante no relacionado	9
6. Fisiopatología	9
6.1. Modelo de destrucción inmune de la hematopoyesis	10
6.1.1. Linfocitos Th1 y linfocitos Tc. Producción de IFN- γ y TNF- α	11
6.1.2. Balance Th1/Th2	12
6.2. Otras vías vinculadas a la patogénesis	13
6.2.1. Linfocitos Th17	13
6.2.2. Linfocitos T regulatorios	14
6.2.3. Relación entre células Th17, Th1, Th2 y Treg	15
7. Polimorfismos en genes de citoquinas y susceptibilidad	16
7.1. Genes de citoquinas: funciones y principales polimorfismos relacionados a susceptibilidad	17
7.1.1. <i>TNF</i>	17
7.1.2. <i>IFNG</i>	18
7.1.3. <i>IL6</i>	19
7.1.4. <i>TGFB1</i>	20
8. Superposición clínica de la AA con otros Síndromes de Falla Medular	21
8.1. SMD	23
8.1.1. Características generales	23
8.1.2. Clasificaciones	27
8.1.2.1. Clasificación según el Grupo Cooperativo FAB	27
8.1.2.2. Clasificación según la OMS	27
8.1.3. AA <i>versus</i> SMD: diagnóstico diferencial y evolución clonal	29
8.2. HPN	30
8.2.1. AA <i>versus</i> HPN: diagnóstico diferencial y evolución clonal	31
Objetivos	32
Materiales y métodos	34
1. Poblaciones estudiadas	35
2. Extracción de ADN y análisis cuali-cuantitativo del mismo	37
2.1. Métodos de extracción de ADN	37
2.1.1. Extracción de ADN con fenol-cloroformo	37
2.1.2. Extracción de ADN a partir de muestras en Trizol	37
2.1.3. Extracción/ purificación de ADN mediante columnas	38

2.2. Análisis cuantitativo	38
2.3. Análisis cualitativo	38
3. Amplificación genómica completa	38
4. Estudio de polimorfismos	39
4.1. Determinación del SNP -308 G/A (<i>TNF</i>)	40
4.1.1. PCR-RFLP	40
4.1.2. Protocolo de tinción con nitrato de plata	41
4.2. Determinación de los SNPs +874 A/T (<i>IFNG</i>), -174 G/C (<i>IL6</i>) y, +869 C/T y +915 G/C (<i>TGFB1</i>)	41
4.2.1. PCR-alelo específica	41
4.3. Determinación del polimorfismo de repetición +875 CAn (<i>IFNG</i>)	42
4.4. Secuenciación de ADN	42
5. Extracción de ARN y análisis cuali-cuantitativo del mismo	43
5.1. Método de extracción de ARN con Trizol	43
5.2. Análisis cuantitativo	43
5.3. Análisis cualitativo	44
6. Análisis de expresión génica	44
6.1. Reacción de retro-transcripción (RT-PCR)	44
6.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	45
6.2.1. Validación del método comparativo $2^{-\Delta Ct}$	46
6.2.1.1. Determinación de la eficiencia de la reacción de qPCR	46
6.2.1.2. Determinación de la igualdad en las eficiencias	47
7. Herramientas bioinformáticas	47
8. Expresión plasmática de citoquinas	48
9. Estudios citogenéticos	48
9.1. Bando G	49
9.2. Bando DAPI	49
9.3. FISH	49
9.4. Test clastogénico <i>in vitro</i> de sensibilidad al DEB	50
9.5. Herramientas informáticas utilizadas para el análisis citogenético	51
10. Análisis estadístico	51
Resultados – Capítulo 1: Estudio de polimorfismos	52
1. Poblaciones estudiadas y caracterización citogenética de la AA	53
1.1. Pacientes y controles	53
1.2. Estudios citogenéticos en AA	56
1.2.1. Cariotipos obtenidos	56
1.2.2. Estudios citomoleculares	56
1.2.3. Test de sensibilidad al DEB	57
2. Estudio de polimorfismos en genes de citoquinas	58
2.1. Determinación de los polimorfismos en los <i>TNF</i> , <i>IFNG</i> , <i>IL6</i> y <i>TGFB1</i>	58
2.1.1. SNP -308 G/A (<i>TNF</i>)	58
2.1.2. SNPs +874 A/T (<i>IFNG</i>), -174 G/C (<i>IL6</i>) y, +869 C/T y +915 G/C (<i>TGFB1</i>)	59
2.1.3. Polimorfismo de repetición +875 CAn (<i>IFNG</i>)	60
2.2. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en los genes <i>TNF</i> , <i>IFNG</i> , <i>IL6</i> y <i>TGFB1</i>	61

2.2.1. SNP -308 G/A (<i>TNF</i>)	61
2.2.2. Polimorfismo de repetición +875 CAn y SNP +874 A/T (<i>IFNG</i>)	61
2.2.2.1. Desequilibrio de ligamiento	63
2.2.3. SNP -174 G/C (<i>IL6</i>)	64
2.2.4. Polimorfismos en el gen <i>TGFB1</i>	64
2.2.4.1. SNPs +869 C/T y +915 G/C	64
2.2.4.2. Combinatoria de los SNPs +869 C/T y +915 G/C	65
2.3. Asociación de los polimorfismos con características clínicas	66
2.3.1. Asociación con parámetros clínicos en AA	66
2.3.1.1. Asociación con características clínicas al diagnóstico	66
2.3.1.2. Asociación con respuesta al tratamiento	72
2.3.2. Asociación con parámetros clínicos en SMD	74
2.3.2.1. Asociación con características clínicas al diagnóstico	74
2.3.2.2. Asociación con características clínicas relacionadas con seguimiento y evolución de la enfermedad	77
Resultados – Capítulo 2: Análisis de expresión génica	81
1. Optimización de los parámetros de la PCR cuantitativa en tiempo real	82
1.1. Eficiencia de amplificación y sensibilidad de la qPCR	82
1.2. Reproducibilidad de la qPCR: variación intra- e inter-ensayo	83
1.3. Especificidad de la qPCR	83
2. Validación del modelo de cuantificación: el método comparativo $2^{-\Delta Ct}$	84
2.1. Eficiencias de amplificación	85
2.2. Igualdad en las eficiencias de amplificación	85
3. Estudios de expresión génica en AA	86
3.1. Niveles de expresión de los genes de citoquinas	86
3.1.1. Expresión génica de <i>TNF</i> e <i>IL6</i>	86
3.1.2. Expresión génica de <i>IFNG</i> y <i>TGFB1</i>	89
3.1.3. Expresión plasmática de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ	90
3.2. Niveles de expresión génica de los factores de transcripción	90
3.2.1. Expresión génica de <i>TBET</i> , <i>GATA3</i> , <i>RORγt</i> y <i>FOXP3</i>	90
3.2.2. Relación entre las expresiones génicas	93
Discusión	96
1. Estudio de los polimorfismos en genes de citoquinas en AA y SMD	
1.1. Relación con susceptibilidad	99
1.2. Relación con características clínico-patológicas	104
2. Análisis de los niveles de expresión génica en AA	110
2.1. Expresión génica de las citoquinas <i>TNF</i> , <i>IL6</i> , <i>IFNG</i> y <i>TGFB1</i>	110
2.2. Expresión génica de los factores de transcripción <i>TBET</i> , <i>GATA3</i> , <i>RORγt</i> y <i>FOXP3</i>	113
Conclusiones	117
Bibliografía	120

Abreviaturas

AA: Anemia Aplásica o Aplasia medular adquirida
ADNc: ADN copia
AF: Anemia de Fanconi
AR: Anemia Refractaria
AREB: AR con exceso de blastos
AREBt: AREB en transformación
ARNm: ARN mensajero
ARSA: AR con sideroblastos en anillo
BMO: biopsia de MO
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA: célula presentadora de antígeno
CRDM: citopenia refractaria con displasia multilineaje
CRDU: citopenia refractaria con displasia unilineaje
CsA: ciclosporina
DE: desvío estándar
DEB: diepoxibutano
DO: densidad óptica
EPO: eritropoyetina
FAB: grupo cooperativo Franco-Americano-Británico
Fas/FasL: Fas/ ligando de Fas
FISH: hibridización *in situ* con sondas fluorescentes (*fluorescent in situ hybridization*)
Fw: *forward*
GAT: globulina anti-timocítica
Hb: hemoglobina
HLA: *Human leukocyte antigen*
HPN: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
IFN- γ : Interferón-gama (*Interferon-gamma*)
IL: interleuquina
IPSS: Sistema Pronóstico Internacional (*International Prognostic Scoring System*)
iTreg: Treg inducibles
LMA: Leucemia Mieloide Aguda
LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crónica
LPS: lipopolisacáridos
MO: médula ósea
n.a.: no alcanzan
n.d.: no determinado
n.e.: no evaluable
N: neutrófilos
NK: *natural killer*
nTreg: Treg naturales
OMS: Organización Mundial de la Salud
p: *petit*: brazo corto de un cromosoma determinado
PAMO: punción y aspiración de MO
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
Pq: plaquetas
q: brazo largo de un cromosoma
qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
RC: respuesta completa
Ret: reticulocitos
RG: respuesta global
RP: respuesta parcial
RT-PCR: Reacción de retro-transcripción
Rv: *reverse*
s.d.: sin datos
SFM: Síndromes de Falla Medular

SMD: Síndromes Mielodisplásicos
SMDh: Síndromes Mielodisplásicos hipoplásicos
SMDs: Síndromes Mielodisplásicos secundarios
SNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple (*Single Nucleotide Polymorphism*)
SP: sangre periférica.
SV: sobrevida
Tc: linfocitos T citotóxicos
TCPH: trasplante de células progenitoras hematopoyéticas
TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante-beta (*Transforming growth factor-beta*)
Th: linfocitos T colaboradores
TIS: terapia inmunosupresora
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral-alfa (*Tumor necrosis factor-alpha*)
Treg: linfocitos T regulatorios

Introducción

La Aplasia Medular adquirida

1. Definición e historia

La Aplasia Medular o Anemia Aplásica adquirida (AA) es una insuficiencia medular global de tipo cuantitativo, caracterizada por una médula ósea (MO) hipo o a-celular, debido a que las células troncales (*stem cells*) y las progenitoras hematopoyéticas pierden su capacidad de auto-renovación y/o diferenciación. La consecuencia del fracaso de la función hematopoyética o falla medular es una inadecuada producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, generando pancitopenia, lo cual se refiere a la disminución de los elementos de sangre periférica (SP): anemia, leucopenia y trombocitopenia.

La descripción inicial de este trastorno fue atribuida a Paul Ehrlich en 1888, quien se refirió a una joven embarazada con anemia y leucopenia severas, fiebre, ulceración de las encías y metrorragia. La MO mostraba un aspecto graso sin actividad medular atribuyendo este hallazgo a un deterioro funcional primario (Ehrlich, 1888). El término de Anemia Aplásica (Aplasia: del griego *a(n)*: 'no', 'sin' + *plas(iā)*: 'formación celular') le fue asignado por Anatole Chauffard en 1904 (Chauffard, 1904). En 1934, Thompson y col. definieron a la AA como una entidad clínica caracterizada por pancitopenia secundaria a depresión de la MO (Thompson y col., 1934). En 1959, como resultado de un estudio en el cual se evaluaron 39 pacientes, Scott y col. propusieron reservar el término de AA para las situaciones en las cuales se comprobara pancitopenia, hipoplasia medular acentuada y ausencia de una patología primaria que infiltre, reemplace o anule la hematopoyesis activa (Scott y col., 1959; Wintrobe, 1969).

Al igual que en otras patologías, las controversias ocasionadas en la identificación adecuada de pacientes con AA requirieron de la determinación de criterios estrictos de diagnóstico. Además, el desarrollo de herramientas diagnósticas como el medulograma y la biopsia medular, así como también el avance de nuevas técnicas de imagen, contribuyeron en la caracterización del cuadro clínico de AA. Camitta y col. (Camitta y col., 1975), el *International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study group* (IAAAS, 1987) y Bacigalupo y col., (Bacigalupo y col., 1988) definieron los criterios que se aceptan actualmente y se aplican en la práctica médica tanto para el diagnóstico de la AA como en la clasificación de los pacientes con respecto a la severidad del cuadro clínico (ver Introducción sección 4).

2. Etiología

La AA se clasifica según su etiología como idiopática o secundaria. En aquellos casos donde no puede realizarse una presunción etiológica clara, se la designa como idiopática, correspondiendo, aproximadamente, al 80% de los pacientes. Si bien el término idiopático significa que se desconoce su causa, existe evidencia que involucra a un desorden autoinmune subyacente como posible mecanismo patogénico. En estos casos, la enfermedad ocurre cuando el sistema inmune del paciente ataca su propia MO interfiriendo con la producción de las células sanguíneas. Por otro lado, la falla medular puede ser secundaria relacionada a la exposición a diferentes agentes químicos, físicos y/o biológicos, detallados en la Tabla 1 (Fliedner y col., 1986; Malkin y col., 1990; Smith, 1996; Choudhry y col., 2002; Marsh y col., 2009; Prihartono y col., 2011; Rauff y col., 2011; de Masson y col., 2013).

Tabla 1: Clasificación etiológica de la AA

<p>Idiopática</p>
<p>Secundaria</p> <p><u>Agentes químicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Medicamentos o quimioterapéuticos: <ul style="list-style-type: none"> - Mostazas azufradas o nitrogenadas y sus congéneres (busulfán, ciclofosfamida, otros) - Citostáticos: análogos purínicos o pirimidínicos (6-mercaptopurina, tioguanina, arabinósido de citosina) - Antimitóticos (colchicina) - Otros (sales de oro, cloranfenicol) • Benceno, sus derivados y sustancias relacionadas • Insecticidas • Metales pesados <p><u>Agentes físicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Radiaciones ionizantes (rayos X, isótopos radiactivos, bombas atómicas, otros) <p><u>Agentes biológicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Virus (Hepatitis, Epstein-Barr, Parvovirus B19, Citomegalovirus, Virus de la inmunodeficiencia humana) <p><u>Otras causas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades autoinmunes (Fascitis eosinofílica) • Gestación

3. Incidencia y epidemiología

La AA es una enfermedad muy poco frecuente en los países desarrollados occidentales. La incidencia era sobre-estimada en los primeros estudios epidemiológicos debido a la falta de criterios diagnósticos estrictos para la inclusión de pacientes (Böttiger y Westerholm, 1972; Davies y Walker, 1986). En 1987, el *International Agranulocytosis and Aplastic anaemia study group*, utilizando criterios

estrictos de diagnóstico, estimó la incidencia de la AA en 2,2/1.000.000 por año sobre una población que incluía 7 áreas de Europa e Israel (IAAAS, 1987). Otros estudios prospectivos realizados en el Reino Unido (Cartwright y col., 1988), Francia (Mary y col., 1990), España (Montané y col., 2008) y Brasil (Maluf y col., 2002) estimaron una incidencia inferior a 3/1.000.000 por año. Sin embargo, la incidencia de la AA muestra variabilidad geográfica, ya que en países asiáticos se observan valores 2-3 veces más elevados (Issaragrisil y col., 1991; Yang y col., 1991; Issaragrisil y col., 1999).

Algunos estudios describen una distribución bimodal en la incidencia de la AA con respecto a los grupos etarios, diferenciando fundamentalmente dos etapas de la vida con una mayor incidencia relativa cercana a 3,5/1.000.000 por año: pediátrico/ adulto joven (10-25 años) y ancianos (>60 años) (IAAAS, 1987; Mary y col., 1990; Montané y col., 2008, Marsh y col., 2009). Las medianas de edad al momento del diagnóstico muestran un amplio rango (10-42 años) en las diferentes series publicadas (Tabla 2).

Tabla 2: Distribución de edad y género en diferentes series de pacientes con AA

Edad (años)			Relación de géneros (M/F)	Pacientes con AA (N)	Referencia
Mediana	Media	Rango			
10,0	s.d.	1-28	24/26: 0,9	50	El Mahgoub y col., 2014
12,6	s.d.	1-59	34/33: 1,0	77	Dufour y col., 2004; 2005
16,0	s.d.	1-72	57/43: 1,3	100	Bacigalupo y col., 2000
22,0	s.d.	1-80	51/58: 0,9	109	Song y col., 2008
30,0	s.d.	9-79	18/20: 0,9	38	Heuser y col., 2014
30,0	s.d.	7-70	38/31: 1,2	69	Mikhailova y col., 1996
31,0	s.d.	16-66	15/17: 0,9	32	Wanachiwanawin y col., 2006
34,0	s.d.	14-84	25/16: 1,6	41	De Latour y col., 2010
35,0	s.d.	15-69	21/16: 1,3	37	Du y col., 2013
37,0	s.d.	5-79	51/40: 1,3	91	Calado y col., 2007
42,0	s.d.	18-76	28/35: 0,8	63	Kordasti y col., 2012
s.d.	47,1	4-79	s.d.	77	Serio y col., 2011
s.d.	s.d.	12-92	65/75: 0,9	140	Sugimori y col., 2007
s.d.	s.d.	10-79	13/15: 0,9	28	Solomou y col., 2006
s.d.	s.d.	12-81	33/35: 0,9	68	Ball y col., 1998
s.d.	s.d.	13-52	9/11: 0,8	20	Solomou y col., 2007

s.d.: sin datos; M: masculino; F: femenino; N: número de pacientes.

En cuanto a la influencia del género, la mayoría de los trabajos concluyen que la enfermedad aparece de forma similar en ambos géneros (Heimpel, 2000). Sin embargo, otros estudios contradictorios estiman una incidencia mayor en mujeres que en hombres (Kaufman y col., 1991) y *viceversa* (Gordon Smith, 1989; Issaragrisil y

col., 1991). En la Tabla 2 se muestra la relación de géneros al diagnóstico en diferentes series publicadas de pacientes con AA.

La variabilidad en la incidencia de AA en distintas poblaciones y/o los resultados dispares con respecto a la edad y relación de géneros podrían reflejar diferencias en cuanto a la exposición a factores etiológicos (incluyendo virus, drogas y químicos), el *background* genético y el diseño de los estudios epidemiológicos. Los criterios de diagnóstico e inclusión/ exclusión en la selección de los pacientes y el tamaño muestral, inferior a 80 pacientes en la mayoría de las series publicadas (Tabla 2), son factores claves que podrían afectar la descripción epidemiológica de la enfermedad.

4. Diagnóstico

Como se introdujo anteriormente, los pacientes con AA son diagnosticados y clasificados, en cuanto a la severidad de la enfermedad, acorde a los criterios definidos por Camitta y col. (Camitta y col., 1975), el *International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study group* (IAAAS, 1987) y Bacigalupo y col. (Bacigalupo y col., 1988).

De acuerdo al IAAAS, para la confirmación del diagnóstico de AA deben cumplirse, al menos, dos de los siguientes criterios en SP: 1) nivel de hemoglobina ≤ 10 g/dL o hematocrito $\leq 30\%$, 2) recuento de plaquetas $\leq 50000/\mu\text{L}$ y 3) recuento de glóbulos blancos $\leq 3500/\mu\text{L}$ o recuento de neutrófilos $\leq 1500/\mu\text{L}$. En cuanto a los hallazgos en la MO debe observarse: a) disminución en la celularidad con ausencia/ depleción de las series hematopoyéticas o celularidad normal debido a una hiperplasia eritroide focal con depleción de granulocitos y megacariocitos, y b) ausencia de fibrosis significativa o infiltración neoplásica (IAAAS, 1987).

La AA puede clasificarse como moderada, severa o muy severa, de acuerdo a Camitta y col. y Bacigalupo y col., según el cuadro clínico presentado al diagnóstico. Los pacientes clasificados como AA severa deben cumplir al menos dos de los siguientes criterios en SP: 1) recuento de neutrófilos $< 500/\mu\text{L}$, 2) recuento de plaquetas $< 20000/\mu\text{L}$, y 3) porcentaje de reticulocitos $< 1\%$ (corregido por el hematocrito). Además, deben presentar hipoplasia medular marcada ($< 25\%$ de celularidad normal) o hipoplasia moderada (25%-50% de celularidad normal con $< 30\%$ de células hematopoyéticas), determinada a partir de una biopsia de MO (Camitta y col., 1975). Según Bacigalupo y col., la clasificación de AA muy severa se le asigna a los pacientes con AA severa que presentan recuentos de neutrófilos $< 200/\mu\text{L}$ (Bacigalupo y col., 1988). Los pacientes con un cuadro clínico moderado son aquellos que cumplen

los criterios diagnósticos de la AA pero no manifiestan los criterios de AA severa. En la Tabla 3 se resumen los criterios de diagnóstico y de severidad de la enfermedad.

Tabla 3: Criterios diagnósticos y de severidad de la AA

	AA moderada*	AA severa*	AA muy severa[#]
Serie eritroide	Hemoglobina <10 g/dL	Reticulocitos <1%	Reticulocitos <1%
Recuento de neutrófilos	<1500/ μ L	<500/ μ L	<200/ μ L
Recuento de plaquetas	<50000/ μ L	<20000/ μ L	<20000/ μ L
Celularidad medular	Disminuida	<25%	<25%

* Los pacientes deben cumplir al menos 2 de los 3 criterios en sangre periférica (SP).

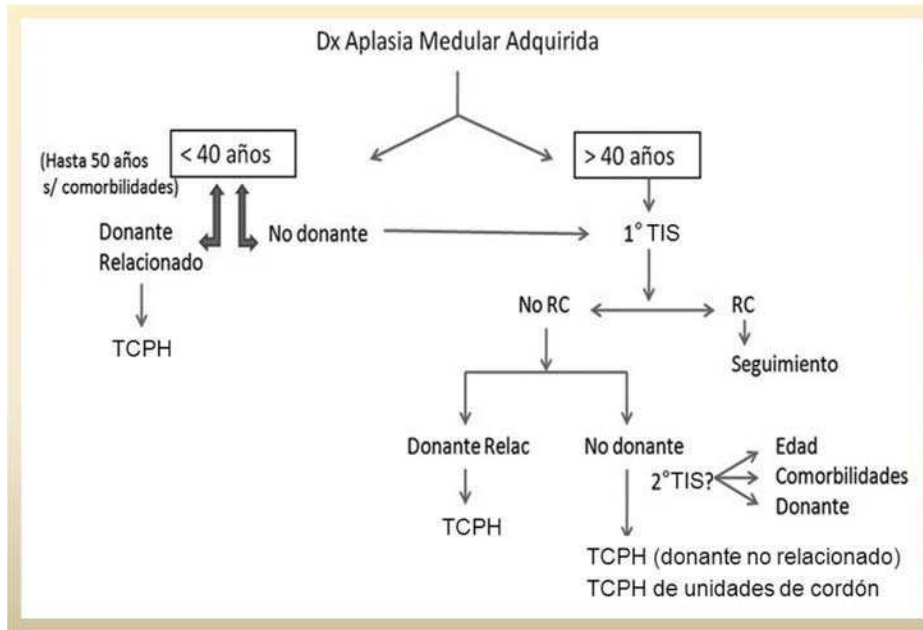
[#] Los pacientes deben cumplir, dentro de los 2 criterios en SP, un recuento de neutrófilos <200/ μ L.

La confirmación del diagnóstico de AA requiere: 1) excluir otras posibles causas de pancitopenia con hipocelularidad medular, 2) excluir la posibilidad de una falla medular congénita, 3) documentar o excluir la presencia de un clon citogenético anormal y/o un clon Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) (Marsh y col., 2009) (ver Introducción sección 8).

5. Tratamiento

El proceso hematopoyético en los pacientes con AA se puede restaurar mediante diferentes opciones de tratamientos: terapias inmunosupresoras (TIS) – principalmente basadas en la combinación de globulina anti-timocítica (GAT) y ciclosporina (CsA) – y/o el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH). La elección entre estos dos tratamientos se basa, principalmente, en la severidad de la enfermedad y en la edad del paciente. La sobrevida global a largo plazo es comparable entre los dos tratamientos, siendo la elección de preferencia el TCPH, ya que es la única opción curativa (Scheinberg y col., 2006; Marsh y col., 2009; Scheinberg y col., 2011; Scheinberg y Young, 2012). Sin embargo, la mayoría de los pacientes no son candidatos adecuados para un TCPH como tratamiento de primera línea. Esto se debe a diversos factores, siendo los más importantes: la falta de un donante relacionado compatible, el tiempo de espera para identificar a un donante no emparentado apropiado, la edad, las comorbilidades y los recursos para acceder al trasplante (Ballen y col., 2012; Granget y col., 2014). Por lo tanto, las TIS son el enfoque terapéutico más comúnmente utilizado como tratamiento inicial en los pacientes con AA. Las principales recomendaciones y el algoritmo para el tratamiento específico de la AA se resumen en la Figura 1.

Figura 1: Algoritmo de tratamiento de la AA



Adaptado de Marsh y col., 2009

Para el tratamiento específico de la AA se recomienda un enfoque multidisciplinario. Las opciones terapéuticas disponibles incluyen: la terapia inmunosupresora (TIS) y el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH). La elección entre estos dos tratamientos se basa principalmente en la severidad del cuadro clínico presentado y en la edad del paciente. El TCPH de donante relacionado está indicado como tratamiento de primera línea en los pacientes pediátricos o adultos hasta 50 años, con ausencia de comorbilidades, y que cuenten con un donante histo-idéntico compatible. Las TIS se recomiendan como tratamiento de primera línea en los pacientes sin indicación de TCPH o que no cuentan con un donante histo-idéntico compatible.

5.1. Terapias inmunosupresoras

La TIS estandarizada actual para el tratamiento de la AA utiliza GAT, CsA y metilprednisona, en conjunto. Alrededor del 70% de los pacientes alcanzan una respuesta hematológica luego de 6 meses de haber iniciado una terapia combinada de GAT y CsA, logrando una muy buena sobrevida global, cuyos valores se encuentran entre 75-85% a 5 años (Marsh y col., 2009; Scheinberg y col., 2011). Además, alrededor de un 30% de los pacientes que no responden a la TIS inicial muestran una mejoría hematológica con independencia transfusional en un segundo ciclo del tratamiento (Scheinberg y col., 2006). Sin embargo, aproximadamente una tercera parte de los pacientes que responden a la TIS recaen o son dependientes de la administración de CsA para mantener recuentos hematológicos adecuados. La administración sostenida de CsA puede retrasar las recaídas y, con dosis muy bajas, los pacientes alcanzan una condición estable (Scheinberg y Young, 2012). Las TIS se recomiendan como tratamiento de primera línea en los pacientes sin indicación de

TCPH (ver Introducción sección 5.2) o que no cuentan con un donante histo-idéntico compatible (Scheinberg y col., 2006; Marsh y col., 2009; Scheinberg y col., 2011; Scheinberg y Young, 2012).

La respuesta completa (RC) a la TIS se define como: nivel de hemoglobina normal acorde a la edad, recuento de neutrófilos $>1500/\mu\text{L}$ y recuento de plaquetas $>100000/\mu\text{L}$. En pacientes con AA severa y muy severa, la respuesta parcial (RP) se define como: nivel de hemoglobina $>8,0$ g/dL, recuento de neutrófilos $>500/\mu\text{L}$, recuento de plaquetas $>20000/\mu\text{L}$ e independencia transfusional. Mientras que, en pacientes con AA moderada, la RP se define como: nivel de hemoglobina $>8,0$ g/dL, recuento de neutrófilos $>1000/\mu\text{L}$ y recuento de plaquetas $>30000/\mu\text{L}$ (Yoshida y col., 2011).

Luego de la utilización de TIS, los pacientes con AA deben ser monitoreados cuidadosamente para detectar una potencial recaída; así como también, la posibilidad de progresión a otras enfermedades hematológicas clonales como los Síndromes Mielodisplásicos (SMD)/ Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y/o la HPN (ver Introducción sección 8).

5.2. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

5.2.1. TCPH con donante relacionado

En AA, el TCPH con donante relacionado presenta una muy buena sobrevida global a 5 años, alcanzando valores de 80-90% en pacientes <20 años, 70-75% en pacientes entre 20 y 40 años, y alrededor de un 50% para los pacientes >40 años (Scheinberg y Young, 2012). El TCPH con donante relacionado es el tratamiento de elección inicial para los pacientes recién diagnosticados que presenten: 1) un cuadro clínico de AA severa o muy severa, 2) edad pediátrica o adultos <40 años (existen controversias sobre el límite máximo de edad para el trasplante y podrían incluirse en este grupo los pacientes hasta 50 años con ausencia de comorbilidades), y 3) un donante histo-idéntico compatible (Figura 1). La correlación entre la mayor edad con el riesgo de la enfermedad injerto contra huésped y la significativa morbilidad y mortalidad siguen afectando la decisión de realizar un TCPH frente a la TIS como tratamiento inicial en pacientes con AA adultos (Marsh y col., 2009; Scheinberg y Young, 2012).

5.2.2. TCPH con donante no relacionado

Hasta el año 1990, la sobrevida a largo plazo de los pacientes con AA sometidos a un TCPH con donante no emparentado se encontraba alrededor de sólo un 30%, con una alta incidencia de rechazo del injerto, de enfermedad de injerto contra huésped y de infecciones severas (Passweg y col., 2006). En los últimos años, la sobrevida ha mejorado significativamente debido a diversos factores, principalmente, a la selección más estricta de los posibles donantes, facilitado por los estudios moleculares de alta resolución en la tipificación *Human Leukocyte Antigen* (HLA), y la aplicación de regímenes de acondicionamiento con menor nivel de toxicidad y mayor eficiencia. Sin embargo, la experiencia de diversos estudios indica que los resultados obtenidos en los TCPH con donante no relacionado en AA no son tan favorables como aquellos obtenidos con donante relacionado. La sobrevida global es muy variable, dependiendo de diversos factores, alcanzando valores de 42% a 94% en 3-5 años (Marsh y col., 2009; Scheinberg y Young, 2012). El TCPH con donante no relacionado puede ser considerado cuando los pacientes presentan: 1) un cuadro clínico de AA severa o muy severa, 2) edad <50 años (dependiendo de las comorbilidades), 3) ausencia de respuesta a un primer curso de TIS combinada de GAT y CsA, y 4) un donante no relacionado compatible (Marsh y col., 2009; Scheinberg y Young, 2012) (Figura 1).

6. Fisiopatología

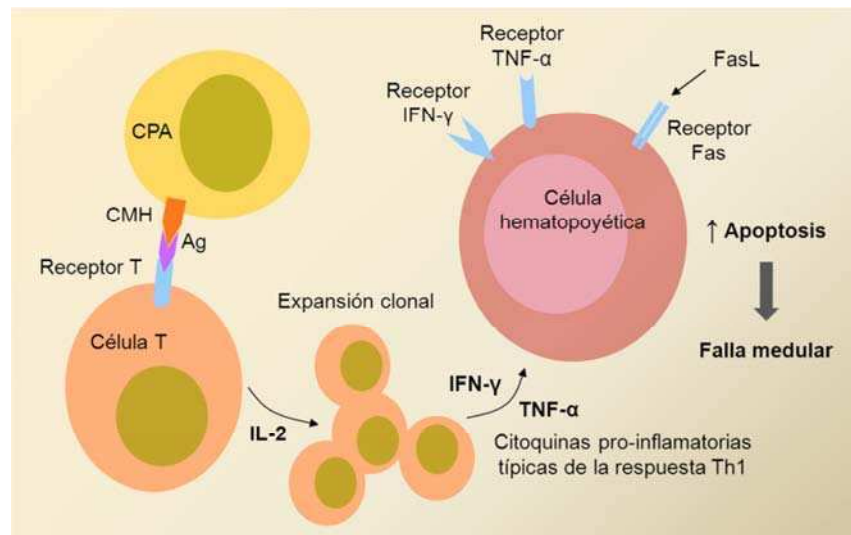
Los mecanismos patogénicos de la AA involucran a un desorden autoinmune que contribuye a la supresión de la hematopoyesis. Las primeras inferencias clínicas se realizaron en la década del 70' cuando Mathé y col. observaron una inesperada mejoría en la pancitopenia de pacientes con AA que habían rechazado un TCPH. Esta recuperación fue atribuida al régimen de acondicionamiento inmunosupresor que habían recibido estos pacientes (Mathé y col., 1970). Sin embargo, la principal evidencia clínica de la fisiopatología inmune subyacente en esta enfermedad es la capacidad de respuesta de los pacientes con AA, tanto en los casos idiopáticos como en los secundarios, a las TIS (Bacigalupo y col., 2000; Rosenfeld y col., 2003; Scheinberg y col., 2006; Locasciulli y col., 2007; Scheinberg y col., 2011; Pulsipher y col., 2011). La falta de respuesta o *refractoriedad* de algunos pacientes a las TIS podría ser interpretada como la existencia, en estos casos, de una fisiopatología no inmune alternativa. Sin embargo, esta *refractoriedad* también podría ser consistente con un cuadro de depleción medular muy severo o con la participación de mecanismos inmunes no susceptibles a los tratamientos aplicados. La desregulación de la

inmunidad celular y la producción anormal de citoquinas son los mecanismos que contribuyen a la falla medular y juegan un rol crucial en la fisiopatología de la AA.

6.1. Modelo de destrucción inmune de la hematopoyesis

Los datos de laboratorio obtenidos durante las últimas dos décadas implican una destrucción inmune subyacente de las *stem cells* y de las células progenitoras hematopoyéticas. Los principales mecanismos inmunes efectores de supresión de la hematopoyesis en la AA son: los linfocitos T CD4+ colaboradores (Th: T *helper*) 1, los linfocitos T CD8+ citotóxicos (Tc), la producción de citoquinas tales como Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α : *Tumor necrosis factor-alpha*) e Interferón- γ (IFN- γ : *Interferon-gamma*), y la apoptosis inducida por el sistema Fas/Fas ligando (Fas/FasL) (Young y Maciejewski, 1997; Young, 2000; Young, 2006). Una población de células T activadas, actuando localmente en la MO, induciría un aumento de las respuestas apoptóticas en los precursores hematopoyéticos. Las citoquinas producidas, y otros factores inducidos por ellas, podrían causar la muerte celular mediada por Fas/FasL y la activación de vías intracelulares que conducen al arresto del ciclo celular, contribuyendo a la falla medular (Figura 2).

Figura 2: Modelo de destrucción inmune de la hematopoyesis



Adaptado de Young, 2000; 2006

Los antígenos son presentados a los linfocitos T por las células presentadoras de antígeno (CPA) en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) desencadenando la activación y proliferación de las células T. La promoción de células T CD4+ hacia una respuesta Th1 y la activación de células T citotóxicas CD8+ genera una producción incrementada de las citoquinas TNF- α e IFN- γ . El aumento en la producción de Interleuquina (IL)-2 conduce a la expansión clonal de las células T. TNF- α e IFN- γ *up*-regulan al receptor Fas y su activación por el ligando de Fas (FasL) conduce a la apoptosis de las células diana o *target*. Estos eventos causan la muerte celular por apoptosis que finalmente contribuye a la falla medular.

6.1.1. Linfocitos Th1 y linfocitos Tc. Producción de IFN- γ y TNF- α

La respuesta inmune celular Th1 es fundamental para la defensa del huésped frente a patógenos intracelulares. La citoquina clave necesaria para inducir la diferenciación de las células Th1 es la Interleuquina (IL)-12. Además, la presencia de IFN- γ también desempeña un rol importante. Estas citoquinas promueven la activación del factor de transcripción "regulador maestro" T-bet de las células Th1 en un proceso complejo. La actividad de T-bet produce una retroalimentación positiva debido a que causa una mayor producción de IFN- γ que, a su vez, produce mayor expresión de T-bet, amplificando la diferenciación Th1. Estas células producen altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente IFN- γ , además de TNF- α e IL-2, las cuales coordinan la activación de macrófagos (Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Cosmi y col., 2013) (Figura 3).

La respuesta Th1 favorece el desarrollo de una respuesta Tc concomitante, la cual también juega un rol crítico en la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares, principalmente virus. Los linfocitos Tc también ejercen su respuesta efectora produciendo las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α , y causando citotoxicidad de las células infectadas mediante diferentes mecanismos de inducción de la apoptosis: secretor (perforinas/ granzimas) y no secretor (sistema Fas/FasL) (Ashton-Rickardt, 2005; Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Cosmi y col., 2013).

Además de sus funciones de protección frente a la invasión de patógenos intracelulares, los linfocitos Th1 también contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes específicas de órgano y de trastornos inflamatorios crónicos (Peng, 2006; Hirahara y col., 2013). En AA, los primeros experimentos de co-cultivo evidenciaron la participación de un mecanismo patogénico mediado por células T. La adición de linfocitos de pacientes con AA inhibía la hematopoyesis *in vitro* de MO normales (Zoumbos y col., 1985). Mientras que, la remoción de linfocitos de las muestras de MO de pacientes mejoraba el número de colonias en estos cultivos (Young, 1995; Young y Maciejewski, 1997). Las células efectoras fueron identificadas por su inmunofenotipo como células Tc activadas, presentes tanto en circulación en la SP como en la MO de los pacientes con AA, con incrementada producción de citoquinas típicas de la respuesta inmune celular Th1, especialmente las citoquinas TNF- α e INF- γ (Maciejewski y col., 1994; Kook y col., 2001; Young, 2006). Diferentes estudios demostraron, mediante análisis por citometría de flujo, una sobre-expresión intracitoplasmática de estas citoquinas pro-inflamatorias en linfocitos CD4+ y CD8+, circulantes y medulares, de pacientes con AA (Dufour y col., 2001; Sloand y col.,

2002a; Dubey y col., 2005). Además, el plasma medular (Dubey y col., 2005) y el sobrenadante de cultivos de MO sin estimular (Dufour y col., 2001) de pacientes con esta patología presentan altos niveles de TNF- α e IFN- γ .

Las citoquinas TNF- α e IFN- γ son inhibidores potentes de la hematopoyesis y pueden inducir la expresión del receptor Fas y/o activar sus receptores específicos en las células hematopoyéticas *targets* impulsando vías intracelulares inhibitorias del ciclo celular (Maciejewski y col., 1995a; Selleri y col., 1996; Nagata, 1997). Los pacientes con AA presentan una reducción marcada en el porcentaje de células CD34+ en MO, acompañada de una tasa de apoptosis incrementada y una *up*-regulación del receptor Fas (Maciejewski y col., 1995b; Philpott y col., 1995; Callera y Falcão, 1997; Killick y col., 2000; Ismail y col., 2001).

6.1.2. Balance Th1/Th2

La respuesta inmune Th2 confiere protección contra parásitos helmintos, pero también puede promover respuestas inflamatorias crónicas y agudas contra una gran variedad de alérgenos. Las células Th2, inducidas por la sobre-expresión de su factor de transcripción "regulador maestro" GATA-3, cumplen una función destacada en los tejidos periféricos, debido a su capacidad para secretar principalmente la citoquina IL-4, así como también IL-5 e IL-13. Estas citoquinas son capaces de activar a eosinófilos y mastocitos, células que participan en la respuesta inmune antiparasitaria y en el desarrollo de los procesos alérgicos (Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Cosmi y col., 2013) (Figura 3).

Las citoquinas regulan la diferenciación de las células T CD4+ hacia células Th1 productoras de citoquinas que inhiben la hematopoyesis, principalmente IFN- γ , y células Th2 que producen IL-4. La regulación transcripcional en este proceso de diferenciación es crítica, existiendo un balance entre los factores de transcripción responsables: T-bet y GATA-3, respectivamente (Rengarajan y col., 2000; Szabo y col., 2002; Peng, 2006; Pai y col., 2008). La alteración del balance entre las respuestas Th1 y Th2 tendría importancia en la patogénesis de la AA. Diversos trabajos demostraron una polarización de la respuesta inmune hacia Th1, en los pacientes al diagnóstico y refractarios a la TIS, evaluada mediante la relación de las citoquinas producidas IFN- γ /IL-4 (Tsuda y Yamasaki, 2000; Giannakoulas y col., 2004; Li y col., 2010; Chen H y col., 2014). La respuesta Th1 también persiste en los pacientes en remisión, aunque este efecto es compensado por el aumento de la producción de IL-4 (Giannakoulas y col., 2004). Asimismo, en la mayoría de los pacientes con AA, se encontraron niveles aumentados de T-bet, tanto a nivel proteico

(Solomou y col., 2006) como de expresión génica (Du y col., 2013; Shan y col., 2013; Chen H y col., 2014); así como también, una disminución en los niveles de expresión génica de GATA-3 (Chen H y col., 2014). Estos resultados indicarían que las células T CD4+ estarían polarizadas hacia una respuesta Th1. Sin embargo, también se ha documentado un aumento significativo del *subset* celular Th2 (en adición a Th1) en los pacientes con AA, observando una correlación entre esta expansión de linfocitos Th2 y la severidad de la enfermedad (Kordasti y col., 2012).

6.2. Otras vías vinculadas a la patogénesis

6.2.1. Linfocitos Th17

En los últimos años fue identificado un nuevo *subset* de células T CD4+: los linfocitos Th17, que confieren inmunidad frente a infecciones de patógenos extracelulares. Un factor determinante en el desarrollo de las células Th17 es el microambiente local de citoquinas. La diferenciación de este linaje celular puede ser inducida en presencia del Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β : *transforming growth factor-beta*) y la IL-6; mientras que, la IL-23 contribuye a la expansión de estas células una vez diferenciadas. El *receptor retinoic acid-related orphan receptor γ t* (ROR γ t) es el factor de transcripción clave para la diferenciación del linaje Th17. Estos linfocitos producen IL-17 (principalmente IL-17A e IL-17F) e IL-22, coordinando, a su vez, la inflamación del tejido al inducir la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-6 y TNF- α , de diversas quemoquinas y de metaloproteasas de la matriz, para permitir la infiltración y destrucción tisular (Ivanov y col., 2006; Bettelli y col., 2007; Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Cosmi y col., 2013) (Figura 3).

Aunque las células Th17 juegan un papel importante en la defensa del huésped, también se las describe como uno de los principales mediadores en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus y asma, entre otras (Tesmer y col., 2008); así como también, de algunos desórdenes hematológicos (Kordasti y col., 2009a; Kordasti y col., 2009b; Wu y col., 2009). En AA, algunos autores observaron un aumento en la proporción de linfocitos Th17, tanto en SP como en MO, en los pacientes al diagnóstico (de Latour y col., 2010; Du y col., 2013). Otros trabajos restringen este hallazgo sólo a los casos de AA severa (Kordasti y col., 2012). Además, el aumento en el número de células Th17 se acompaña de un incremento en los niveles de expresión del factor de transcripción ROR γ t (Du y col., 2013). Aunque las citoquinas miembros de la familia IL-17 (IL-17 A-F) son en sí mismas inhibidores de la proliferación de células hematopoyéticas

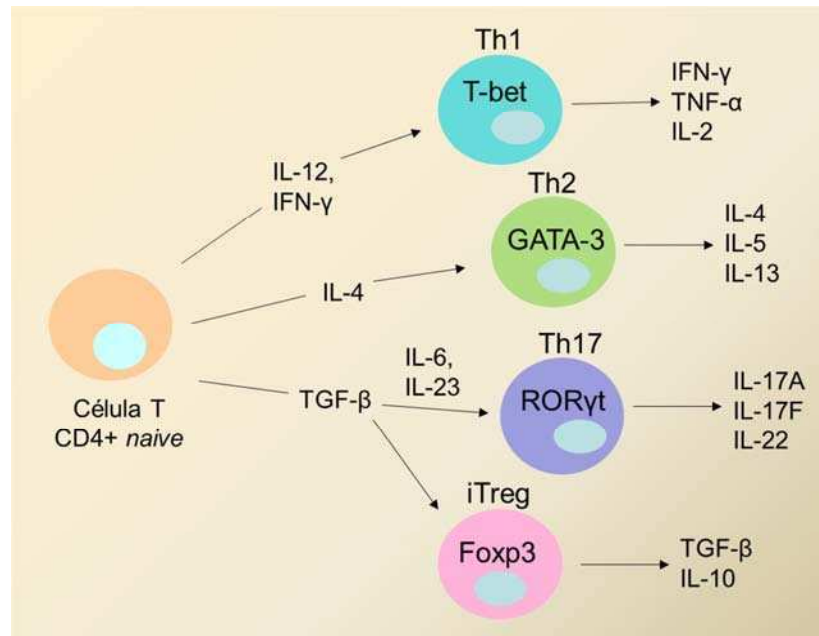
(Broxmeyer y col., 2006), el papel potencial en la fisiopatología de la AA aún no está completamente elucidado. Algunos trabajos muestran que tanto la expresión génica como plasmática de IL-17 estaría elevada en células mononucleares de MO y SP de los pacientes, acompañada por una alta producción de IL-6 (Gu y col., 2008); mientras que, otros estudios no observan este incremento (Feng y col., 2011).

6.2.2. Linfocitos T regulatorios

Los linfocitos T regulatorios (Treg) son indispensables para el mantenimiento de la homeostasis inmune, ejerciendo funciones inmunosupresoras que contrarrestan las respuestas efectoras. Este *subset* celular también juega un rol crucial en la auto-tolerancia inmunológica, controlando la autoinmunidad mediante la supresión de las células T auto-reactivas. Las células Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción *forkhead box protein 3* (Foxp3), siendo crítico en la determinación y el mantenimiento de su programa funcional. Estas células Treg CD4⁺ Foxp3⁺ se clasifican en dos grandes grupos que comparten propiedades funcionales: los linfocitos Treg naturales (nTreg) y los linfocitos Treg inducibles a nivel periférico (iTreg). Los linfocitos nTreg CD4⁺ Foxp3⁺ derivan del timo y expresan constitutivamente el factor de transcripción Foxp3 (Hori y col., 2003; Fontenot y col., 2005). A nivel periférico, Foxp3 puede ser inducido en células T CD4⁺ Foxp3⁻ promoviendo el *subset* de linfocitos iTreg en presencia de la citoquina TGF- β (Chen y col., 2003; Fantini y col., 2004; Fu y col., 2004; Zheng y col., 2004). Además, se ha demostrado que TGF- β también es importante para el mantenimiento de las células nTreg después de emigrar del timo (Marie y col., 2005). Los linfocitos Treg presentan mecanismos de acción inhibitorios que incluyen contacto celular y producción de citoquinas inhibitorias como TGF- β e IL-10 (Zheng y col., 2004; Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Cosmi y col., 2013) (Figura 3).

Tanto los defectos funcionales como la disminución relativa de los linfocitos Treg contribuyen al desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes (Grant y col., 2015; Ohl y Tenbrock, 2015). Los estudios realizados en AA evidencian una disminución en el número de las células Treg, tanto en muestras de SP como de MO de los pacientes (Solomou y col., 2007; de Latour y col., 2010; Kordasti y col., 2012; Shi y col., 2012). Además, también se observa una disminución en la capacidad del potencial migratorio de los linfocitos Treg de SP, lo cual podría contribuir a la inmunosupresión debilitada observada en los pacientes con AA a nivel de la MO (Shi y col., 2012).

Figura 3: Diferenciación de las células T CD4+ hacia los linajes Th1, Th2, Th17 e iTreg



Adaptado de Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Cosmi y col., 2013

Las células T CD4+ vírgenes o *naïves*, al encontrarse con antígenos extraños presentados por las células presentadoras de antígenos, pueden diferenciarse hacia los linajes Th1, Th2, Th17 e iTreg (además de hacia células T foliculares y otras células Th las cuales no se muestran en el esquema). Estos programas de diferenciación son controlados por citoquinas que producen las células de la inmunidad innata. La IL-12 e IFN- γ son importantes para la diferenciación de células Th1, e IL-4 es crucial para la diferenciación de células Th2. TGF- β junto con la IL-6 e IL-23 inducen la diferenciación y expansión de células Th17; mientras que la diferenciación de iTreg es inducida por TGF- β en ausencia de IL-6. Los factores de transcripción específicos que dirigen el programa de diferenciación de cada *subset* de células Th son: T-bet para las células Th1, GATA-3 para las células Th2, ROR γ t para las células Th17 y, para las células iTreg, Foxp3.

6.2.3. Relación entre células Th17, Th1, Th2 y Treg

El desarrollo de las células Th17 e iTreg muestran una superposición debido a que ambas requieren de la señalización vía TGF- β para inducir su diferenciación. Los factores de transcripción específicos de linaje ROR γ t y Foxp3 son co-expresados temprana y transitoriamente en estas células. La expresión de estos factores se resuelve, hacia uno u otro linaje, como consecuencia de la señalización coordinada de factores adicionales que favorecen Th17 frente a iTreg, o *viceversa*. La modulación inducida por TGF- β durante las primeras etapas de la diferenciación celular desempeña un papel central en la determinación del destino celular Th17-iTreg (Bettelli y col., 2006; Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Basu y col., 2013; Cosmi y col., 2013; Geginat y col., 2014).

En AA, Rizzo y col., describieron una reducción significativa en los niveles de TGF- β 1 en el suero de los pacientes, tanto *in vivo* como *in vitro* (Rizzo y col., 1999). Y, además, encontraron una correlación entre la respuesta al tratamiento y el aumento de los niveles séricos de TGF- β 1 (Rizzo y col., 1999). Este hallazgo podría estar relacionado principalmente con una disminución del número y/o función del *subset* de linfocitos Treg. Además, algunos trabajos describen una relación inversa entre células Th (Th1, Th2 y Th17) y Treg en pacientes con AA (de Latour y col., 2010; Kordasti y col., 2012). Si bien los estudios realizados son escasos, proporcionan evidencia de un rol importante de las respuestas mediadas por Th1, Th2 y Th17, asociada con una deficiencia de los linfocitos Treg, en el desarrollo y/o progresión de la AA.

7. Polimorfismos en genes de citoquinas y susceptibilidad

Como se explicó anteriormente, la AA es una patología que posee un alto componente autoinmune. La capacidad de discriminar entre antígenos propios y no propios es vital para el funcionamiento del sistema inmune como una defensa específica contra los microorganismos invasores. Una falla del sistema inmune a "tolerar" los tejidos propios puede dar lugar a estados patológicos autoinmunes. La inducción de la autoinmunidad involucra factores tanto genéticos como ambientales, los cuales pueden estar implicados en la iniciación y/o el desarrollo de la enfermedad (Sinha y col., 1990). La existencia de una predisposición genética fue reconocida en numerosos desórdenes autoinmunes. Los genes altamente polimórficos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) o del sistema HLA, y los genes que codifican citoquinas y receptores de citoquinas pueden influir tanto en la susceptibilidad y/o resistencia a enfermedades autoinmunes, incluyendo a los Síndromes de Falla Medular (SFM) adquiridos (ver Introducción sección 8) (Pociot y col., 1993; Wilson y col., 1994; Heward y Gough, 1997; D'Alfonso y col., 2000; Rood y col., 2000; Pulleyn y col., 2001; Waldron-Lynch y col., 2001; Sauntharajah y col., 2002; Gidvani y col., 2007).

Las citoquinas son mediadores muy importantes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria. Asimismo, estas moléculas juegan un rol crucial en la regulación de la hematopoyesis, en donde el balance entre la acción de factores estimulantes/mielosupresores es fundamental para la óptima producción de las diferentes líneas hematopoyéticas (Gersuk y col., 1998; Mundle y col., 1999; Deeg y col., 2000; Stifter y col., 2005; Marcondes y col., 2008; Navas y col., 2008; Chamuleau y col., 2009). Debido a la relevante participación de las citoquinas pro- y anti-inflamatorias en el sistema inmune y el proceso hematopoyético, la desregulación en su producción está involucrada en diversas enfermedades, incluyendo patologías autoinmunes e

inflamatorias, procesos neoplásicos y desórdenes hematológicos. Entre las citoquinas principalmente involucradas en los mecanismos fisiopatológicos de la AA y de otros SFM adquiridos, se encuentran TNF- α , IFN- γ , IL-6 y TGF- β 1. Los genes que codifican para estas citoquinas poseen polimorfismos asociados con la regulación de su expresión, los cuales podrían estar relacionados con susceptibilidad hacia una respuesta inmune alterada y una desregulación hematopoyética en los SFM adquiridos, incluyendo a la AA.

7.1. Genes de citoquinas: funciones y principales polimorfismos relacionados a susceptibilidad

7.1.1. TNF

El gen *TNF* (ubicación cromosómica: 6p21.33) codifica una citoquina pro-inflamatoria multifuncional, TNF- α , que pertenece a la super-familia TNF. Esta citoquina participa en la respuesta inmune innata y adaptativa frente a la infección de patógenos, siendo un mediador primario de la inflamación. El TNF- α es secretado principalmente por los macrófagos activados, aunque puede ser producida por muchos otros tipos celulares, como linfocitos T activados, células NK, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas y células endoteliales. Esta citoquina está implicada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, cumpliendo sus funciones a través de la unión a sus receptores. En los SFM adquiridos, la sobre-expresión de TNF- α está asociada con un aumento de los niveles de apoptosis de las células progenitoras y precursoras hematopoyéticas (Maciejewski y col., 1995a; Gersuk y col., 1998; Mundle y col., 1999; Marcondes y col., 2008; Navas y col., 2008). Además, esta citoquina ejerce una regulación negativa en la producción de eritropoyetina (EPO) endógena, inhibe *in vitro* la eritropoyesis estimulada por EPO o múltiples combinaciones de citoquinas, y suprime la formación de colonias (Maciejewski y col., 1995a; Rusten y col., 1995).

El gen *TNF* presenta numerosos polimorfismos, algunos de los cuales son funcionales. El Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) -308 G/A (rs1800629) es uno de los más ampliamente estudiados, se encuentra ubicado en la zona promotora del gen y está implicado en la expresión diferencial del mismo, afectando la unión de ciertos factores y reguladores de la transcripción. La presencia del alelo -308A se encuentra asociado a su mayor producción bajo ciertas condiciones experimentales. Por lo tanto, los genotipos A/A y G/A son los que se encuentran asociados con una alta expresión y el genotipo G/G con una baja expresión de *TNF*

(Kroeger y col., 1997). El alelo menos frecuente -308A fue asociado con susceptibilidad en diversas enfermedades que involucran un desorden autoinmune (Pociot y col., 1993; Wilson y col., 1994; Heward y Gough, 1997; Rood y col., 2000; Waldron-Lynch y col., 2001), incluyendo a los SFM (Gidvani y col., 2007; Powers y col., 2007; Bestach y col., 2011a; Bestach y col., 2011b; Lee y col., 2011; Serio y col., 2011).

7.1.2. *IFNG*

El gen *IFNG* (ubicación cromosómica: 12q15) codifica la proteína IFN- γ , el único miembro conocido de la familia de los interferones de tipo II. Esta citoquina proinflamatoria juega un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa contra las infecciones microbianas y virales, y exhibe efectos antitumorales. El IFN- γ es secretado principalmente por los linfocitos Th1 y Tc activados, las células NK activadas y las células presentadoras de antígenos, como los macrófagos y las células dendríticas. Esta citoquina ejerce su función mediante la transducción de señales por unión a su receptor y es un potente activador de los macrófagos y las células NK. Además, puede potenciar los efectos antivirales y antitumorales de los interferones de tipo I (IFN- α/β). Al igual que TNF- α , IFN- γ también ejerce un efecto supresor sobre el proceso hematopoyético, inhibiendo la proliferación y diferenciación de las células progenitoras mieloides y eritroides mediante la inducción de la apoptosis (Maciejewski y col., 1995a; Selleri y col., 1996; Dai y col., 1998; Joshi y col., 2011).

Uno de los principales polimorfismos estudiados del gen *IFNG* es el SNP +874 A/T (rs2430561) que se encuentra ubicado en el primer intrón y coincide con un sitio de unión del factor de transcripción *nuclear factor*- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (Heinemeyer y col., 1998). Debido a que el NF- $\kappa\beta$ induce la expresión del gen *IFNG*, este SNP podría tener consecuencias funcionales en la producción de esta citoquina. La unión del factor NF- $\kappa\beta$ es preferencial en presencia del alelo +874T, con lo cual, los genotipos T/T, T/A y A/A se asocian con una producción alta, intermedia y baja de IFN- γ , respectivamente (Pravica y col., 1999; Pravica y col., 2000). Además, el SNP +874 A/T se encuentra ubicado contiguo al polimorfismo de repetición +875 CAn (rs587776821) hacia su extremo 5', presentando un fuerte desequilibrio de ligamiento entre el alelo +874T y el alelo 12 CA (Pravica y col., 2000). En este polimorfismo de repetición +875 CAn los distintos alelos difieren en el número de repeticiones presentes del dinucleótido CA. Si bien la secuencia de repeticiones CA podría tener en sí misma una función reguladora de la transcripción, la variante 12 CA se asocia con una mayor producción de IFN- γ principalmente como consecuencia de la fuerte asociación con el alelo +874T (Pravica

y col., 1999; Pravica y col., 2000). Las variantes +874T y 12 CA se encuentran sobre-representados en diversas patologías, incluyendo condiciones autoinmunes y de inflamación crónica (Jahromi y col., 2000; Khani-Hanjani y col., 2000; Lee y col., 2001; Fukutani y col., 2004), así como también en los SFM adquiridos (Dufour y col., 2004; Fermo y col., 2004; Gidvani y col., 2007; Serio y col., 2011).

7.1.3. *IL6*

El gen *IL6* (ubicación cromosómica: 7p15.3) codifica la glucoproteína IL-6, una citoquina pleiotrópica que regula múltiples procesos biológicos. Esta citoquina desempeña un papel importante en respuesta a una lesión o infección, está implicada en la respuesta inmune e inflamatoria y es un potente inductor de la respuesta de fase aguda. Además, la IL-6 es una citoquina multifuncional que afecta prácticamente a todos los sistemas orgánicos (nervioso, hepático y cardiovascular, entre otros) y, en particular al sistema inmunológico y la hematopoyesis. Es un factor esencial para la diferenciación y activación de los linfocitos T y B, es segregada por numerosos tipos celulares, como los macrófagos, las células T y B, las células endoteliales y los fibroblastos, y su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- α . Si bien la IL-6 estimula la hematopoyesis (Rodríguez y col., 2004), también ha sido implicada en los SFM (Gidvani y col., 2007; Pardanani y col., 2012), aunque su rol fisiopatológico aún no está completamente elucidado.

El gen *IL6* es altamente polimórfico en ambas regiones que flanquean a los extremos 5' y 3'. Uno de los polimorfismos más importantes es el SNP -174 G/C (rs1800795) que se encuentra *up-stream* de la región reguladora del gen *IL6* y afecta los niveles de expresión de esta citoquina. Este SNP se encuentra cerca de un elemento de respuesta a glucocorticoides, influenciando potencialmente la unión de un receptor de glucocorticoides y, por lo tanto, su capacidad para reprimir la activación transcripcional. El alelo -174C está asociado con una baja producción tanto *in vitro* como *in vivo*, identificándose los fenotipos: alta (G/G), intermedia (G/C) y baja producción de IL-6 (C/C) (Fishman y col., 1998). El SNP -174 G/C se encuentra asociado con susceptibilidad en diversas enfermedades con un componente autoinmune y/o inflamatorio (Vozarova y col., 2003; Hu y col., 2014; Durães y col., 2014; Li y col., 2014; Ururahy y col., 2014; Yang y col., 2014), y en algunos SFM (Gidvani y col., 2007; Wang y col., 2012).

7.1.4. *TGFB1*

El gen *TGFB1* (ubicación cromosómica: 19q13.2) codifica a la proteína TGF- β , siendo TGF- β 1 la isoforma principal expresada en el sistema inmune. Esta citoquina pleiotrópica y multifuncional modula la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la adhesión y la migración de diversos tipos de células, y contribuye a la regulación del sistema inmune y la hematopoyesis. La mayoría de los tipos celulares, incluyendo las células hematopoyéticas inmaduras, los linfocitos T y B activados, los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas y las plaquetas, producen TGF- β y/o son sensibles a sus efectos. Esta citoquina es secretada predominantemente como un complejo latente inactivo que consta de TGF- β maduro unido no covalentemente a un péptido asociado a la latencia (LAP: *latency-associated protein*), que previene la unión de TGF- β a su receptor específico. La liberación de TGF- β maduro de su asociación con LAP, mediante la acción de proteasas, es un paso esencial en la activación y la función de esta citoquina. TGF- β inhibe la diferenciación Th1, Th2 y Tc, y dependiendo del entorno de citoquinas, puede promover la diferenciación de células iTreg o de células pro-inflamatorias Th17 (Oh y Li, 2013). Además, esta citoquina se ha descrito como un importante regulador negativo de la hematopoyesis, siendo la inhibición más pronunciada en las células hematopoyéticas primitivas (Dybedal y Jacobsen, 1995; Polyak, 1996; Cheng y col., 2001).

Varios polimorfismos fueron descritos en el gen *TGFB1*, siendo los SNPs +869 C/T (rs1800470) y +915 G/C (rs1800471), ubicados en el primer exón del gen, los principalmente estudiados debido a su potencial rol en la producción diferencial de la citoquina. El cambio de C869T (codón 10) genera un cambio del residuo hidrofóbico Pro10Leu neutral localizado en el *core* hidrofóbico del péptido señal, de igual manera que el cambio G915C (codón 25): Arg25Pro. Estos cambios podrían alterar la estructura α -hélice de la región y, por lo tanto, su transporte a través del retículo endoplásmico. En consecuencia, los genotipos +869 codón 10: T/T, T/C y C/C; y +915 codón 25: G/G, G/C y C/C, se encontrarían asociados con la producción alta, intermedia y baja de TGF- β 1, respectivamente (Perrey y col., 1999). Las variantes polimórficas que determinan un fenotipo de alta producción de esta citoquina fueron asociadas con diversas enfermedades autoinmunes y con peor pronóstico luego de un TCPH o trasplante de órganos (Girrita y col., 2008; Söderberg y col., 2009). También se ha descrito una sobre-representación de estas variantes en algunos SFM adquiridos (Fermo y col., 2004; Powers y col., 2007; Serio y col., 2011).

8. Superposición clínica de la AA con otros Síndromes de Falla Medular

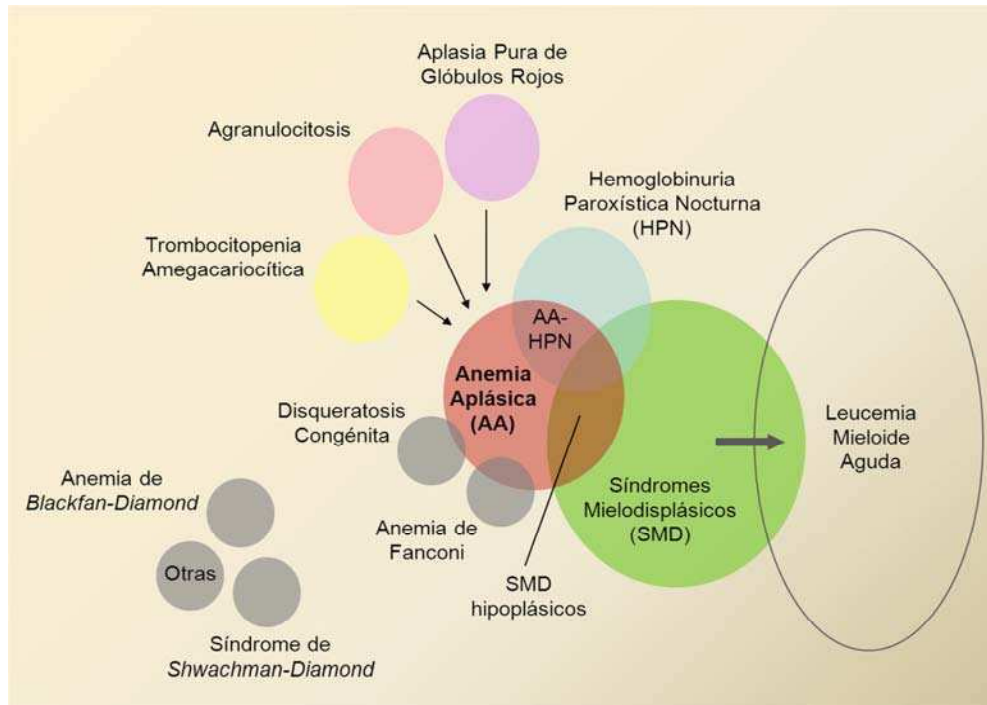
La AA forma parte de los Síndromes de Falla Medular (SFM), los cuales constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades hematológicas que se caracterizan por presentar deficiencias en la función hematopoyética. Como se definió anteriormente para la AA, en estas patologías las *stem cells* y las células progenitoras hematopoyéticas pierden, por algún mecanismo, su capacidad de auto-renovación y/o diferenciación hacia los elementos más maduros. Como consecuencia de la falla en esta función aparecen alteraciones cuanti y cualitativas en la MO y citopenias periféricas. Dependiendo a qué nivel de la hematopoyesis ocurra la falla pueden verse afectadas una o más líneas celulares. Los defectos a nivel de las *stem cells* pueden afectar las tres líneas hematopoyéticas (hematíes, leucocitos y plaquetas), y si éstos ocurren en un estadio de desarrollo más tardío de la hematopoyesis pueden verse afectadas dos o solo una línea celular en particular (Bagby y col., 2004; Marsh, 2005).

Los SFM se dividen en adquiridos y congénitos. Dentro de los desórdenes adquiridos, la AA, los SMD y la HPN son los que frecuentemente se asocian con falla medular multilínea. Los SMD y la HPN son las patologías que presentan las principales zonas de intersección clínica con la AA, indicando, no sólo la dificultad para establecer un diagnóstico diferencial entre ellas, sino también, que podrían compartir mecanismos patogénicos subyacentes (Figura 4). Por otro lado, se encuentran los SFM adquiridos que se asocian con falla medular de línea única, como la Aplasia Pura de Glóbulos Rojos, la Trombocitopenia Amegacariocítica adquirida y la Agranulocitosis o Neutropenia adquirida. Las fallas medulares que afectan una única línea pueden progresar hacia una AA tardíamente (Figura 4). La mayoría de estas patologías adquiridas son de etiología idiopática, aunque también se desarrollan casos de falla medular secundaria a la exposición a agentes tóxicos y/o biológicos (Bagby y col., 2004; Marsh, 2005).

Con respecto a los desórdenes congénitos, los que se asocian con falla medular multilínea son: la Anemia de Fanconi (AF) y la Disqueratosis Congénita. Mientras que, los que se asocian con falla medular de una única línea son: la Anemia de *Blackfan-Diamond*, el Síndrome de *Shwachman-Diamond*, la Neutropenia Congénita Severa (Síndrome de *Kostmann*) y la Neutropenia Cíclica, la Trombocitopenia Amegacariocítica Congénita, entre otros (Figura 4). En los últimos años, gracias al avance en el estudio de las bases genéticas y la patogénesis molecular de estos SFM congénitos se ha logrado identificar diversos *sets* de genes mutados. Las funciones biológicas conocidas que se ven afectadas por estas mutaciones y que están

implicadas en la etiopatogenia de estas enfermedades son: reparación del ADN (AF), biogénesis ribosomal (Anemia de *Blackfan-Diamond*, Síndrome de *Shwachman-Diamond*, Disqueratosis Congénita), mantenimiento telomérico (Disqueratosis Congénita), elastasa de neutrófilos (Neutropenia Congénita Severa y Neutropenia Cíclica), receptor de Trombopoyetina (Trombocitopenia Amegacariocítica Congénita) (Alter, 2007; Dokal y Vulliamy, 2010; Sakaguchi y col., 2013).

Figura 4: Superposición clínica de la AA con otros Síndromes de Falla Medular



Adaptado de Young, 2000; 2006

Diagrama que ilustra las relaciones clínicas y fisiopatológicas entre la AA y los demás Síndromes de Falla Medular (SFM) adquiridos y congénitos. Los círculos superpuestos muestran las principales zonas de intersección clínica de la AA con las otras patologías, indicando que podrían compartir mecanismos patogénicos subyacentes, principalmente con los SFM adquiridos. Además, estos solapamientos representan las principales dificultades en el diagnóstico diferencial de la AA.

La AF es uno de los SFM congénito más frecuente con una incidencia de 4-7/1.000.000 de nacidos vivos (Gulbis y col., 2010; Sakaguchi y col., 2013). El diagnóstico de estos pacientes se basa, principalmente, en el examen clínico y, debido a que se ven afectados genes vinculados a la reparación del ADN, la técnica de referencia es el ensayo de estrés clastogénico *in vitro*, a partir de muestras de SP, en donde se analizan roturas cromosómicas espontáneas e inducidas por el diepoxibutano (DEB) (2,2'-Bioxirane). El tratamiento de la AF es principalmente de soporte y la terapia con andrógenos frecuentemente induce respuestas significativas

en los pacientes pancitopénicos. El TCPH es la única opción para el establecimiento de la hematopoyesis normal, asociada con una alta morbimortalidad y la posibilidad de desarrollar tumores secundarios (Bagby y col., 2004; Shimamura y Alter, 2010). Los pacientes con AF no responden a las TIS, por lo tanto, es crucial el diagnóstico diferencial entre este desorden congénito y la AA adquirida, para que el enfoque terapéutico sea el adecuado.

En algunos casos, los SFM pueden profundizarse afectando más líneas hematopoyéticas y/o evolucionar hacia un componente SMD/LMA (Figura 4). En particular, la AA, además de presentar zonas de superposición clínica que dificultan el diagnóstico diferencial con los SMD y la HPN, podría, clínicamente, coexistir o evolucionar hacia estas enfermedades hematológicas clonales. La progresión clonal es una de las complicaciones más graves a largo plazo de la AA, la cual incluye la adquisición de anomalías cromosómicas y el consecuente desarrollo de SMD/LMA y/o la expansión de clones HPN.

8.1. SMD

8.1.1. Características generales

Los SMD comprenden un grupo heterogéneo de patologías hematológicas caracterizado por una hematopoyesis inefectiva que afecta, al menos, una de las líneas hematopoyéticas mieloides, lo cual resulta, al igual que en los restantes SFM, en la presencia de citopenia(s) en SP. Aproximadamente un 30% de los pacientes evolucionan a LMA con una pobre respuesta a la quimioterapia (Greenberg y col., 1997; Sanz y col., 1997; Belli y col., 2002; Belli y col., 2014). La mayoría de los pacientes fallecen debido a fallas de la MO más que de las complicaciones surgidas por la progresión leucémica (List y col., 2004; Greenberg y col., 2012).

Los SMD ocurren principalmente en ancianos, con un promedio de edad al momento del diagnóstico de 60-75 años, y menos del 10% de los pacientes son <50 años. También se observan en jóvenes e incluso en niños, aunque con menor prevalencia. La incidencia varía entre 4-13/100.000 por año en la población general. Sin embargo, la incidencia estimada se incrementa entre 20-50/100.000 por año en pacientes >60 años (Aul y col., 1998; Jaffe y col., 2001; Rollison y col., 2008; Swerdlow y col., 2008; Tefferi y Vardiman, 2009; Vardiman y col., 2009). Los SMD, al igual que los restantes SFM, pueden aparecer *de novo* o ser secundarios (SMDs) al uso de agentes antineoplásicos, al contacto con químicos o a la progresión clonal de un SFM pre-existente.

El diagnóstico de SMD es complejo y debe incluir una adecuada información clínica a fin de descartar otras posibles causas. El proceso incluye la evaluación de la MO y del frotis de SP en cuanto a su morfología y a sus valores absolutos y relativos, interpretada en el contexto del resultado del estudio citogenético (Greenberg y col., 2013). Los criterios diagnósticos mínimos se detallan en la Tabla 4. A fin de confirmar el diagnóstico se deben cumplir ambos pre-requisitos esenciales y al menos uno de los criterios decisivos. En el caso de no cumplirse los criterios decisivos y de presentar alguno de los co-criterios, el cuadro clínico es “altamente sugerente” de un SMD.

Tabla 4: Criterios diagnósticos para SMD

<p>A. Pre-requisitos esenciales</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Citopenia constante en al menos una de las líneas celulares: eritroide (Hb <11 g/dL), granulocítica (neutrófilos <1500/μL) o megacariocítica (plaquetas <100000/μL). 2. Exclusión de otras enfermedades, hematológicas o no, como causa primaria de la citopenia/displasia.
<p>B. Criterios decisivos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Displasia en al menos 10% de la celularidad medular, en al menos una de las líneas celulares eritroide, granulocítica y/o megacariocítica o >15% de sideroblastos en anillo. 2. Porcentaje de blastos en el aspirado medular entre 5-19%. 3. Anomalías cromosómicas recurrentes características de SMD (por citogenética o por <i>FISH</i>).
<p>C. Co-criterios (para pacientes que cumplen (A) y no (B) pero presentan características clínicas típicas de SMD)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fenotipo aberrante identificado por citometría de flujo en células precursoras eritroides y/o mieloides en MO. 2. Evidencia molecular de monoclonalidad por ensayo HUMARA, técnicas de “<i>microarrays</i>” o análisis de mutaciones puntuales (p. ej.: mutaciones en el gen <i>RAS</i>). 3. Capacidad de formación de colonias por parte de los progenitores de MO y/o SP marcada y persistentemente reducida.

Hb: nivel de hemoglobina; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

La MO es, generalmente, normo- o hiper-celular con alteraciones displásicas. La displasia puede involucrar una o todas las líneas hematopoyéticas mieloides, afectando el tamaño, la forma o la organización celular.

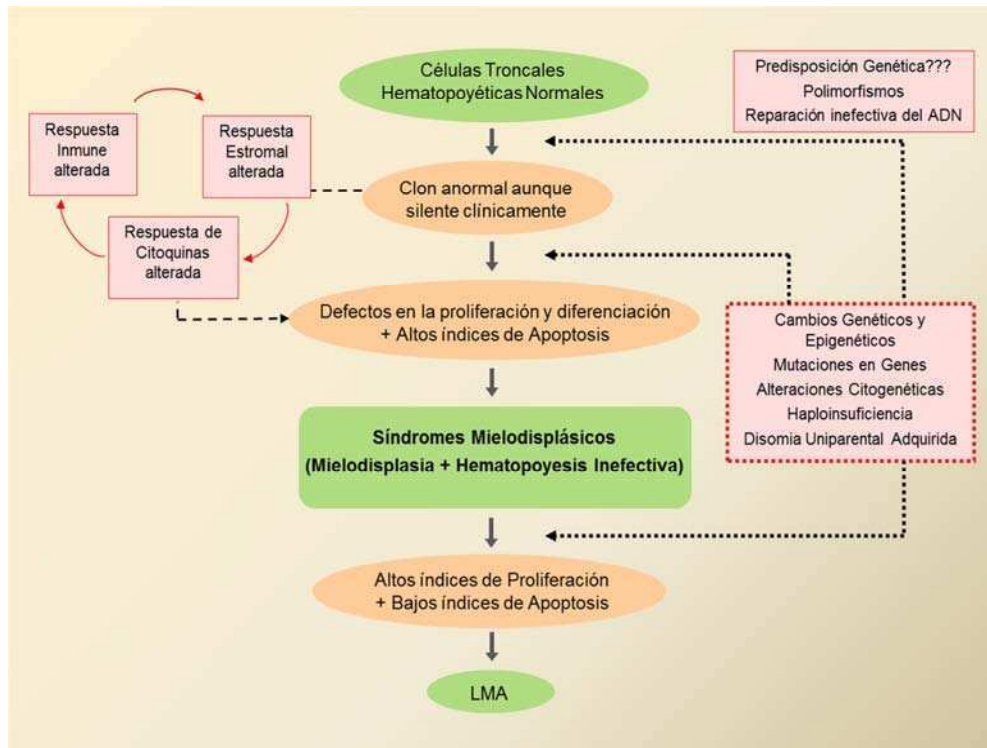
A nivel periférico, el 80-85% de los pacientes presentan anemia al diagnóstico, la cual suele ser frecuentemente macrocítica pero refractaria al tratamiento con folato y vitamina B12, o normocítica (Steensma y col., 2005), y el 50% posee niveles de hemoglobina inferiores a 10 g/dL. Aproximadamente el 40% de los pacientes son neutropénicos y la trombocitopenia inicial afecta al 30-45% de los casos. La presencia de neutropenia y/o trombocitopenia puede observarse, aún en ausencia de anemia, en

un cierto porcentaje de pacientes (List, 2002; Steensma y Bennett, 2006). En población Argentina, incluyendo el análisis de datos del Registro Argentino de SMD, el 89% de las mujeres y el 94% de los hombres presentan niveles de hemoglobina inferiores a 12 g/dL y 13 g/dL, respectivamente; el 58% recuentos plaquetarios inferiores a 150000/ μ L, y el 51% recuentos de neutrófilos inferiores a 1800/ μ L (Enrico y col., 2014). Además, las células diferenciadas terminales también poseen defectos funcionales: la actividad microbicida y mieloperoxidasa de los neutrófilos se encuentra disminuida (Heaney y Golde, 1999).

Alrededor del 40-50% de los pacientes presentan cariotipo alterado. Si bien el patrón de alteraciones citogenéticas es heterogéneo, no asociado a ninguna aberración en particular, se observa un predominio de pérdidas totales y parciales. Las alteraciones más frecuentes son: la pérdida del cromosoma Y, del(5q), -7/del(7q), +8 y del(20q) (Greenberg y col., 1997; Solé y col., 2005; Haase y col., 2007; Belli y col., 2011b; Greenberg y col., 2012; Schanz y col., 2012; Belli y col., 2013). La presencia de una alteración citogenética recurrente es un criterio de diagnóstico decisivo para los SMD (Valent y col., 2007) (Tabla 4).

Los mecanismos precisos que determinan la iniciación de los SMD *de novo* son, en la actualidad, desconocidos. La transformación clonal podría ocurrir a nivel de las células troncales precursoras. Estos eventos, sin manifestación clínica, podrían incluir tanto cambios genéticos como epigenéticos, reparación defectuosa del ADN que puede resultar en inestabilidad genómica de las células hematopoyéticas troncales (Sauntharajah y col., 2002; Tefferi y Vardiman, 2009). Un segundo paso, aún indefinido, podría conferir ventajas de crecimiento al clon neoplásico, el cual se expandiría resultando en una hematopoyesis clonal que se refleja en los hallazgos morfológicos y clínicos de los SMD. La proliferación celular inefectiva, que afecta tanto a la capacidad de auto-renovación como de diferenciación de las células troncales, se acompaña de una extensiva muerte celular por apoptosis (Cazzola y Malcovati, 2005; Tehrani y col., 2005). Esta observación, justificaría en parte, la presencia paradójica de una MO hiperclonal con citopenias periféricas (Kouides y Bennett, 1997). Finalmente, daños genéticos y epigenéticos posteriores podrían promover la evolución a LMA, modificando el comportamiento biológico, con incremento en la proliferación celular y disminución de los niveles de apoptosis (Sanz y col. 1997; Parker y col., 2000; Tefferi y Vardiman, 2009). En la Figura 5 se describen los posibles mecanismos involucrados en la iniciación y progresión de los SMD.

Figura 5: Modelo hipotético de inicio y progresión de los SMD



Adaptado de Sanz y col., 1997; Tefferi y Vardiman, 2009

La transformación clonal podría ocurrir a nivel de las células troncales precursoras, cuyo evento, sin manifestación clínica, podría incluir tanto cambios genéticos como epigenéticos, reparación defectuosa del ADN que puede resultar en inestabilidad genómica de las células hematopoyéticas. Luego, un segundo paso podría conferir ventajas de crecimiento al clon neoplásico, el cual se expandiría resultando en una hematopoyesis clonal. La proliferación celular inefectiva, que afecta tanto a la capacidad de auto-renovación como de diferenciación de las células troncales, se acompaña de una extensiva muerte celular por apoptosis. Finalmente, daños genéticos y epigenéticos posteriores podrían promover la evolución a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) con incremento en la proliferación celular y disminución de los niveles de apoptosis.

La fisiopatología de los SMD incluye múltiples y complejos mecanismos, muchos de los cuales aún no son completamente conocidos. Al igual que en AA, las evidencias clínicas y experimentales involucran en el desarrollo de los SMD el daño inmune de los precursores hematopoyéticos y los cambios en el microambiente medular. La activación inmune podría reflejar reacciones autoinmunes no deseadas contra las células precursoras hematopoyéticas normales, así como también una inmunovigilancia eficaz contra clones displásicos. Los pacientes con SMD presentan un incremento de células T efectoras con un perfil citotóxico y una disminución relativa de células Treg asociado con la supresión de la hematopoyesis (Chamuleau y col., 2009). Estas células citotóxicas se caracterizan por un aumento en la producción de citoquinas típicas de la respuesta inmune celular Th1, incluyendo TNF- α e IFN- γ . Además, estas citoquinas inducen una molécula inmuno-inhibitoria (B7H1) en los

blastos mielodisplásicos, confiriéndoles ventaja proliferativa (Kondo y col., 2010). La sobreproducción de TNF- α ha sido demostrada en el microambiente medular y se correlaciona, sobre todo en los estadios tempranos de los SMD, con la apoptosis de células troncales CD34+, supresión de la eritropoyesis y bajos niveles de hemoglobina (Musto y col., 1994; Stifter y col., 2005; Marcondes y col., 2008; Tsimberidou y col., 2008; Tsimberidou y col., 2009).

La evolución clínica es heterogénea variando desde una enfermedad estable por más de 10 años hasta una corta sobrevida de pocos meses debido a las complicaciones relacionadas a la presencia de citopenias o a la evolución leucémica. Por lo tanto, las opciones terapéuticas para los pacientes con SMD varían según los factores de riesgo individuales basados, entre otros parámetros, en el resultado del cariotipo. En los pacientes de bajo riesgo se prioriza la mejoría de las citopenias y de la calidad de vida, incluyendo el tratamiento de soporte, el uso de las TIS e inmunomoduladoras. Mientras que, en los pacientes de mayor riesgo, el objetivo es modificar el curso natural de la enfermedad aplicando terapias de mediana y alta intensidad, las cuales incluyen diferentes agentes quimioterapéuticos hasta el TCPH (Stone, 2009; Greenberg y col., 2013).

8.1.2. Clasificaciones

8.1.2.1. Clasificación según el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico

La primera clasificación sistemática de los SMD fue definida por el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) (Bennett y col., 1982). De acuerdo a las características morfológicas, citoquímicas, el recuento de monocitos en SP y el porcentaje de blastos en SP y MO, la clasificación FAB define 5 entidades: anemia refractaria (AR), AR con sideroblastos en anillo (ARSA), AR con exceso de blastos (AREB), AREB en transformación (AREBt) y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). En esta clasificación el recuento de blastos en MO mayor a 30% establece el diagnóstico diferencial con respecto a la LMA (Bennett y col., 1985).

8.1.2.2. Clasificación según la Organización Mundial de la Salud

La Sociedad Europea de Hematopatólogos y la Sociedad de Hematopatología desarrollaron la nueva sistematización de la OMS para la clasificación de los SMD en 1999, la cual fue levemente modificada en 2009. Esta clasificación se basa en la combinación de hallazgos morfológicos, inmunofenotipo, anormalidades citogenéticas

y hallazgos clínicos. Los SMD se subdividen en Citopenia Refractaria con Displasia unilineal (CRDU), ARSA, CR con displasia multilineal (CRDM), AREB-1 o AREB-2, Síndrome 5q- y SMD no clasificables (Lee Harris y col., 1999; Jaffe y col., 2001 Vardiman y col., 2009) (Tabla 5). Esta clasificación elimina el subtipo AREBt y fija un nuevo límite inferior para establecer diagnóstico de LMA en 20% de blastos en MO y/o SP. Además, re-localiza a los pacientes con LMMC, debido a sus características displásicas sumadas a características mieloproliferativas, en un nuevo grupo denominado enfermedades SMD/ Mieloproliferativas (Vardiman y col., 2009).

Tabla 5: Clasificación de los SMD según la OMS

Subtipo	Sangre periférica	Médula ósea
Citopenia refractaria con displasia unilineal (CRDU) Anemia refractaria (AR) Neutropenia refractaria (NT) Trombocitopenia refractaria (TR)	Uni o bicitopenia, <1% de blastos	Displasia unilineal (en ≥10% de las células), < 5% de blastos
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	Anemia, <1% de blastos	Displasia eritroide, <5% de blastos, ≥15% de sideroblastos en anillo
Citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM)	Citopenia(s), <1% de blastos, sin bastones de Aüer, <1x10 ⁹ / Monocitos	Displasia multilineal, >10% de sideroblastos en anillo, <5% de blastos, ausencia de bastones de Aüer
Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1 (AREB-1)	Citopenia(s), <5% de blastos, sin bastones de Aüer, <1x10 ⁹ / Monocitos	Displasia mono o multilineal, 5-9% de blastos, sin bastones de Aüer
Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2 (AREB-2)	Citopenia(s), 5-19% de blastos, ± bastones de Aüer, <1x10 ⁹ / Monocitos	Displasia uni o multilineal, 10-19% blastos, ± bastones de Aüer
SMD asociada con delección aislada 5q (Síndrome 5q-)	Anemia, <1% de blastos, plaquetas normales o aumentadas	Delección aislada 5q, megacariocitos hipolobulados, <5% de blastos
SMD no clasificable	Citopenia(s), ≤ 1% de blastos	No se ajusta claramente a otra categoría de displasia con <5% de blastos, <10% displasia en más de una línea mieloide + alteraciones citogenéticas

8.1.3. AA versus SMD: diagnóstico diferencial y aspectos de la evolución clonal

Como se mencionó anteriormente, los SMD constituyen una patología que presenta una de las zonas de superposición clínica más importante con la AA. Si bien la combinación de una MO normo-hipercelular con alteraciones displásicas es característica en los SMD, alrededor de un 15% de los pacientes presentan hipocelularidad medular (SMDh), definida como <30% de celularidad en pacientes <60 años, o <20% de celularidad en pacientes ≥60 años (Vardiman, 2006). Sin embargo, los SMDh no representan una categoría de SMD definida según la OMS. Los criterios diagnósticos en SMD se basan, principalmente, en la presencia de características displásicas en la MO y la detección de anomalías cromosómicas clonales. Sin embargo, debido a la celularidad reducida de los aspirados medulares de los pacientes con SMDh y AA resulta complicada la evaluación morfológica y citogenética de la MO, lo cual dificulta el diagnóstico diferencial entre ambas patologías.

La evolución clonal de la AA a SMD es típicamente una complicación tardía de la AA y se observa principalmente en pacientes refractarios o en aquellos que no lograron alcanzar una respuesta completa y sostenida a las TIS (Kojima y col., 2002; Rosenfeld y col., 2003; Saracco y col., 2008). Si bien no hay muchos datos de series internacionales que detallen los hallazgos citogenéticos en AA, la frecuencia estimada de cariotipos alterados varía de 2%-57% en el período de observación de 5-11 años (Afable y col., 2011). La amplitud en esta frecuencia puede deberse a diferencias en criterios de diagnóstico, poblaciones de pacientes, protocolos de tratamiento y frecuencia de estudios citogenéticos en MO durante el seguimiento. Asimismo, estas alteraciones podrían estar siendo subestimadas debido a la alta tasa de resultados citogenéticos no evaluables. En la actualidad, existen controversias con respecto al diagnóstico de un paciente que cumple los criterios de AA pero presenta un cariotipo alterado al momento del diagnóstico.

Los clones que evolucionan a SMD/LMA en el contexto de la AA son caracterizados por anomalías cromosómicas típicas, siendo las más comunes la trisomía del cromosoma 8 y la monosomía del 7 (Maciejewski y Selleri, 2004). Estas células tienen una ventaja adaptativa sobre las que no portan estos rearrreglos. La trisomía 8 está presente en pacientes con SMD que comparten características semejantes a la AA: respuesta efectiva a TIS y presencia de expansiones oligoclonales de células T. Además, el perfil de expresión muestra que los genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria se encontrarían aumentados (Sloand y col., 2002b; Chen y col., 2004). La monosomía 7 es también una anomalía citogenética frecuente en AA

pero asociada a peor pronóstico, debido a citopenias refractarias y/o mayor riesgo de evolución a LMA. Las células CD34+ con monosomía 7 muestran una sobre-expresión de genes que inducen transformación leucémica y resistencia a la apoptosis (Sloand y col., 2002b; Chen y col., 2004). Otras anomalías citogenéticas descritas, con mucha menos frecuencia, involucran alteraciones en los cromosomas 13, 6, 11 e Y (Mikhailova y col., 1996; Maciejewski y col., 2002; Lee y col., 2010).

A pesar de presentar características clínicas y patológicas que se superponen, tanto los tratamientos como el pronóstico para los pacientes con SMD y AA son sustancialmente diferentes. Por lo tanto, un adecuado diagnóstico diferencial entre ambos desórdenes hematológicos es de suma importancia para un enfoque terapéutico adecuado en cada caso.

8.2. HPN

La HPN es un raro trastorno hematológico con manifestaciones clínicas de hemólisis, trombosis e insuficiencia medular. Esta enfermedad es causada por la expansión clonal no maligna de *stem cells* hematopoyéticas que adquirieron una mutación somática en el gen *PIG-A*. Como consecuencia, las células HPN tienen una deficiencia marcada o la ausencia de todas las proteínas de membrana ligadas a glicosil-fosfatidilinositol. Entre las principales proteínas afectadas se encuentran las reguladoras del sistema complemento CD55 y CD59. Debido a su ausencia las células de la sangre se convierten en blancos para la acción del sistema complemento causando su destrucción, siendo la causa de la hemólisis intra-vascular que es la principal manifestación clínica de la enfermedad (Young, 2005; Bessler y Hiken, 2008).

Los pacientes se clasifican de acuerdo al tamaño del clon HPN y a las manifestaciones clínicas en: 1) HPN clásica: pacientes con evidencia de hemólisis y sin evidencia de otro SFM, 2) HPN en el contexto de otros SFM (AA/HPN o SMD/HPN): pacientes con evidencia de hemólisis y pruebas diagnósticas de otro SFM, y 3) HPN subclínica: pacientes sin evidencia de hemólisis, a pesar de presentar una población pequeña pero detectable de células HPN, y con evidencia de otro SFM (Parker y col., 2005).

Hasta hace unos años, el único tratamiento para la HPN era el TCPH para pacientes seleccionados. Sin embargo, con el desarrollo de eculizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción C5 del complemento, los pacientes con una HPN clásica alcanzan una considerable respuesta a este medicamento (DeZern y col., 2013). La terapia de la HPN en el contexto de la AA no está completamente determinada. Los pacientes con HPN clásico no se benefician con las TIS, pero los

pacientes con AA/HPN pueden presentar una respuesta positiva a este tratamiento (Sugimori y col., 2006).

8.2.1. AA versus HPN: diagnóstico diferencial y aspectos de la evolución clonal

La prueba diagnóstica tradicional, introducida a finales del año 1930, es el test de Ham, la cual se basa en la sensibilidad incrementada de los eritrocitos HPN a la lisis por el complemento. En la actualidad, el uso de la citometría de flujo permite evaluar la presencia de células HPN, por ausencia de las proteínas CD55 y CD59, en los pacientes con AA. Y, debido a la alta sensibilidad de esta metodología, permite detectar pequeñas poblaciones de estas células. En algunos pacientes con AA, el número de células clonales se pueden incrementar sostenidamente durante el transcurso de la enfermedad, desarrollando una HPN hemolítica clásica, cuyas tasas de evolución se encuentran entre 2%-19% en un periodo de observación de 2-11 años (Afable y col., 2011). En contraste, una proporción significativa de pacientes con AA presentan clones HPN pequeños y/o estables que no conducen a manifestaciones clínicas. En varios estudios, la presencia de un clon HPN ha constituido un factor pronóstico favorable para la respuesta a TIS tanto en los pacientes con AA como en los SMD (Sugimori y col., 2006).

Objetivos

Objetivos

Teniendo en cuenta que la AA posee un alto componente autoinmune y riesgo potencial de progresión hacia los SMD, existiendo entre ambas patologías zonas de intersección clínica, los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron:

- Estudiar las alteraciones citogenéticas clonales y evaluar inestabilidad cromosómica, a fin de establecer el diagnóstico diferencial entre la AA y otros SFM en pacientes con características clínicas compartidas.
- Estudiar polimorfismos en los genes de las citoquinas *TNF* (-308 G/A), *IFNG* (+874 A/T y +875 CAn), *IL6* (-174 G/C) y *TGFB1* (+869 C/T y +915 G/C), y establecer su relación con susceptibilidad y/o características clínico-patológicas en pacientes con AA y SMD.
- Analizar los niveles de expresión génica de las citoquinas *TNF*, *IFNG*, *IL6*, *TGFB1* y de los factores de transcripción *TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3*, involucrados en la fisiopatología de la AA.

Materiales y métodos

1. Poblaciones estudiadas

Se analizaron 69 pacientes con AA provenientes de diferentes instituciones argentinas de salud: Hospital Interzonal General de Agudos “Gral. San Martín” y Hospital de Niños “Sor María Ludovica” de La Plata, Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”, Hospital Nacional “Prof. Dr. A. Posadas”, Hospital General de Agudos “C. G. Durand”, Hospital General de Agudos “J.M. Ramos Mejía”, Instituto de Investigaciones Hematológicas/ Academia Nacional de Medicina (ANM), entre otros. El estudio es retrospectivo y prospectivo, ya que los pacientes fueron evaluados y diagnosticados entre los años 1987 y 2014. Del total de pacientes analizados 44 (64%) fueron diagnosticados después de 2005, 16 (23%) entre los años 2000 y 2005, y sólo 9 de ellos (13%) antes de 2000. Los profesionales del Servicio de Hematología de las diferentes instituciones de salud colaboraron, no solo con el envío de muestras, sino también con el aporte de datos clínicos y la firma de los consentimientos informados correspondientes.

Los pacientes se diagnosticaron y clasificaron en cuanto a la severidad de la enfermedad acorde a los criterios definidos por Camitta y col. (Camitta y col., 1975), el *International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study group* (IAAAS, 1987) y Bacigalupo y col. (Bacigalupo y col., 1988). Los criterios de exclusión de pacientes fueron: 1) características displásicas de la hematopoyesis, 2) estudio citogenético alterado al diagnóstico, 3) test de inestabilidad cromosómica con DEB positivo, y 4) test de Ham positivo y/o presencia de clon HPN >1,5% por citometría de flujo (Marsh y col., 2009) (ver Introducción secciones 4 y 8).

Los pacientes concurren a los diferentes Servicios de Hematología regularmente, o, en su defecto, fueron contactados los profesionales que continuaron con el tratamiento para obtener la información sobre el curso de la enfermedad, el tratamiento recibido y la evolución del paciente, hasta Abril de 2014. Con el fin de analizar los datos, estos se registraron en una ficha individual para cada uno de los pacientes (Figura 6).

La respuesta a la TIS se evaluó sólo en aquellos pacientes con AA tratados con la combinación de GAT y CsA, según las definiciones de RC y RP (Yoshida y col., 2011) (ver Introducción sección 5.1). La respuesta global a la TIS se consideró en pacientes que alcanzaron una RC o RP luego de 6 meses de haber iniciado el tratamiento.

Además, se documentó información acerca de la situación en la cual se encontraba cada paciente (al diagnóstico, bajo tratamiento, en remisión, otros) al momento de la toma de la muestra, la cual es relevante para el posterior análisis de los estudios de

expresión, ya que los niveles de los genes estudiados pueden variar en las diferentes situaciones.

Figura 6: Planilla individual para pacientes con AA

NOMBRE:	Hospital:		
EDAD:	SEXO:	Tel:	Diagnóstico:
1. a. FECHA DE DIAGNÓSTICO:			
b. SÍNTOMAS AL DIAGNÓSTICO relacionados con:			
c. ANTECEDENTES relacionados con la enfermedad:			
2. ANÁLISIS DE SANGRE PERIFÉRICA:			
Hemograma completo al diagnóstico: Hto, Hb, VCM, Ret, GB (N, E, B, L, M), Pq			
3. ESTUDIOS EN MÉDULA ÓSEA:			
a. BMO. Hallazgos importantes:			
b. PAMO. Hallazgos importantes:			
4. CITOMETRÍA DE FLUJO:			
....a. Clon HPN CD ₅₅ -/CD ₅₉ -:			
....b. Otros hallazgos importantes:			
5. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS:			
a. En sangre periférica: DEB:			
b. En médula ósea:			
6. ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS, SEROLOGÍAS VIRALES, ETC.:			
7. ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES:			
a. Propios:			
b. Familiares relacionados:			
8. TRATAMIENTO, especificar cuál y los resultados:			
9. EVOLUCIÓN: Hto, Hb, VCM, Ret, GB (N, E, B, L, M), Pq			
a. Vive en condición estable/asintomático	si	no	Última consulta:
b. Agravamiento de citopenias con necesidad de soporte:	si	no	Fecha:
c. Evolución a SMD/LMA:	si	no	Fecha:
d. Fallecido:	Causa:	si	no
10. OBSERVACIONES: Esplenomegalia: si-no, Hepatomegalia: si-no, Adenopatías: si-no			
Otra información de interés:			

Planilla para la recolección de los datos clínicos, al diagnóstico y durante el seguimiento, de los pacientes con AA. Hto: hematocrito; Hb: hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio; Ret: porcentaje de reticulocitos; GB: recuento de glóbulos blancos; N: neutrófilos; E: eosinófilos; B: basófilos; L: linfocitos; M: monocitos; Pq: recuento de plaquetas; BMO: biopsia de MO; PAMO: punción y aspiración de MO; HPN: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna; DEB: diepoxibutano; SMD: Síndromes Mielodisplásicos; LMA: Leucemia Mieloide Aguda.

Además, también se analizaron 132 pacientes con SMD *de novo*, diagnosticados y clasificados según la OMS (Lee Harris y col., 1999; Jaffe y col., 2001 Vardiman y col., 2009), los cuales no presentaban antecedentes documentados de exposición a citotóxicos, radio- o quimioterapia (ver Introducción sección 8.1). Y, como población control, se analizaron 131 muestras que corresponden a donantes de un banco de sangre, cuyas muestras conforman un archivo de ADNs de individuos controles perteneciente al Laboratorio de Genética Hematológica del IMEX-CONICET/ ANM.

2. Extracción de ADN y análisis cuali-cuantitativo del mismo

El ADN genómico es extraído a partir de células nucleadas de MO, obtenidas mediante punción y aspiración de MO (PAMO) de cresta ilíaca o esternal, y/o de SP obtenida por punción venosa, utilizando ácido etilen-tetra acético (EDTA) 0,342 M al 5% v/v como anticoagulante.

2.1. Métodos de extracción de ADN

2.1.1. Extracción de ADN con fenol-cloroformo

Las células nucleadas libres del plasma son sometidas a una serie de lavados en *buffer* de lisis de glóbulos rojos (Tris/HCl 10 mM pH 8; NaCl 10 mM; MgCl₂ 5 mM) hasta la obtención de un botón de células nucleadas. El *pellet* de células nucleadas es resuspendido en *buffer* de digestión (Tris/HCl 10 mM pH 8; EDTA 5 mM; dodecil sulfato de sodio, SDS 0,5 %) con 2 µg/µL de proteinasa K e incubados *over-night* a 37°C. El ADN es extraído en 1 volumen de fenol (saturado en Tris/HCl 0,1 mM pH 8), luego en 1 volumen de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (IAC) 24-1 v/v (1:1), y una extracción final en 1 volumen de IAC. El ADN contenido en la fase acuosa es obtenido por precipitación en 0,3 mM de NaC₂H₃O₂ con 2 volúmenes de etanol absoluto. El ADN es lavado 2 veces en etanol 70% en frío, secado a temperatura ambiente y resuspendido en un volumen variable (20-500 µL) de *buffer* TE (Tris/HCl 10 mM pH 8; EDTA 0,1 mM) obteniéndose una concentración de 0,1-2,0 µg/µL (Sambrook y col., 1989). Las muestras de ADN obtenidas son preservadas a 4°C.

2.1.2. Extracción de ADN a partir de muestras en Trizol

Luego de completar la extracción de ARN con Trizol (ver Materiales y métodos sección 4.1), se procede a aislar el ADN inmerso en la interfase y en la fase orgánica. Antes de comenzar, se remueve con mucho cuidado la fase acuosa remanente, lo cual es crítico para obtener un ADN de buena calidad. Para la precipitación del ADN, se agregan 300 µL de etanol absoluto frío, obteniendo un *pellet* de ADN luego de 5 min. de centrifugación a 4000 rpm a 4°C. El ADN es lavado dos veces agregando 1 mL de una solución 0,1 M de citrato de sodio en etanol 10%, y luego de 30 min. a temperatura ambiente, es centrifugado 5 min. a 4000 rpm a 4°C. Se realiza otro lavado agregando 1 mL de etanol 75%, obteniendo un *pellet* de ADN luego de 5 min. de centrifugación a 4000 rpm a 4°C. Finalmente, el ADN obtenido es resuspendido en un volumen adecuado de una solución 8 mM de NaOH, y las muestras son preservadas a 4°C.

2.1.3. Extracción/ purificación de ADN mediante columnas

Para las muestras de MO y/o SP que contengan heparina, debido a que este anticoagulante inhibe la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*), se utilizan columnas comerciales de extracción/ purificación de ADN. Los kits comerciales utilizados son: NucleoSpin® Tissue (*Macherey-Nagel*) y ADN PuriPrep-S kit (*Highway, Inbio*), para aislar ADN doble cadena; y ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System (*Promega*) para aislar ADN simple cadena. En todos los casos, se procede siguiendo los protocolos de manufactura correspondientes.

2.2. Análisis cuantitativo: determinación de concentración y pureza del ADN por espectrofotometría

Para evaluar la concentración y pureza del ADN obtenido, una alícuota de las muestras es diluida 1/100 en agua destilada y analizada en un espectrofotómetro (*GeneQuant pro*) en la región del ultravioleta (UV) a 260 y 280 nm. La concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN es estimada teniendo en cuenta que el coeficiente de absorbancia a 260 nm para el ADN doble cadena es 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por cada unidad de densidad óptica (DO). Para determinar la pureza de la muestra, relativa a proteínas, se evalúa la relación $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$, considerándose óptimo un valor $\geq 1,8$.

2.3. Análisis cualitativo: determinación de la integridad del ADN

La integridad del ADN obtenido se evalúa mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se toma 1 μL de ADN, 2 μL de *buffer* de siembra (glicerol 30% p/v; azul de bromofenol, ABF 0,025% p/v) y se los lleva a un volumen final de 5 μL . Luego, se siembra en un gel de agarosa al 1% p/v y bromuro de etidio (BrEt) a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se lo somete a electroforesis en *buffer* TBE 0,5X (TBE 1X: Tris-HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0), con una diferencia de potencial de 2 volts/cm. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se revela observando la fluorescencia producida en un transiluminador UV.

3. Amplificación genómica completa

En aquellos casos en los cuales la cantidad de muestra es insuficiente para la realización de todos los ensayos necesarios, se procede a la amplificación completa del genoma utilizando el *primer* degenerado 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'. Las condiciones estándar de reacción utilizadas son: 1-40 ng de ADN, 2 μM de *primer*,

200 μ M de dNTPs, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris/HCl 10 mM pH 8,3 y *Taq* ADN polimerasa 0,25 U (*Promega*), en un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de ciclado comprenden: una desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C seguidas de 5 ciclos de 1 min. a 94°C, 90 seg. a 30°C escalando a 72°C en un tiempo de 3 min. (3,5°C/ 15 seg.) y 3 min. a 72°C, luego se continúa con 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 58°C y 2 min. a 72°C, incluyendo un incremento de 14 seg. en cada ciclo, y una extensión final de 5 min. a 72°C (Grant y col, 2002).

4. Estudio de polimorfismos

El estudio de los polimorfismos en los genes que codifican para las citoquinas *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1* se realiza a partir de ADN genómico mediante la amplificación por PCR de un fragmento génico utilizando los *primers* correspondientes (Tabla 6).

Tabla 6: Secuencia de los *primers* utilizados para la amplificación por PCR

Gen	Polimorfismo	Secuencia de <i>primers</i> (5' → 3')	Posición del fragmento amplificado	Tamaño del producto	Referencia
<i>TNF</i>	-308 G/A	Fw: AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT Rv: TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	chr6:31543007+ 31543113	107 pb	Wilson y col., 1992
<i>IFNG</i>	+874 A/T	Fw A: TTCTTACAACACAAAATCAAATCA Fw T: TTCTTACAACACAAAATCAAATCT Rv: TCAACAAAGCTGATACTCCA	chr12:68552282- 68552545	264 pb	Pravica y col., 2000
	+875 C/An	Fw: GCTGTCATAATAATATTCAGAC Rv: CGAGCTTTAAAAGATAGTTCC	chr12:68552462- 68552584	123 pb (119-131 pb)	Dufour y col., 2004
<i>IL6</i>	-174 G/C	Fw G: CCCTAGTTGTGTCTTGCG Fw C: CCCTAGTTGTGTCTTGCC Rv: GAGCTTCTCTTCGTTCC	chr7:22766628+ 22766857	230 pb	Cavet y col., 2001
<i>TGFB1</i>	+869 C/T	Fw: TCCGTGGGATACTGAGACAC Rv C: GCAGCGGTAGCAGCAGCG Rv T: <u>A</u> GCAGCGGTAGCAGCAGCA*	chr19:41858904- 41859143	240 pb	Perrey y col., 1999
	+915 G/C	Fw G: GTGCTGACGCCTGGCCG Fw C: GTGCTGACGCCTGGCCC Rv: GGCTCCGGTTCTGCACTC	chr19:41858660- 41858892	233 pb	
<i>HBB</i>	—	Fw: TACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC Rv: TATTTTCCAAGGTTTGAAGTAGCTC	chr11:5246586- 5247217	632 pb	Morari y col., 2002
<i>B2M</i>	—	Fw: AAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGA Rv: ACCTCTAAGTTGCCAGCCCTCCTA	NM_004048.2	319 pb	Gonzalez y col., 2010

Fw: *forward*; Rv: *reverse*. * El *primer* Rv T presenta, hacia su extremo 5', un nucleótido más (A) que el *primer* Rv C, formando un producto específico en este caso de 241 pb.

Las condiciones estándar de reacción utilizadas son: 200 ng de ADN, concentración de *primers* adecuada (Tabla 7), 100 μ M de dNTPs, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris/HCl 10 mM pH 8,3 y *Taq* ADN polimerasa 0,45 U (*Promega*), en un volumen final de 25 μ L. Las condiciones estándar de ciclado comprenden: 35 ciclos de 30 seg. a 95°C, 45 seg. a la temperatura de *annealing* óptima de los *primers* correspondientes (Tabla 7) y 45 seg. a 72°C, con una desnaturalización inicial de 3 min. a 95°C y una extensión final de 5 min. a 72°C. Para los SNPs del gen *TGFB1* el ciclado combina dos temperaturas de *annealing* (Tabla 7), dividiendo la reacción en 10 y 25 ciclos, manteniendo igualdad en el resto de las condiciones térmicas.

Tabla 7: Concentración y temperatura de *annealing* de los *primers* utilizados para la amplificación por PCR

Gen	Polimorfismo	Concentración de <i>primers</i>		T de <i>annealing</i>
<i>TNF</i>	-308 G/A	0,4 μ M		60°C
<i>IFNG</i>	+874 A/T	Alelo específica: A y T 0,6 μ M	Control interno <i>HBB</i> : 0,6 μ M	57,5°C
	+875 CAn	0,4 μ M		56°C
<i>IL6</i>	-174 G/C	Alelo específica: G 0,45 μ M y C 0,35 μ M	Control interno <i>HBB</i> : 0,2 μ M	57°C
<i>TGFB1</i>	+869 C/T muestra ADN	Alelo específica: T 0,4 μ M y C 0,5 μ M	Control interno <i>HBB</i> : 0,7 μ M	65°C-58°C
	+869 C/T muestra ADNc	Alelo específica: T 0,4 μ M y C 0,8 μ M	Control interno <i>B2M</i> : 0,1 μ M	
	+915 G/C muestra ADN	Alelo específica: G y C 0,6 μ M	Control interno <i>HBB</i> : 0,6 μ M	
	+915 G/C muestra ADNc	Alelo específica: G 1,2 μ M y C 0,6 μ M	Control interno <i>B2M</i> : G 0,4 μ M y C 0,8 μ M	

4.1. Determinación del SNP -308 G/A (*TNF*)

4.1.1. PCR-RFLP (PCR-Restriction fragment length polymorphism)

El SNP -308 G/A (notación legada) del gen *TNF* (dbSNP ID rs1800629, NC_000006.12: g.31575254G>A, NM_000594.3: c.-488G>A), ubicado en su región promotora, se determina mediante PCR-RFLP. Los productos de PCR obtenidos son

incubados con la enzima de restricción *NcoI* (*Fermentas, TecnoLab*) *over-night* a 37°C. El *primer forward* (Fw) posee la incorporación de una citosina (C, ver Tabla 6) la cual genera el sitio de reconocimiento de la enzima *NcoI* en presencia de la variante -308G, clivando al producto amplificado en dos fragmentos de 87 pb y 20 pb. Mientras que, en presencia de la variante -308A la enzima *NcoI* pierde su sitio de reconocimiento para el clivaje, manteniéndose el tamaño del producto amplificado original de 107 pb. Los productos obtenidos en la digestión se resuelven en un gel de poliacrilamida 29:1 (acrilamida: bis acrilamida) al 12% v/v 50 min. a 200 V, el cual es revelado mediante tinción con nitrato de plata (Wilson y col., 1992).

4.1.2. Protocolo de tinción con nitrato de plata

Los vidrios son desmontados y el gel es incubado durante 10 min. en 200 mL de la solución fijadora (etanol 10%; ácido acético 0,5%). Luego de descartar la solución inicial, el gel es sumergido en 200 mL de AgNO₃ 0,2% p/v durante 20 min. Se realizan 2 lavados cortos con agua bidestilada y se agregan 200 mL de la solución reveladora (NaOH 1,5%; formaldehído 0,275%), agitando suavemente hasta visualizar las señales de interés. El revelado es detenido mediante el agregado de agua bidestilada (Mathew y col., 1991). Los geles son fotografiados para documentar los resultados y analizados utilizando el sistema informático GelPro® Imager Kit 3.1 (*Media Cybernetics, Syrex*).

4.2. Determinación de los SNPs +874 A/T (*IFNG*), -174 G/C (*IL6*) y +869 C/T y +915 G/C (*TGFB1*)

4.2.1. PCR-alelo específica

Los SNPs +874 A/T (notación legada) del gen *IFNG* (dbSNP ID rs2430561, NC_000012.12: g.68158742T>A, NM_000619.2: c.115-483A>T), -174 G/C (notación legada) del gen *IL6* (dbSNP ID rs1800795, NC_000007.14: g.22727026C>G, NM_000600.3: c.-237C>G) y, +869 C/T (notación legada) (dbSNP ID rs1800470, NC_000019.9: g.41858921G>A, NM_000660.5: c.29C>T) y +915 G/C (notación legada) (dbSNP ID rs1800471, NC_000019.10: g.41352971C>G, NM_000660.5: c.74G>C) del gen *TGFB1*, se determinan mediante PCR-alelo específica. La reacción de PCR se realiza en *multiplex* con el gen control interno de amplificación Beta Globina (*HBB*) (Tablas 6 y 7). Para el estudio de los SNPs de *TGFB1*, dado que se localizan en el primer exón del gen, en algunos casos se determinan a partir de muestras de ADN copia (ADNc) utilizando como gen control interno de amplificación Beta 2 Microglobulina (*B2M*) (Tablas 6 y 7). Los productos amplificados son sometidos

a una electroforesis en gel de agarosa. Para ello se toman 5 μ L del producto de PCR y se siembran en un gel de agarosa al 2% p/v y BrEt a 0,25 μ g/mL, y se lo somete a electroforesis en *buffer* TBE 0,5X (TBE 1X: Tris/HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0), con una diferencia de potencial de 2 volts/cm. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se revela observando la fluorescencia producida en un transiluminador UV.

4.3. Determinación del polimorfismo de repetición +875 CAn (*IFNG*)

El polimorfismo de repetición +875 CAn (notación legada) del gen *IFNG* (dbSNP ID rs587776821), también conocido como 1349 (CA)_n, se determina mediante la amplificación por PCR de un fragmento génico que contiene la región microsatélite. Los productos amplificados son resueltos en un gel de poliacrilamida 19:1 (acrilamida:bis acrilamida) al 12% v/v. Para ello se siembran en el gel 3 μ L del producto de PCR y se realiza la corrida electroforética durante 5 hs. a 250 V. Una vez finalizada la electroforesis, los patrones obtenidos se visualizan revelando el gel mediante tinción argéntica (Dufour y col., 2004) (ver Materiales y métodos sección 4.1.2).

4.4. Secuenciación de ADN

Los diferentes patrones obtenidos en el análisis de cada polimorfismo se confirman por secuenciación automática. Los respectivos productos de PCR se purifican a través de las columnas GFX PCR DNA y *Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). Luego, se evalúa su concentración en un gel de agarosa al 2% p/v y BrEt a 0,25 μ g/mL, sometiéndolo a electroforesis en *buffer* TBE 0,5X (TBE 1X: Tris/HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0), con una diferencia de potencial de 2 volts/cm. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se revela observando la fluorescencia producida en un transiluminador UV. El protocolo consiste en la síntesis de ADN *in vitro* por una ADN polimerasa usando el templado simple cadena y el *primer* de interés. La síntesis finaliza por la incorporación de un análogo nucleotídico (dideoxinucleótido, ddNTP) que no permite continuar la polimerización (Sanger y col., 1977). La secuenciación automática se realiza en el Servicio de Secuenciación de ADN en la FCEyN (UBA).

5. Extracción de ARN y análisis cuali-cuantitativo del mismo

El ARN total es extraído a partir de células nucleadas de MO, obtenidas mediante PAMO de cresta ilíaca o esternal, y/o de SP obtenida por punción venosa, utilizando EDTA 0,342 M al 5% v/v como anticoagulante.

5.1. Método de extracción de ARN con Trizol

Las células nucleadas libres del plasma son sometidas a una serie de lavados en *buffer* de lisis de glóbulos rojos (Tris/HCl 10 mM pH 8; NaCl 10 mM; MgCl₂ 5 mM) hasta la obtención de un botón de células nucleadas. El *pellet* de glóbulos blancos obtenido es sometido al tratamiento con Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*), agregando 1 mL del reactivo, y la muestra es preservada a -20°C. En el momento de la extracción, se agregan 200 µL de cloroformo, se agita vigorosamente y se recupera la fase acuosa superior luego de 15 min. de centrifugación a 13000 rpm a 4°C. Para la precipitación del ARN, se agrega 500 µL de isopropanol frío, obteniendo un *pellet* de ARN luego de 10 min. de centrifugación a 13000 rpm a 4°C. Se realiza un lavado en etanol 75%, seguido de 5 min. de centrifugación a 7000 rpm a 4°C. El *pellet* obtenido es resuspendido en un volumen adecuado de agua ultrapura tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1% o agua libre de nucleasas, para evitar la degradación del ARN. Las muestras de ARN obtenidas son preservadas a -20°C o -70°C.

5.2. Análisis cuantitativo: determinación de concentración y pureza del ARN por espectrofotometría

Para evaluar la concentración y pureza del ARN obtenido, una alícuota de las muestras es diluida 1/40 en agua con DEPC o libre de nucleasas y analizada en un espectrofotómetro (*GeneQuant pro*) en la región del UV a 230, 260 y 280 nm. La concentración en µg/µL de ARN es estimada teniendo en cuenta que el coeficiente de absorbancia a 260 nm para el ARN es 40 µg/mL por cada unidad de DO. Para determinar la pureza de la muestra se evalúan las relaciones DO₂₆₀/ DO₂₈₀ y DO₂₆₀/ DO₂₃₀, considerándose óptimo un valor $\geq 1,9$ y 1, respectivamente (DO₂₆₀/ DO₂₈₀ <1,9 es indicativo de contaminación con proteínas y DO₂₆₀/ DO₂₃₀ <1 es indicativo de contaminación con solventes orgánicos).

5.3. Análisis cualitativo: determinación de la integridad del ARN

El nivel de degradación del ARN obtenido se evalúa mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se toma 1 μL de ARN, 2 μL de *buffer* de siembra (glicerol 30% p/v; ABF 0,025% p/v) y se los lleva a un volumen final de 5 μL . Luego, se siembra en un gel de agarosa al 1% p/v y BrEt a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se lo somete a electroforesis en *buffer* TBE 0,5X (TBE 1X: Tris-HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0), con una diferencia de potencial de 2 volts/cm. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se revela observando la fluorescencia producida en un transiluminador UV. En un ARN íntegro, la relación entre las bandas ribosomales 28S/ 18S, que se observan en el gel como bandas discretas, es cercana a 2.

6. Análisis de expresión génica

El nivel de expresión de los genes que codifican para las citoquinas *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*, y para los factores de transcripción *TBX21* (notación legada: *TBET*), *GATA3*, *RORC* (notación legada: *ROR γ t*) y *FOXP3* se realiza a partir de muestras de ARN total mediante la cuantificación por PCR en tiempo real. La cuantificación es relativa al gen control endógeno de amplificación Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Para llevar a cabo los estudios de expresión génica se utiliza un termociclador *Rotor-Gene 6000* (*Qiagen*), con el sistema Mezcla Real (*Biodynamics*) o el sistema *SYBR Selected Master Mix* (*Applied Biosystem*). Ambos sistemas de cuantificación se basan en la presencia de un colorante (*Eva Green* o *SYBR Green*, respectivamente) que libera fluorescencia a 530 nm cuando se intercala en un producto doble cadena del ácido nucleico formado.

6.1. Reacción de retro-transcripción (RT-PCR)

Para la síntesis del ADNc, la reacción incluye una desnaturalización inicial a 65°C durante 5 min., cuya mezcla de reacción contiene: 2 μg de ARN y 25 pmoles de *random primers* (*Invitrogen*, *Life Technologies*), en un volumen final de 11 μL . Luego de una incubación de 5 min. en frío, se agrega la siguiente mezcla de reacción: enzima transcriptasa reversa M-MLV 10 U (*Promega*), dNTPs 750 μM y el *buffer* de reacción comercial 5X, en un volumen final de 20 μL , incubando 1 hora a 37°C y 10 min. a 70°C para inactivar la enzima. Las muestras de ADNc obtenidas son preservadas a -20°C o -70°C.

6.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La expresión de los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1* se evalúa mediante qPCR utilizando el sistema Mezcla Real (*Biodynamics*). Las condiciones de ciclado comprenden: 45 ciclos de 10 seg. a 95°C y 60 seg. a 60°C, precedidos por una desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C y otra de 2 min. a 50°C. Las condiciones de reacción son: 2,5 µL de ADNc, 2X Mezcla Real (*Biodynamics*) y 0,175 µM de cada uno de los *primers* correspondientes (Tabla 8), en un volumen final de 20 µL.

Tabla 8: Secuencia de los *primers* utilizados para la amplificación por qPCR

Gen	Secuencia de los <i>primers</i> (5' → 3')	Secuencia de ARNm de referencia	Tamaño del producto	Referencia
<i>TNF</i>	Fw: TGACCCACGGCTCCACCCTC Rv: GATGATCTGACTGCCTGGGCCAG	NM_000594	280 pb	Diseñados para este trabajo
<i>IFNG</i>	Fw: GACCAGAGCATCCAAAAGAGTG Rv: TGCAGGCAGGACAACCATTA	NM_000619	263 pb	Diseñados para este trabajo
<i>IL6</i>	Fw: AATCATCACTGGTCTTTTGGAG Rv: GCATTTGTGGTTGGGTCA	NM_000600	177 pb	Diseñados para este trabajo
<i>TGFB1</i>	Fw: GGGTGGCCGGGAGAGTG Rv: GCCGGTTGCTGAGGTATCG	NM_000660	297 pb	Diseñados para este trabajo
<i>TBET</i>	Fw: TACCCGGGGCCGCGTGAGGACTA Rv: CGGGTGGACGTACAGGCGGTTTC	NM_013351	318 pb	Diseñados para este trabajo
<i>GATA3</i>	Fw: TGTGTGAACTGTGGGGCAACCTCG Rv: TTTTCGGTTTCTGGTCTGGATGCC	NM_002051	315 pb	Diseñados para este trabajo
<i>RORγt</i>	Fw: CACCCTATGCCTCCCTGACA Rv: TCTCCACATGGACTTCCTCT	NM_005060	162 pb	Diseñados para este trabajo
<i>FOXP3</i>	Fw: GTGGCATCATCCGACAAGG Rv: TGTGGAGGAACTCTGGGAAT	NM_014009	166 pb	Jia y col., 2010
<i>GAPDH</i>	Fw: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC Rv: GAAGATGGTATGGGATTTC	NM_002046	226 pb	Hu y col., 2004

Fw: forward; Rv: reverse.

Para el análisis de la expresión génica de *TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3* mediante qPCR se utiliza el sistema *SYBR Selected Master Mix* (*Applied Biosystem*). Las condiciones de ciclado incluyen: 45 ciclos de 10 seg. a 95°C y 60 seg. a 60°C, precedidos por una desnaturalización inicial de 2 min. a 50°C y otra de 2 min. a 95°C.

Las condiciones de reacción son: 2,5 µL de ADNc, 2X SYBR Selected Master Mix (Applied Biosystem) y 0,175 µM de cada uno de los *primers* correspondientes (Tabla 8), en un volumen final de 20 µL.

El gen de control endógeno de amplificación o gen *housekeeping GAPDH* (Tabla 8) presenta en todas las muestras del estudio un nivel uniforme de expresión. Con lo cual, este gen de expresión constitutiva se emplea como referencia activa para normalizar, ya que permite eliminar los errores en el *input* de ARN y las variaciones en la eficiencia de la reacción de RT-PCR.

Los *primers* utilizados, tanto los diseñados para este trabajo como los citados por otros autores, amplifican más de un exón y/o su sitio blanco involucra a dos exones consecutivos. De esta manera se evita la amplificación de ADN genómico, debido a una posible contaminación de la muestra de ARN con este otro ácido nucleico.

La cuantificación relativa de cada gen en estudio o gen *target* se calcula mediante el método comparativo $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct \text{ gen } target - Ct \text{ gen } housekeeping$.

6.2.1. Validación del método comparativo $2^{-\Delta Ct}$

La aplicación del método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ para la cuantificación relativa de la expresión génica mediante qPCR requiere el cumplimiento de ciertos supuestos. Para que los resultados obtenidos por esta metodología sean válidos es necesario verificar: 1) que la eficiencia de la reacción de qPCR sea cercana al valor óptimo y 2) que la eficiencia de amplificación del gen *target* y del gen *housekeeping* sean iguales (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008).

6.2.1.1. Determinación de la eficiencia de la reacción de qPCR

La realización de una curva estándar permite calcular la eficiencia de la reacción de amplificación, la cual resulta específica del par de *primers* y de las condiciones utilizadas. Inicialmente y a fin de lograr curvas que permitan la cuantificación relativa en un rango dinámico adecuado, se evaluó la expresión de cada gen *target* mediante qPCR en diferentes condiciones de cultivo de una muestra de SP: a distintos tiempos (2, 4, 6 y 8 hs.) de estimulación con el agregado de lipopolisacárido (LPS) (10 µg LPS/mL de cultivo) y sin estimulación. Para la construcción de la curva estándar, se optó por trabajar con el ADNc del cultivo que presentó el menor valor de Ct (*threshold cycle*) para cada gen. A partir de esta muestra, se realizan diluciones seriadas 1/5 del ADNc y se amplifica cada punto de la curva por duplicado. Luego, se grafican los

valores de Ct *versus* el logaritmo de la concentración (dilución del ADNc) y se determina el valor de la pendiente de la recta resultante.

La eficiencia de amplificación se calcula a partir de la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$. El valor de la pendiente teórica debe ser igual a -3,32 si la eficiencia de amplificación es del 100% ($E = 2$). Los valores para las pendiente que se encuentran dentro del rango -3,10 a -3,58 y las eficiencias $2 \pm 5\%$ (1,9-2,1) son considerados valores aceptables para la aplicación de esta metodología (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008). Debido a que el *software* utilizado por el equipo *Rotor-Gene 6000* (Qiagen) considera $E = 1$ la eficiencia máxima, en este caso se aceptaron valores $1 \pm 10\%$ (0,9-1,1).

6.2.1.2. Determinación de la igualdad en las eficiencias de amplificación

Para testear, por un método sensible, si dos amplicones, en este caso el gen *target* y el gen *housekeeping*, presentan la misma eficiencia en la reacción de qPCR se analiza cómo varían los ΔCt en cada una de las diluciones de sus curvas estándar. De esta manera, se calcula el ΔCt para cada punto de dilución y se realiza una regresión lineal, donde la pendiente obtenida no debe ser estadísticamente diferente a cero. Este resultado indica que las eficiencias de amplificación del gen *target* y del gen *housekeeping* no difieren significativamente y, por lo tanto, es válido aplicar el método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ para la cuantificación relativa del gen de interés (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008).

7. Herramientas bioinformáticas

La notación de exones, promotores, sitios blancos de *primers* y los alineamientos de secuencia, entre otros, se realizan usando los programas SeqBuilder, EditSeq, MapDraw y MegAlign (*LaserGene*, *DNA Star*). El diseño de *primers* se efectúa mediante el uso del algoritmo BLAST (*basic local alignment search tool*), al cual se accede por medio del link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, o mediante la aplicación PrimerSelect (*LaserGene*, *DNA Star*). Los resultados de la secuenciación se analizan utilizando el programa *Mutation Surveyor* (*SoftGenetics*). El análisis de posibles ESEs (*Exonic Splicing Enhancers*) se realiza utilizando los programas ESE-Finder o GeneSplicer. Para todas las reacciones de PCRs se testearon en UCSC *Genome Bioinformatics Site* las correspondientes PCRs *in silico*. Las propiedades de los *primers* utilizados, principalmente para los estudios de expresión génica, se evalúan mediante el *software* IDT OligoAnalyzer 3.1 disponible en el link <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>, verificando la posibilidad de formación de

estructuras de *hairpin*, homodímeros y heterodímeros. La aplicación uMeltSM, a la cual se accede por medio del link: <https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>, se utiliza para predecir las curvas de *melting* de los productos de las qPCR.

8. Expresión plasmática de citoquinas

Los niveles plasmáticos de las citoquinas TNF- α , IFN- γ e IL-6 se determinan mediante un test de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizando el kit *BD Opt EIA* (*BD Biosciences*). El ensayo se realiza en placas de micro-titulación recubiertas con anticuerpos donde son añadidas las muestras. Luego, se agrega el segundo anticuerpo detector, específico para la citoquina a determinar, el cual está marcado con biotina. Se añade un polímero de estreptavidina conjugado con una enzima y, finalmente, se introduce un substrato cromogénico cuyo producto multicolor se determina por espectrofotometría. En colaboración con la Dra. Gabriela Salamone y la Lic. Soledad Gori, Laboratorio de Células Presentadoras de Antígenos e Inflamación, IMEX-CONICET/ ANM).

9. Estudios citogenéticos

Las muestras de MO (0,5-1 mL) se extraen mediante punción de cresta ilíaca o esternal utilizando heparina como anticoagulante. Los resultados citogenéticos se obtienen mediante cultivos de MO de corto término (24-48 hs.) en medio de cultivo RPMI 1640, F-10 o F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino, sin estimulación mitogénica. Luego de 24-48 hs. de cultivo, se adiciona colchicina 0,1 mg/mL y se deja actuar 60 min. Se centrifuga 10 min. a 150 g, se descarta el sobrenadante y se agregan 10 mL de solución hipotónica KCl 0,075 M, durante 30 min. a 37°C. Se centrifuga 10 min. a 150 g, se descarta el sobrenadante y se procede a la fijación en alcohol metílico:ácido acético (3:1). Una vez finalizado el procesamiento de la muestra, el material se extiende en portaobjetos y se procede con la identificación cromosómica, la cual se realiza mediante las técnicas de Bando G (citogenética convencional) e hibridización *in situ* con sondas fluorescentes (FISH: *fluorescent in situ hybridization*). El análisis se realiza al microscopio óptico (Bando G) o de fluorescencia (FISH). El cariotipo se designa acorde al *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) (Shaffer y col., 2013).

9.1. Bando G

Los extendidos citogenéticos son incubados a 37°C en una solución de tripsina al 1% p/v en NaCl 9% y Na₂HPO₄ 0,11 N en partes iguales, durante un tiempo tentativo entre 10 seg. y 2 min., dependiendo del envejecimiento del material. Luego, son coloreados con solución Giemsa al 8% v/v en *buffer* fosfato (KH₂PO₄ 0,06 M; Na₂HPO₄ 0,06 M) pH 6,8-7 y, por último, se procede a la observación al microscopio óptico (Seabright y col., 1971). Se analizan 20 metafases (como mínimo 11), dependiendo del índice mitótico del cultivo.

9.2. Bando DAPI

Los extendidos citogenéticos son coloreados con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) y luego analizados al microscopio de fluorescencia.

9.3. FISH

Con el fin de detectar alteraciones cromosómicas numéricas, anomalías estructurales, pérdida de genes o zonas específicas, son empleadas sondas: 1) centroméricas, que corresponden al ADN α -satélite del centrómero de cada cromosoma, 2) del total del cromosoma (WCP: *whole chromosome painting* o pintado cromosómico completo), que contienen secuencias homólogas únicas del ADN de cada cromosoma, y 3) secuencia o gen específicas, que permiten detectar una región o gen en particular. La lectura puede hacerse en núcleos interfásicos o en células en metafase, dependiendo de la sonda utilizada. Cada sonda, de acuerdo a su manufactura, posee variaciones en cuanto a los procedimientos técnicos a realizar.

Brevemente, primero se procede con la preparación del material a estudiar delimitando las áreas a hibridar con lápiz de diamante y se desnaturaliza el extendido durante 4 min. a 72-74°C en formamida 70%/ SSC 2X (SSC 1X: 0,150 M NaCl; 0,015 M citrato de sodio). Posteriormente, se lava el preparado durante 1 min. en alcoholes en concentración creciente (etanol 70%, 85% y 100%) y se deja secar. La sonda a utilizar se diluye en el *buffer* comercial, según especificaciones, luego, se desnaturaliza durante 5 min. a 72°C y se coloca en hielo. Una vez desnaturalizados, tanto el material a analizar como la sonda, se procede con la hibridación entre ambos a 37°C en cámara húmeda durante 12-14 hs. Por último, se procede con los lavados a 45°C: 3 veces con formamida 50%/ SSC 2X durante 10 min., en SSC 2X el mismo tiempo y, finalmente, en SSC 2X/ NP-40 0,1% durante 5 min. a temperatura ambiente. Una vez finalizado el procedimiento se deja secar, se tiñe con 20 μ L del colorante de elección, DAPI o yoduro de propidio, se

coloca un cubre-objeto y se observa al microscopio de fluorescencia con el filtro correspondiente, analizando 300-500 células.

9.4. Test clastogénico *in vitro* de sensibilidad al DEB

Las muestras de SP se extraen mediante punción venosa utilizando heparina como anticoagulante. Un mL de SP se siembra en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 15% de suero fetal bovino, utilizando fitohemaglutinina como agente mitogénico. Luego de 24 hs. de cultivo a 37°C, se agrega 0,1 µg/mL de DEB, a las 48 hs. posteriores se adiciona colchicina 0,1 mg/mL y se continua el proceso descrito anteriormente para el cultivo de muestras de MO. Una vez realizados los extendidos, se colorean con Giemsa al 8% v/v en *buffer* fosfato (KH₂PO₄ 0,06 M; Na₂HPO₄ 0,06 M) pH 6,8-7 y, por último, se procede a la observación al microscopio óptico (Auerbach y col., 1981). Se analizan 100 metafases por paciente a fin de evaluar la sensibilidad al DEB mediante el recuento de aberraciones cromosómicas y de tipo cromátide siguiendo la clasificación propuesta por el ISCN (Shaffer y col., 2013). El punto de corte histórico del Laboratorio de Genética Hematológica, IMEX-CONICET/ANM, es de 8 ± 6 roturas/ 100 células evaluadas. En la Figura 7 se muestran diferentes ejemplos de aberraciones observadas en un paciente con Anemia de Fanconi que presenta sensibilidad al DEB.

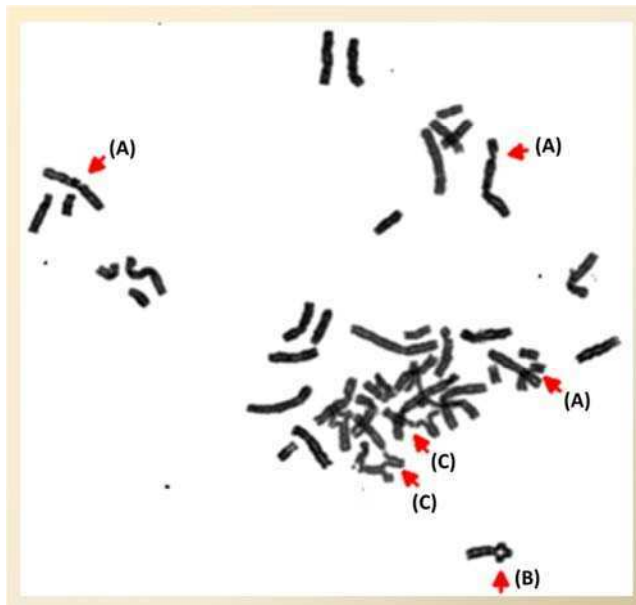


Figura 7: Metafase de un paciente que presenta sensibilidad al DEB

Las flechas indican algunas de las aberraciones citogenéticas más características observadas mediante tinción con Giemsa: roturas cromosómicas tipo cromátide (A) y figuras de intercambio: cuadrirradiales (B) y complejas (C).

9.5. Herramientas informáticas utilizadas para el análisis citogenético

El análisis microscópico, luego de aplicar la técnica de FISH y de bandeado DAPI, se realiza utilizando un microscopio de fluorescencia (*Olympus BX-63*). Las imágenes obtenidas se analizan utilizando los sistemas *Smart Capture software (Vysis)* o *Cytovision System Quotation (Applied Imaging)*. Asimismo, estos sistemas también son utilizados para analizar las imágenes provenientes luego de aplicar la técnica de citogenética convencional de bandeado cromosómico.

10. Análisis estadístico

Los datos se analizan utilizando los programas estadísticos InfoStat versión 2008 (Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y SPSS versión 17.00 (SPSS, Chicago, EE.UU.). La estadística descriptiva se presenta como: 1) frecuencias absolutas y frecuencias relativas como porcentajes, para los datos cualitativos y 2) media \pm desvío estándar (DE) y/o mediana y rango, para los datos cuantitativos.

Los diferentes análisis estadísticos de los datos incluyen: 1) test exacto de *Fisher* o test Chi-cuadrado: para el análisis de frecuencias genotípicas y alélicas, de otras variables categóricas y de diferentes tablas de contingencia planteadas, calculando el *Odds ratio* (OR) asociado en los casos que corresponda; 2) test de *t*, test de *Mann-Whitney*, ANOVA o test de *Kruskal-Wallis*: para el estudio de variables continuas (parámetros clínicos, niveles de expresión, otros), dependiendo de las características de la variable a analizar (cumplimiento o no de normalidad y homocedasticidad) y del número de grupos a comparar; 3) coeficiente de correlación de *Spearman*: para el análisis de asociación entre variables; 4) método según *Kaplan-Meier* y test de *Log-Rank*: para la comparación de curvas de supervivencia (Kaplan y Meier, 1958); y 5) análisis multivariados: análisis de correspondencia simple y múltiple (Greenacre, 1984). Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

El desequilibrio de ligamiento (valor D') entre el SNP +874 A/T (rs2430561) y el polimorfismo de repetición +875 CAn (rs587776821) del gen *IFNG* se calcula de acuerdo a Maynard (Maynard, 1998) utilizando la fórmula $D' = (p_{ab} \times p_{AB} - p_{aB} \times p_{Ab}) / (p_{ab} \times p_{AB} + p_{aB} \times p_{Ab})$. El parámetro D' puede variar de -1 a 1 indicando máximo desequilibrio en los extremos; mientras que, $D' = 0$ indica un equilibrio perfecto.

***Resultados – Capítulo 1: Estudio de
polimorfismos***

1. Poblaciones estudiadas y caracterización citogenética de la AA

1.1. Pacientes y controles

Se analizó un total de 332 muestras de ADN, de las cuales 69 corresponden a pacientes con AA, 132 a pacientes con SMD y 131 a individuos controles. Las muestras de los pacientes, provenientes de diferentes instituciones argentinas de salud, se analizaron al momento del diagnóstico y/o durante el seguimiento.

Los pacientes con AA fueron diagnosticados y clasificados en cuanto a la severidad de la enfermedad acorde a los criterios definidos por Camitta y col. (Camitta y col., 1975), el *International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study group* (IAAAS, 1987) y Bacigalupo y col. (Bacigalupo y col., 1988) (ver Introducción sección 4). Las características clínicas al diagnóstico de la población de pacientes con AA se detallan en la Tabla 9. Además, también se especifica el tratamiento inicial que recibieron los pacientes y la respuesta a la TIS, la cual fue evaluada a 6 meses de haber comenzado el tratamiento combinado de GAT y CsA (Tabla 9), de acuerdo a los criterios de respuesta anteriormente definidos (ver Introducción sección 5.1).

Los pacientes con SMD *de novo* fueron diagnosticados y clasificados según la OMS (Lee Harris y col., 1999; Jaffe y col., 2001 Vardiman y col., 2009) (ver Introducción sección 8.1). Las características clínicas al diagnóstico de la población de pacientes estudiados con SMD; así como también, la sobrevida y progresión a LMA, se detallan en la Tabla 10.

El grupo de individuos controles presentó una edad media de 41 años (\pm DE: 14) con una mediana de 38 años (rango: 10-76). La relación de géneros masculino/femenino fue de 75/48:1,6 (8 no determinados).

Tabla 9: Características clínicas de la población de pacientes con AA

Características	
Edad (años)	
Media \pm DE	23 \pm 18
Mediana (rango)	16 (2-74)
Relación de géneros	
Masculino/femenino	34/35: 1,0
Nivel de Hb (g/dL)	
Media \pm DE	7,2 \pm 2,1
Mediana (rango)	7,3 (3,0-11,5)
Recuento de Pq (μL)	
Media \pm DE	17314 \pm 16567
Mediana (rango)	11300 (1000-68000)
Recuento de N (μL)	
Media \pm DE	672 \pm 571
Mediana (rango)	503 (0-2340)
Reticulocitos (%)	
Media \pm DE	0,6 \pm 0,6
Mediana (rango)	0,5 (0,0-2,8)
Clasificación de acuerdo a la severidad de la enfermedad, n (%)	
AA muy severa	14 (20)
AA severa	41 (60)
AA moderada	9 (13)
n.d.	5 (7)
Tratamiento inicial, n (%)	
TCPH con donante relacionado	8 (12)
TIS (5 pacientes recibieron un TCPH al no responder a las TIS)	49 (71)
Otros tratamientos (oximetolona, G-CSF)	8 (11)
n.d.	4 (6)
Evaluación de respuesta a la TIS (GAT y CsA) n=38	
Respuesta global (RC o RP), n (%)	
Si	26 (68)
No	12 (32)

DE: desvío estándar; Hb: hemoglobina; Pq: plaquetas; N: neutrófilos; n.d.: no determinado; TCPH: trasplante de células progenitoras hematopoyéticas; TIS: terapia inmunosupresora; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos (*granulocyte colony-stimulating factor*); GAT: globulina anti-timocítica; CsA: Ciclosporina; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial.

Tabla 10: Características clínicas de la población de pacientes con SMD

Características	
Edad (años)	
Media ± DE	62 ± 16
Mediana (rango)	64 (14-89)
Relación de Sexos	
Masculino/femenino	71/61: 1,2
Nivel de Hb (g/dL)	
Media ± DE	9,4 ± 2,3
Mediana (rango)	9,4 (4,4-14,8)
Recuento de Pq (/μL)	
Media ± DE	163587 ± 133730
Mediana (rango)	130000 (5000-650000)
Recuento de N (/μL)	
Media ± DE	2095 ± 1655
Mediana (rango)	1728 (117-10200)
Blastos en MO (%)	
Media ± DE	3,8 ± 5,2
Mediana (rango)	1,0 (0,0-17,5)
Clasificación de acuerdo a la OMS, n (%)	
CRDU	21 (16)
ARSA	4 (3)
Síndrome 5q-	5 (4)
CRDM/ -AS	46 (35)/ -9 (7)
CR s.d.	7 (5)
AREB-1	14 (10)
AREB-2	26 (20)
Cariotipo, n (%)	
Normal	66 (50)/ (53)*
Alterado	58 (44)/ (47)*
n.e.	8 (6)
Seguimiento (meses)	
Mediana (rango)	26,4 (1,1-174,6)
Sobrevida	
Mediana, meses	55,5
Óbitos, n (%)	69 (52)
Evolución a LMA	
Sobrevida libre (25%), meses	26,1
Eventos, n (%)	34 (26)

DE: desvío estándar; Hb: hemoglobina; Pq: plaquetas; N: neutrófilos; CRDU: citopenia refractaria con displasia unilínaje; ARSA: anemia refractaria con siderablastos en anillo; CRDM: CR con displasia multilínaje; CR s.d.: CR sin dato de displasia; AREB-1 y -2: AR con exceso de blastos tipo 1 y 2; n.e.: no evaluable; LMA: Leucemia Mieloide Aguda. * Porcentajes excluyendo los cariotipos n.e.

1.2. Estudios citogenéticos en AA

1.2.1. Cariotipos obtenidos

A fin de investigar las alteraciones citogenéticas clonales cuyos hallazgos contribuyen al diagnóstico diferencial entre AA y SMD, se analizaron 50 muestras de MO de pacientes con AA al momento del diagnóstico, mediante técnicas de citogenética convencional. Los 19 pacientes restantes no poseen datos de la realización del estudio citogenético en MO en su historia clínica al momento del diagnóstico.

De las 50 muestras cultivadas, 8 (16%) no mostraron células en división. El resultado citogenético fue informativo en 42 pacientes, los cuales presentaron cariotipo normal al diagnóstico. Sin embargo, 3 pacientes con diagnóstico presuntivo de AA presentaron un cariotipo alterado al diagnóstico, los cuales fueron reclasificados como SMD. Los cariotipos alterados fueron: 46, XX, del(13)(q12q14) [3]/ 46, XX [9]; 46, XY, -6, +M [2]/ 46, XY [11] y 46, XY, del(6q) [3]/ 46, XY [9]; los cuales involucran una delección del brazo largo del cromosoma 13, una monosomía del cromosoma 6 más la presencia de un cromosoma marcador y una delección del brazo largo del cromosoma 6, respectivamente. Además, 3 pacientes con AA adquirieron una alteración citogenética luego de 5 años de su diagnóstico. Los cariotipos alterados fueron: 47, XX, +8 [5]/ 46, XX [4]; 46, XY, del(20)(q11.2)[8]/ 46, XY[12] y 46, XX, der(2)t(1;2?)(q23;q36?), add(7p), del(8)(q21), der(9)add(9)(q34) [c.p.12]; los cuales involucraron una trisomía del cromosoma 8, una delección del brazo largo del cromosoma 20 y un cariotipo complejo, respectivamente.

1.2.2. Estudios citomoleculares

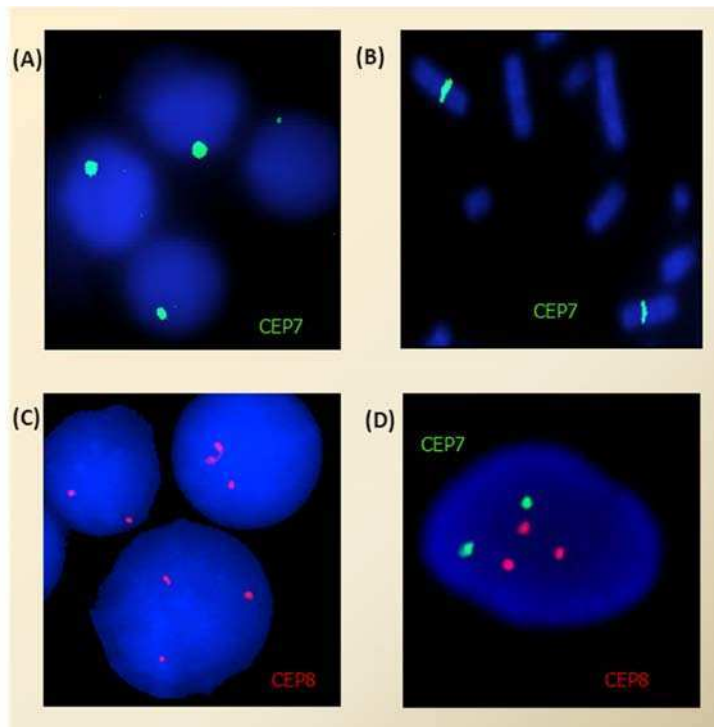
El resultado citogenético no informativo debido a la ausencia de células en división, como posible consecuencia de la falla medular que presentan los pacientes con AA, es una de las limitaciones de la técnica de citogenética convencional. Con lo cual, se aplicó la técnica de citogenética molecular FISH para determinar alteraciones en células en interfase, en aquellos pacientes que no presentaron material apto para el establecimiento del cariotipo al diagnóstico.

Se realizó la búsqueda de las aneuploidías más frecuentes descritas en AA, trisomía del cromosoma 8 y monosomía del 7, en 6 pacientes cuyo estudio citogenético convencional al diagnóstico había resultado no evaluable. Se siguieron los protocolos establecidos utilizando las sondas centroméricas CEP7 (*7p11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA, spectrum green; Vysis, Abbot Molecular Diagnosis*) y CEP8 (*8p11.1-q11.1 Alpha*

Satellite DNA, spectrum orange; Vysis, Abbot Molecular Diagnosis), analizándose en cada caso 300 núcleos interfásicos (Figura 8). Se estudiaron 3 controles normales a fin de establecer los puntos de corte (media + 3xDE) para las sondas centroméricas de los cromosomas 7 y 8, los cuales se establecieron en 7,4% (4,4% + 3x1,0) y 3,5% (2,3% + 3x0,4), respectivamente. Además, se analizó un control con cariotipo 46, XY, -7, +21 [12]/ 46, XY [3], para el cual se obtuvo un 73% de células con monosomía 7; y otro control con cariotipo 47, XX, +8 [8]/ 46, XX [12], en donde las células con trisomía 8 alcanzaron un 34%.

Ninguno de los 6 pacientes con cariotipo no evaluable analizados presentaron aneuploidías para los cromosomas estudiados mediante esta técnica.

Figura 8: Detección de las aneuploidías más frecuentes descritas en AA: trisomía del cromosoma 8 y monosomía del 7



Búsqueda de aneuploidías más frecuentes mediante la técnica de FISH: (A) Núcleos en interfase utilizando la sonda centromérica del cromosoma 7 (CEP7; *spectrum Green*, verde) en la cual se la observa monosomía del cromosoma 7 detectada en el caso control. (B) Metafase (parcial) disómica para el cromosoma 7 utilizando la sonda CEP7; (C) Núcleos en interfase utilizando la sonda CEP8 (*spectrum Orange*, rojo) en la cual se la observa trisomía del cromosoma 8 detectada en el caso control, (D) Núcleo en interfase co-hibridado con las sondas CEP7 y CEP8, en la cual se la observa disomía del cromosoma 7 y trisomía del cromosoma 8 detectada en el caso control.

1.2.3. Test de sensibilidad al DEB

El ensayo de estrés clastogénico *in vitro*, en donde se analizan roturas cromosómicas inducidas por agentes alquilantes como el DEB, se aplicó para descartar el diagnóstico del SFM congénito AF, a partir de muestras de SP de los pacientes (ver Introducción secciones 4 y 8; Materiales y métodos sección 9.4).

El test fue realizado en 31 pacientes con AA y el número de roturas evaluadas se encontró dentro de los valores normales en todos los casos. Por lo tanto, los pacientes evaluados no presentaron sensibilidad al DEB. Este grupo de pacientes mostró una media de edad de 13 años (\pm DE: 10) y mediana de 12 años (rango: 2-47), lo cual refleja principalmente la edad joven de solicitud del estudio para el establecimiento del diagnóstico diferencial.

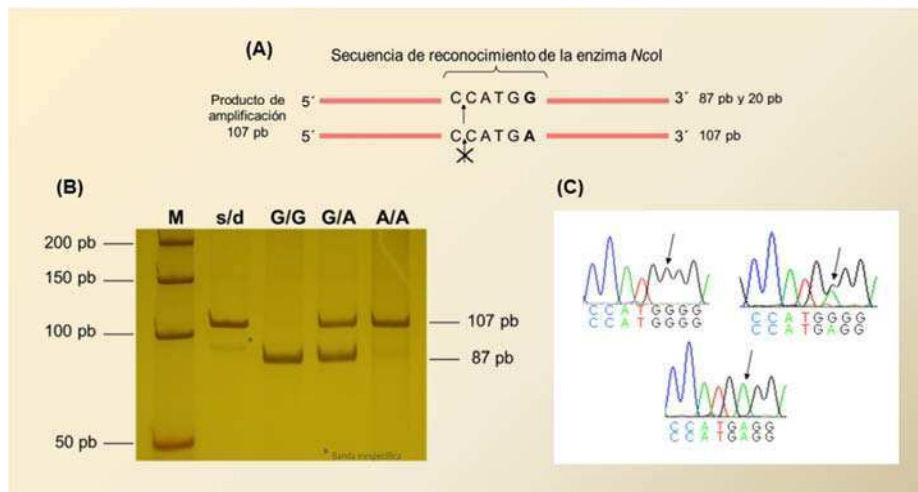
2. Estudio de polimorfismos en genes de citoquinas

2.1. Determinación de los polimorfismos en los *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*

2.1.1. SNP -308 G/A (*TNF*)

La Figura 9 muestra la determinación del SNP -308 G/A del gen *TNF* mediante la técnica PCR-RFLP utilizando la enzima *NcoI*. Los patrones de restricción obtenidos correspondientes a los diferentes genotipos fueron confirmados por secuenciación automática. La presencia del alelo -308A se encuentra asociado a su mayor producción y, por lo tanto, los genotipos A/A+G/A y G/G se relacionan con una alta y baja producción de *TNF*, respectivamente (Kroeger y col., 1997).

Figura 9: Determinación del SNP -308 G/A del gen *TNF* mediante PCR-RFLP



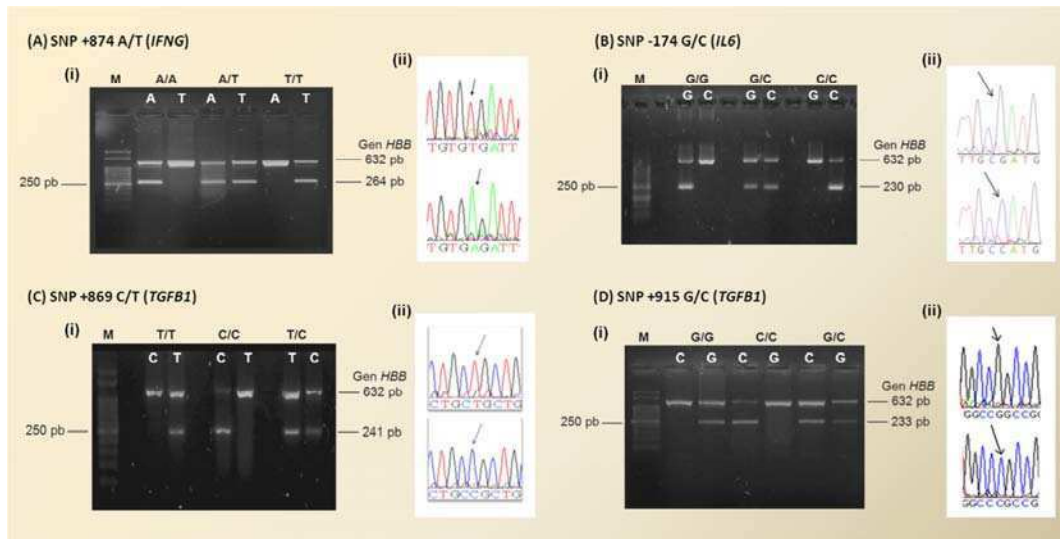
(A) Representación esquemática de la PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción *NcoI*. En presencia de la variante -308G, la enzima cliva al producto de 107 pb en dos fragmentos de 87 pb y 20 pb; mientras que, en presencia de la variante -308A, la enzima pierde su sitio de reconocimiento y se mantiene el producto amplificado original. (B) Gel de poliacrilamida (7cm de longitud, 12% de poliacrilamida) revelado mediante tinción con nitrato de plata, mostrando los diferentes patrones de digestión obtenidos para cada genotipo: G/G, G/A y A/A. (C) Electroferogramas correspondientes a los diferentes genotipos. M: marcador de peso molecular; s/d: sin digerir.

2.1.2. SNPs +874 A/T (*IFNG*), -174 G/C (*IL6*) y, +869 C/T y +915 G/C (*TGFB1*)

La determinación de los SNPs +874 A/T del gen *IFNG*, -174 G/C del gen *IL6* y, +869 C/T y +915 G/C del gen *TGFB1*, se realizó mediante la metodología de PCR-alelo específica, en *multiplex* con el gen *HBB* como control interno de amplificación. Los patrones correspondientes a los diferentes genotipos para cada uno de los SNPs, fueron confirmados mediante secuenciación automática (Figura 10).

El SNP +874 A/T se encuentra ubicado en el primer intrón del gen *IFNG* y coincide con un sitio de unión del factor de transcripción NF- κ B, el cual regula su transcripción. La unión del factor NF- κ B es preferencial en presencia del alelo +874T, con lo cual, los genotipos T/T, T/A y A/A se asocian con una producción alta, intermedia y baja de *IFNG*, respectivamente (Pravica y col., 1999; Pravica y col., 2000).

Figura 10: Determinación de los SNPs +874 A/T del gen *IFNG*, -174 G/C del gen *IL6* y, +869 C/T y +915 G/C del gen *TGFB1* mediante PCR-alelo específica



Genotipificación utilizando la metodología PCR-alelo específica. (A) SNP +874 A/T del gen *IFNG* (electroferogramas correspondientes a la secuencia *reverse*); (B) SNP -174 G/C del gen *IL6*; (C) SNP +869 C/T del gen *TGFB1*; y (D) SNP +915 G/C del gen *TGFB1*. (i) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando los diferentes patrones obtenidos para los genotipos correspondientes. (ii) Electroferogramas confirmando las variantes alélicas, respectivamente. M: marcador de peso molecular; *HBB*: gen control interno de amplificación.

El SNP -174 G/C se encuentra ubicado en la región promotora del gen *IL6* afectando un elemento de respuesta a glucocorticoides, influenciando potencialmente la capacidad para reprimir la activación transcripcional. El alelo -174C está asociado con una baja producción tanto *in vitro* como *in vivo*; y, por lo tanto, los genotipos G/G, G/C

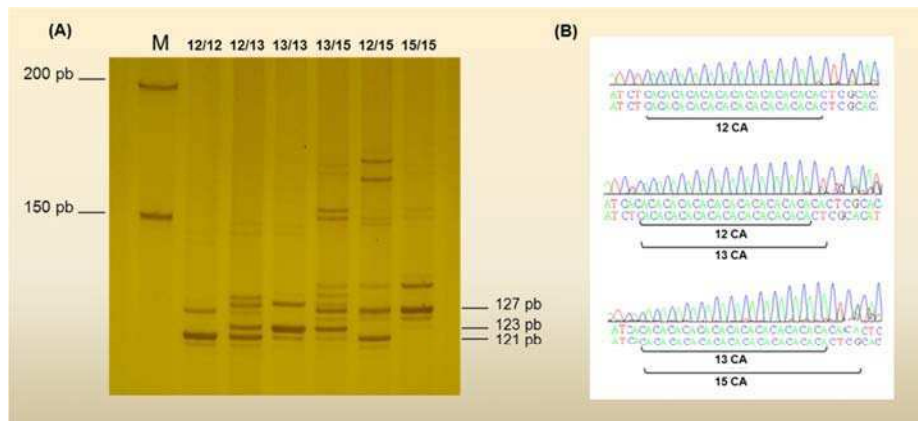
y C/C se relacionan con una producción alta, intermedia y baja de esta citoquina, respectivamente (Fishman y col., 1998).

Los SNPs +869 C/T y +915 G/C se ubican en el primer exón del gen *TGFB1* y generan cambios en la hidrofobicidad del péptido señal, afectando el transporte de la proteína hacia el exterior celular. En consecuencia, los genotipos +869 codón 10: T/T, T/C y C/C; y +915 codón 25: G/G, G/C y C/C, se encuentran asociados con una producción alta, intermedia y baja de TGF- β 1, respectivamente (Perrey y col., 1999).

2.1.3. Polimorfismo de repetición +875 CAn (*IFNG*)

La determinación del polimorfismo de repetición +875 CAn del gen *IFNG* se realizó mediante la amplificación por PCR de la región microsatélite y posterior resolución de los productos obtenidos en un gel de poliacrilamida. Los distintos alelos encontrados difieren en el número de repeticiones presentes del dinucleótido CA y los patrones correspondientes a los diferentes genotipos fueron confirmados por secuenciación automática (Figura 11). La variante correspondiente al número 12 de repeticiones CA se asocia con una mayor producción de IFN- γ , principalmente como consecuencia de la fuerte asociación con el alelo +874T (Pravica y col., 1999; Pravica y col., 2000). Agrupando los genotipos de acuerdo a la presencia del alelo de interés 12 CA (indicado como tal) y a la presencia de cualquiera de los otros alelos (indicado como no-12 CA), los genotipos 12/12 CA, 12/no-12 CA y no-12/no-12 CA se asocian con una producción alta, intermedia y baja de esta citoquina, respectivamente.

Figura 11: Determinación del polimorfismo de repetición +875 CAn del gen *IFNG*



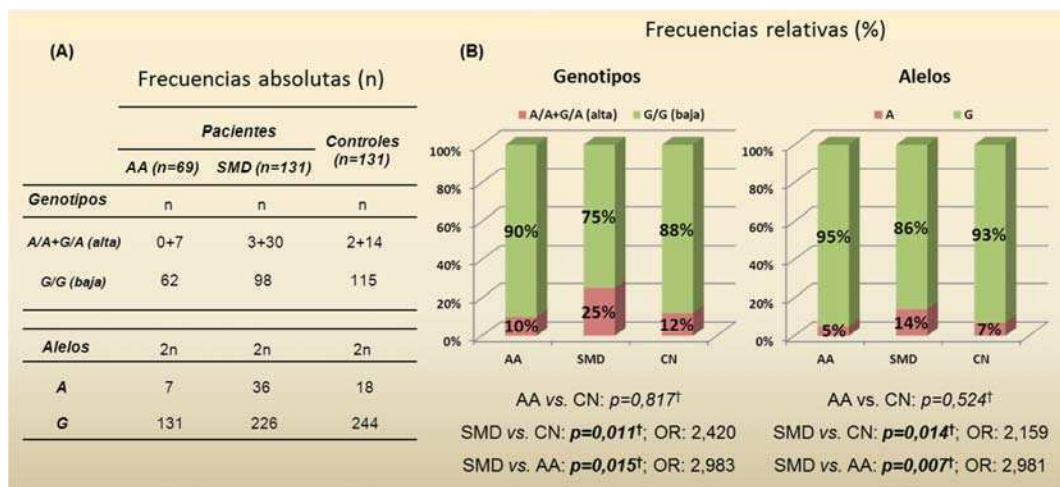
(A) Genotificación mediante amplificación por PCR y electroforesis en gel de poliacrilamida (20 cm de longitud, 10% de poliacrilamida) revelado mediante tinción con nitrato de plata. (B) Electroferogramas correspondientes a los genotipos 12/12 CA, 12/13 CA y 13/15 CA. M: marcador de peso molecular.

2.2. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*

2.2.1. SNP -308 G/A (*TNF*)

Se analizó el polimorfismo -308 G/A del gen *TNF* en los pacientes con AA (n=69), SMD (n=131) y en la población control (n=131). La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas se detallan en la Figura 12. Los resultados obtenidos del estudio de este SNP muestran que la frecuencia del genotipo A/A+G/A, asociado a mayor producción de *TNF*, se encuentra duplicada en los pacientes con SMD respecto a la población control ($p=0,011$, OR: 2,420), siendo esta diferencia aún mayor respecto a AA ($p=0,015$, OR: 2,983). No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre la población de AA *versus* la población control.

Figura 12: Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -308 G/A del gen *TNF*



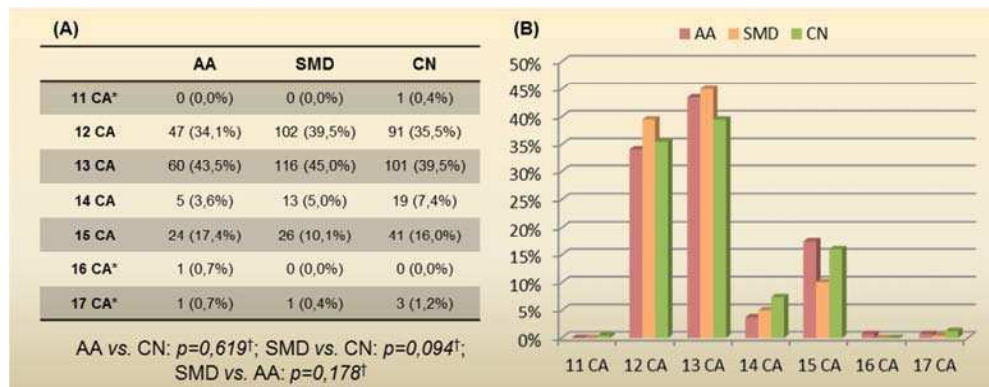
Estudio del SNP -308 G/A del gen *TNF* en los pacientes con AA, SMD y en los controles normales (CN). (A) Frecuencias genotípicas y alélicas absolutas. (B) Gráficos de barras indicando las frecuencias genotípicas y alélicas relativas. [†] Test exacto de Fisher, OR: Odds ratio.

2.2.2. Polimorfismo de repetición +875 CAn y SNP +874 A/T (*IFNG*)

Se analizaron los polimorfismos +875 CAn y +874 A/T del gen *IFNG* en los pacientes con AA (n=69), SMD (n=131) y en la población control (n=128). Para el polimorfismo de repetición +875 CAn, pudieron describirse 7 alelos diferentes: 11 CA, 12 CA, 13 CA, 14 CA, 15 CA, 16 CA y 17 CA, y la distribución de sus frecuencias se muestran en la Figura 13. Los alelos 12 CA y 13 CA son los que presentaron los mayor frecuencia. No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias alélicas de

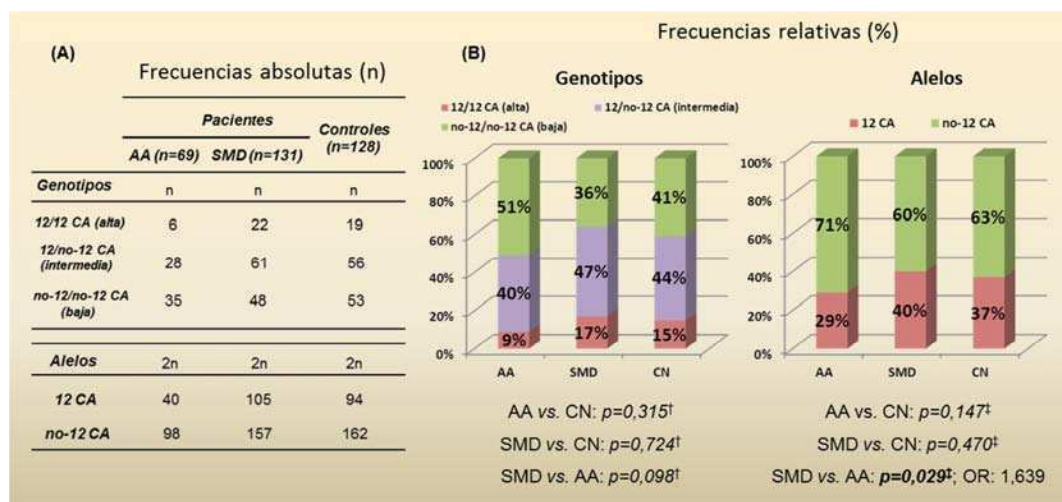
cada población de pacientes *versus* la población control. En la Figura 14 puede observarse la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas, agrupando los genotipos de acuerdo a la presencia del alelo de interés 12 CA. No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de cada población de pacientes *versus* la población control. Sin embargo, los resultados arrojaron que la población de pacientes con SMD presentó una mayor frecuencia del alelo 12 CA respecto a la población de AA ($p=0,029$; OR: 1,639).

Figura 13: Frecuencias alélicas del polimorfismo de repetición +875 CAn del gen *IFNG*



Estudio del polimorfismo de repetición +875 CAn del gen *IFNG* en los pacientes con AA, SMD y en los controles normales (CN). (A) Tabla que detalla las frecuencias alélicas absolutas y relativas. (B) Gráfico de barras mostrando la distribución de las frecuencias alélicas relativas. * Los alelos con frecuencias muy bajas fueron agrupados para aplicar el test Chi-cuadrado. † Test Chi-cuadrado.

Figura 14: Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo de repetición +875 CAn, agrupado de acuerdo a la presencia del alelo 12 CA, del gen *IFNG*



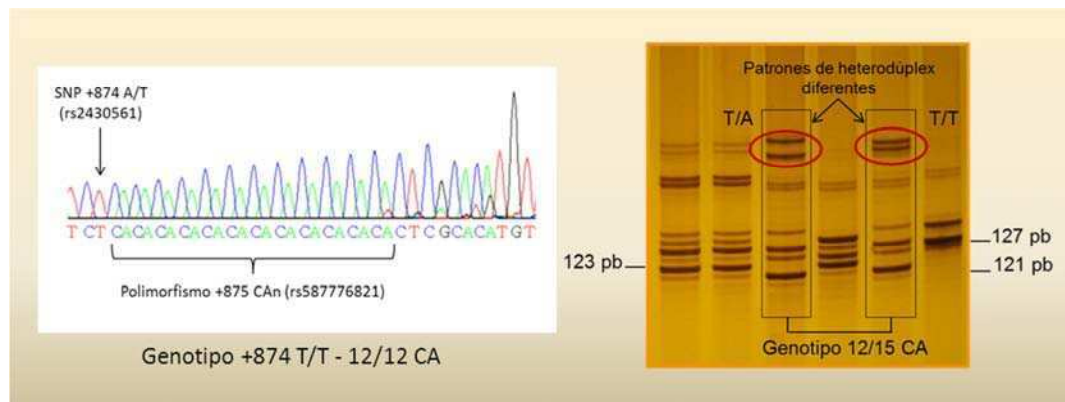
Estudio del polimorfismo de repetición +875 CAn del gen *IFNG*, agrupando los genotipos de acuerdo a la presencia del alelo 12 CA, en los pacientes con AA, SMD y en los controles normales (CN). (A) Frecuencias genotípicas y alélicas absolutas. (B) Gráficos de barras indicando las frecuencias genotípicas y alélicas relativas. † Test Chi-cuadrado, ‡ test exacto de Fisher, OR: Odds ratio.

2.2.2.1. Desequilibrio de ligamiento

Como ya se mencionó anteriormente, el SNP +874 A/T se encuentra ubicado contiguo al polimorfismo de repetición +875 CAn hacia su extremo 5', en el primer intrón del gen *IFNG* (Figura 15 A). Si bien existe una fuerte asociación entre los alelos +874T y 12 CA, se encontraron 15 casos donde esta correlación no fue absoluta. Estos casos mostraron un patrón de heterodúplex en el gel de poliacrilamida diferente del resto de las muestras que presentaron el mismo genotipo (Figura 15 B), lo cual fue confirmado tanto por secuenciación automática como por la PCR-alelo específica correspondiente.

La estimación del desequilibrio de ligamiento se realizó utilizando la fórmula $D' = (p_{+874T \text{ y } 12 \text{ CA}} \times p_{+874A \text{ y no-12 CA}} - p_{+874T \text{ y no-12 CA}} \times p_{+874A \text{ y } 12 \text{ CA}}) / (p_{+874T \text{ y } 12 \text{ CA}} \times p_{+874A \text{ y no-12 CA}} + p_{+874T \text{ y no-12 CA}} \times p_{+874A \text{ y } 12 \text{ CA}})$, donde p es la frecuencia absoluta correspondiente en cada caso (Maynard, 1997). Este parámetro D' no depende de las frecuencias alélicas y es un número que indica el alejamiento del equilibrio de ligamiento que puede variar desde -1 a 1, donde el desequilibrio es máximo, existiendo un equilibrio perfecto cuando $D'=0$. Como resultado de la determinación de ambos polimorfismos, se encontró un fuerte desequilibrio de ligamiento entre el alelo +874T y el alelo 12 CA obteniéndose un $D'=0,99$. Debido a la fuerte asociación entre los alelos +874T y 12 CA, los resultados del SNP +874 A/T (datos no mostrados) son similares a los obtenidos para el polimorfismo de repetición +875 CAn agrupado de acuerdo a la presencia del alelo 12 CA.

Figura 15: Desequilibrio de ligamiento entre los alelos +874T y 12 CA

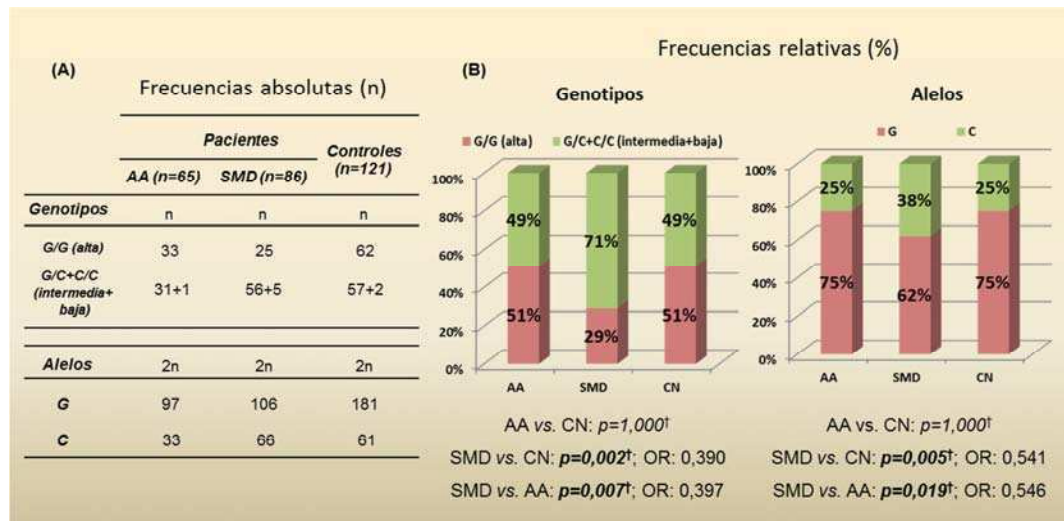


(A) Electroferograma indicando la ubicación del SNP +874 A/T ubicado contiguo al polimorfismo de repetición +875 CAn hacia su extremo 5', en el primer intrón del gen *IFNG*. (B) Ejemplo de un patrón de heterodúplex diferente del resto de las muestras que presentaron el mismo genotipo en el análisis del polimorfismo de repetición +875 CAn, luego de la electroforesis en el gel de poliacrilamida (20 cm de longitud, 10% de poliacrilamida) revelado mediante tinción con nitrato de plata. Estos patrones diferentes se detectan en aquellos casos donde no se observa el ligamiento entre los alelos +874T y 12 CA.

2.2.3. SNP -174 G/C (IL6)

Se analizó el SNP -174 G/C del gen *IL6* en los pacientes con AA (n=65), SMD (n=86) y en la población control (n=121). La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo se muestran en la Figura 16. Los resultados obtenidos muestran que la frecuencia del genotipo G/G, asociado a mayor producción de *IL6*, se encuentra disminuida en la población de pacientes con SMD tanto respecto a los controles ($p=0,002$, OR: 0,390) como a la población de AA ($p=0,007$, OR: 0,397). No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre la población de AA *versus* la población control.

Figura 16: Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -174 G/C del gen *IL6*



Estudio del SNP -174 G/C del gen *IL6* en los pacientes con AA, SMD y en los controles normales (CN). (A) Frecuencias genotípicas y alélicas absolutas; (B) Gráfico de barras indicando las frecuencias genotípicas y alélicas relativas. a Test exacto de Fisher, OR: Odds ratio.

2.2.4. Polimorfismos en el gen *TGFB1*

2.2.4.1. SNPs +869 C/T y +915 G/C

El análisis del SNP +869 C/T se realizó en una población de 64 pacientes con AA, 74 pacientes con SMD y 130 individuos controles. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron: 17/64 (27%) [T/T], 32/64 (50%) [T/C] y 15/64 (23%) [C/C] en AA; 22/74 (30%), 34/74 (46%) y 18/74 (24%) en SMD; y 40/130 (31%), 53/130 (41%) y 37/130 (29%) en controles, respectivamente, no encontrando diferencias significativas (test Chi-cuadrado: AA vs. Controles: $p=0,473$; SMD vs. Controles: $p=0,736$; AA vs. SMD: $p=0,882$). Las frecuencias alélicas halladas fueron: 66/128 (52%) [T] y 62/128

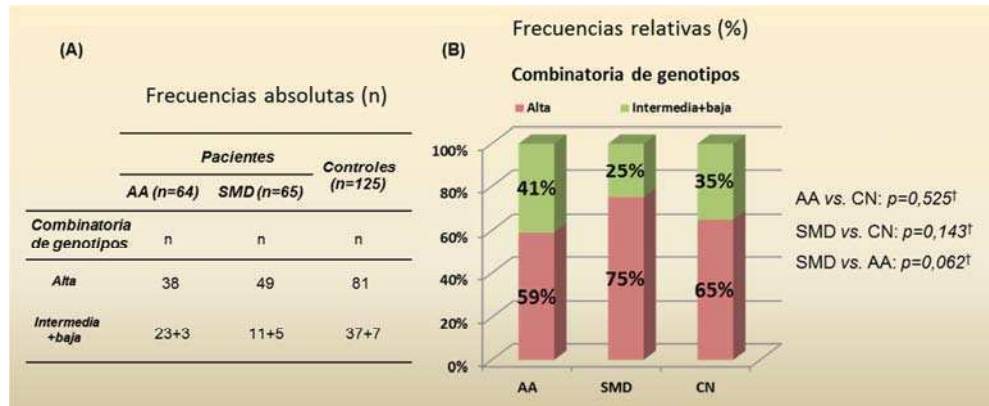
(48%) [C] en AA; 78/148 (53%) y 70/148 (47%) en SMD; y 133/260 (51%) y 127/260 (49%) en controles, respectivamente, las cuales no mostraron diferencias significativas (test exacto de Fisher: AA vs. Controles: $p=1,000$; SMD vs. Controles: $p=0,837$; AA vs. SMD: $p=0,904$).

Con respecto al estudio del SNP +915 G/C, se analizaron 66 pacientes con AA, 75 pacientes con SMD y 125 individuos controles. Las frecuencias genotípicas halladas fueron: 52/66 (79%) [G/G] y (14+0)/66 (21%) [G/C+C/C] en AA; 62/75 (83%) y (12+1)/75 (17%) en SMD; y 110/125 (88%) y (13+2)/125 (12%) en controles, respectivamente, no encontrando diferencias significativas (test exacto de Fisher: AA vs. Controles: $p=0,136$; SMD vs. Controles: $p=0,301$; AA vs. SMD: $p=0,669$). Las frecuencias alélicas mostraron los siguientes resultados: 118/132 (89%) [G] y 14/132 (11%) [C] en AA; 136/150 (91%) y 14/150 (9%) en SMD; y 233/250 (93%) y 17/250 (7%) en controles, respectivamente, las cuales no mostraron diferencias significativas (test exacto de Fisher: AA vs. Controles: $p=0,237$; SMD vs. Controles: $p=0,440$; AA vs. SMD: $p=0,842$).

2.2.4.2. Combinatoria de los SNPs +869 C/T y +915 G/C

El análisis de ambos SNPs permitió determinar la combinatoria de genotipos SNP +869 C/T - SNP +915 G/C, la cual se asocia a una producción diferencial de TGF- β 1, de la siguiente manera: T/T-G/G y T/C-G/G (alta); T/C-G/C, C/C-G/G y T/T-G/C (intermedia); C/C-G/C, C/C-C/C, T/T-C/C y T/C-C/C (baja) (Perrey y col., 1999). En este caso, se evaluaron las muestras que presentaron un resultado informativo para ambos SNPs, las cuales incluyeron 64 pacientes con AA, 65 con SMD y 125 controles. Las frecuencias de la combinatoria de los SNPs se detallan en la Figura 17, las cuales no mostraron diferencias significativas al comparar cada población de pacientes *versus* la población control. Sin embargo, la población de pacientes con SMD presentó una tendencia a una mayor frecuencia de genotipos asociado a alta producción de TGF- β 1 respecto a la población de AA ($p=0,062$) (Figura 17).

Figura 17: Frecuencias de la combinatoria de genotipos SNP +869 C/T - SNP +915 G/C del gen *TGFB1*



Estudio de la combinatoria de genotipos SNP +869 C/T - SNP +915 G/C del gen *TGFB1* en los pacientes con AA, SMD y en los controles normales (CN). (A) Frecuencias absolutas. (B) Gráfico de barras indicando las frecuencias relativas. † Test exacto de Fisher.

2.3. Asociación de los polimorfismos en los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1* con características clínicas en AA y SMD

2.3.1. Asociación con parámetros clínicos en AA

Se analizaron diferentes características clínicas al diagnóstico de los pacientes con AA en relación a la presencia de los polimorfismos estudiados (Tablas 11 y 12). Los parámetros evaluados fueron: edad, relación de géneros, nivel de hemoglobina, recuento de plaquetas, recuento de neutrófilos, porcentaje de reticulocitos y clasificación con respecto a la severidad de la enfermedad. Las variables que indican el grado de las citopenias fueron categorizadas considerando, para el recuento de plaquetas y neutrófilos, las definiciones de los criterios de severidad y, para el nivel de hemoglobina, la media poblacional. Además, fue evaluada la respuesta a la TIS en relación a la presencia de los polimorfismos estudiados, solo en aquellos pacientes con AA tratados con la combinación de GAT y CsA, según las definiciones de RC y RP (ver Introducción sección 5.1). La respuesta global a la TIS fue considerada en pacientes que alcanzaron una RC o RP luego de 6 meses de haber iniciado el tratamiento (Tabla 13).

2.3.1.1. Asociación con características clínicas al diagnóstico

El análisis del SNP -308 G/A del gen *TNF* mostró que la presencia del alelo -308A se asoció con una edad menor (12 vs. 17 años; $p=0,030$), una neutropenia más severa

(200 vs. 520/ μ L; $p=0,025$) y con un mayor riesgo de presentar recuentos de neutrófilos $\leq 200/\mu$ L (4/7, 57% vs. 10/57, 17%; $p=0,036$, OR: 6,267), al diagnóstico. El genotipo A/A+G/A, asociado a una alta producción de *TNF*, mostró una frecuencia mayor en los pacientes clasificados como AA muy severa (4/7, 57% vs. 10/57, 17%; $p=0,047$), lo cual es consistente con la asociación encontrada entre el alelo -308A y una neutropenia más profunda (Tabla 11).

Con respecto al gen *IFNG*, el análisis del polimorfismo de repetición +875 CAn, agrupado de acuerdo al alelo 12 CA, reveló que la presencia de este alelo en el genotipo (12/12 CA + 12/no-12 CA) se asoció con un grado de anemia más severa (6,8 vs. 7,9 g/dL; $p=0,035$) y con un mayor riesgo de presentar niveles de hemoglobina < 7 g/dL (21/37, 57% vs. 8/19, 30%; $p=0,043$, OR: 3,117), al diagnóstico (Tabla 11). En el análisis del SNP +874 A/T del gen *IFNG* fue encontrada la misma asociación entre el alelo +874T y el grado de anemia, debido al fuerte desequilibrio de ligamiento entre este alelo y el alelo 12 CA.

El estudio del SNP -174 G/C del gen *IL6* no arrojó diferencias significativas en relación a las características clínicas analizadas (Tabla 11).

En cuanto a los polimorfismos del gen *TGFB1*, los SNPs +869 C/T y +915 G/C no mostraron asociación con los parámetros clínicos (Tabla 12). Sin embargo, la combinatoria de genotipos relacionada con menor producción de esta citoquina (intermedia + baja) se asoció con un recuento de neutrófilos inferior (480 vs. 543/ μ L; $p=0,047$), al diagnóstico (Tabla 12).

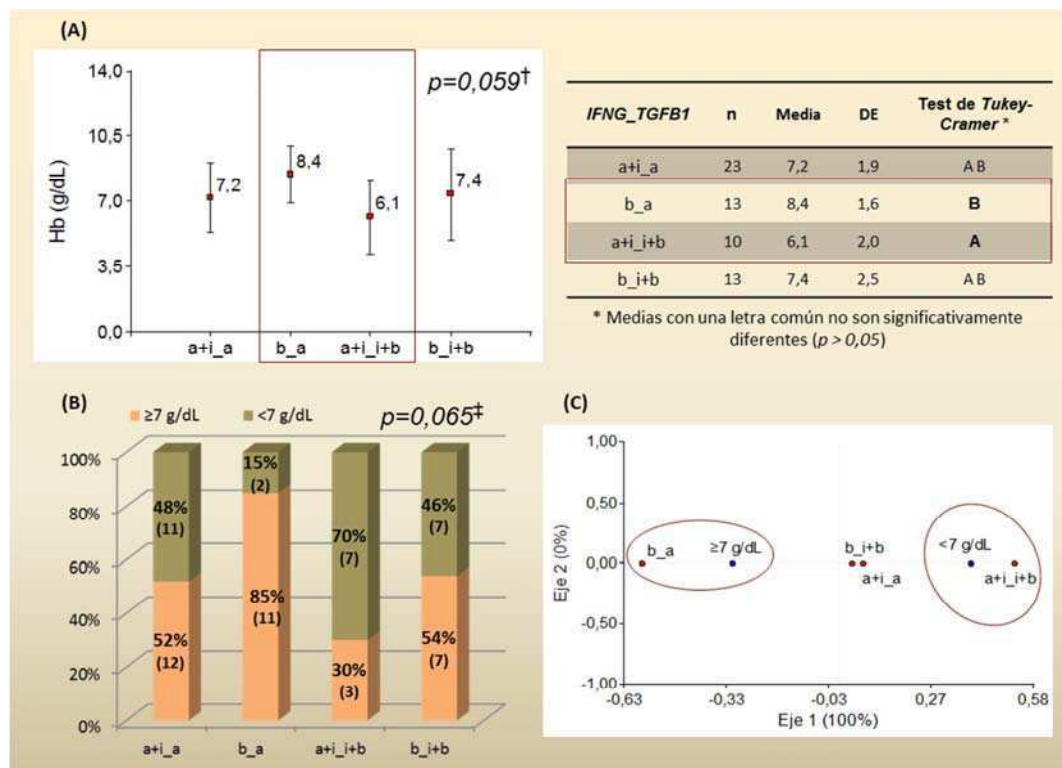
Asimismo, se evaluaron diferentes combinaciones de genotipos, a fin de establecer si alguna en particular contribuye a las asociaciones descritas en el análisis individual de cada polimorfismo.

Una de las combinaciones de interés incluye el SNP -308 G/A del gen *TNF* y la combinatoria de los SNPs de *TGFB1*, debido a que ambos presentaron asociación con el recuento de neutrófilos al diagnóstico. Este análisis no mostró ninguna combinación de genotipos que contribuya al nivel de neutropenia. Sin embargo, debe considerarse una limitación en el análisis debido al número reducido de pacientes con genotipo A/A+G/A ($n=7$), los cuales fueron, a su vez, combinados con los resultados de los polimorfismos de *TGFB1*, reduciendo aún más la frecuencia absoluta por combinatoria analizada.

Por otro lado, se analizó la combinación que incluye al polimorfismo +875 CAn del gen *IFNG* y la combinatoria de los SNPs del gen *TGFB1*, debido a la asociación con el nivel de hemoglobina. Si bien el polimorfismo de *IFNG* es el que contribuye

significativamente al grado de anemia, este estudio reveló que aquellos pacientes con genotipos asociados a una mayor producción de *IFNG* (12/12 CA + 12/no-12 CA) y una menor producción de TGF- β 1 (intermedia + baja) presentaron niveles de hemoglobina más bajos respecto a aquellos pacientes con la combinación contraria, genotipo de baja producción de *IFNG* (no-12/no-12 CA) y alta de TGF- β 1 (Figura 18 A). Además, esta combinación fue más frecuente entre los pacientes que presentaron un nivel de hemoglobina <7 g/dL, al diagnóstico (Figura 18 B). El análisis de correspondencia simple también representa gráficamente la relación encontrada entre las combinaciones de genotipos y el nivel de hemoglobina, de acuerdo al punto de corte de 7 g/dL. La Figura 18 C muestra las categorías principalmente asociadas en forma positiva debido a su alejamiento del origen y la cercanía entre ellas.

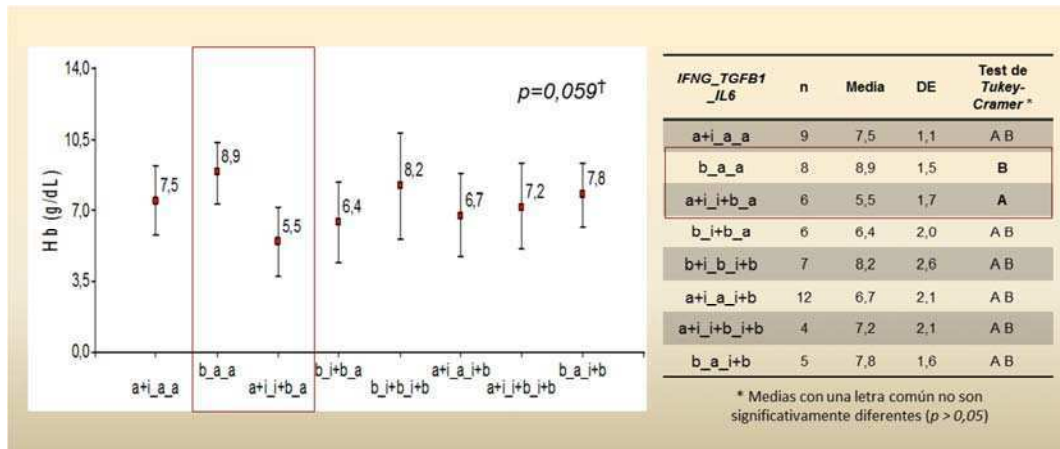
Figura 18: Combinación de genotipos correspondiente a los polimorfismos en los genes *IFNG* y *TGFB1* y su relación con el nivel de hemoglobina



Análisis de la combinación de genotipos correspondiente al polimorfismo +875 CAn del gen *IFNG* y a la combinatoria de los SNPs del gen *TGFB1* (*IFNG_TGFB1*) y su relación con el nivel de hemoglobina al diagnóstico en los pacientes con AA. (A) Gráfico y tabla mostrando las medias \pm DE para cada grupo de pacientes. \dagger ANOVA, método de comparación test de *Tukey-Cramer*. (B) Gráfico de barras indicando las frecuencias absolutas (n) y las frecuencias relativas (%) para cada grupo de pacientes con respecto al punto de corte de 7 g/dL. \ddagger Test Chi-cuadrado. (C) Análisis de correspondencia simple representando las relaciones entre las diferentes categorías de las dos variables estudiadas. a: alta; i: intermedia; b: baja respecto de la combinación *IFNG_TGFB1*.

Cuando se incluyó en este análisis de relación con los niveles de hemoglobina al SNP -174 G/C del gen *IL6*, se mantuvo la misma asociación descrita, independientemente de la presencia del genotipo de alta producción de *IL6* (Figura 19). Con lo cual, la combinación de los genotipos de *IFNG* y *TGFB1* son los que principalmente contribuyen a las diferencias observadas en el nivel de hemoglobina al diagnóstico en los pacientes con AA.

Figura 19: Combinación de genotipos correspondiente a los polimorfismos en los genes *IFNG*, *TGFB1* e *IL6* y su relación con el nivel de hemoglobina



Análisis de la combinación de genotipos correspondiente al polimorfismo +875 CAn del gen *IFNG*, a la combinatoria de los SNPs del gen *TGFB1* y al SNP -174 G/C del gen *IL6* (*IFNG_TGFB1_IL6*) y su relación con el nivel de hemoglobina al diagnóstico en los pacientes con AA. Gráfico y tabla mostrando las medias \pm DE para cada grupo de pacientes. [†] ANOVA, método de comparación test de *Tukey-Cramer*. a: alta; i: intermedia; b: baja respecto de la combinación *IFNG_TGFB1_IL6*.

El resto de las combinaciones posibles no mostraron ninguna contribución y/o asociación con las características clínicas evaluadas.

Tabla 11: Características clínicas al diagnóstico de los pacientes con AA en relación a la presencia de los polimorfismos -308 G/A (*TNF*), +875 CAn (*IFNG*), agrupado de acuerdo a la presencia del alelo 12 CA, y -174 G/C (*IL6*)

	SNP -308 G/A (<i>TNF</i>)			Polimorfismo +875 CAn (<i>IFNG</i>)*			SNP -174 G/C (<i>IL6</i>)		
	A/A+G/A (a)	G/G (b)	Valor p	12/12 CA+12/no-12 CA (a+i)	no-12/no-12 CA (b)	Valor p	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor p
Edad (años)									
Media ± DE	11 ± 7	25 ± 18		25 ± 18	21 ± 17		22 ± 19	25 ± 15	
Mediana (rango)	12 (2-22)	17 (2-74)	0,030[†]	17 (2-70)	15 (2-74)	0,363[†]	15 (2-74)	19 (4-61)	0,218[†]
Relación de géneros									
Masculino/femenino	2/5	32/30	0,428[‡]	21/20	13/15	0,801[‡]	18/20	15/11	0,623[‡]
Nivel de Hb (g/dL)									
Media ± DE	7,8 ± 1,6	7,1 ± 2,2	0,428[§]	6,8 ± 2,1	7,9 ± 2,1	0,035[§]	7,1 ± 2,0	7,2 ± 2,2	0,827[§]
Mediana (rango)	7,5 (5,9-10,0)	7,2 (3-11,5)		6,6 (3,5-10,6)	7,8 (3,0-11,5)		7,0 (3,0-11,5)	7,5 (3,8-10,6)	
<7	3 (43%)	26 (46%)	1,000[‡]	21 (57%)	8 (30%)	0,043[‡]	15 (48%)	13 (45%)	0,802[‡]
≥7	4 (57%)	31 (54%)		16 (43%)	19 (70%)	OR: 3,117	16 (52%)	16 (55%)	
Recuento de Pq (μL)									
Media ± DE	18071 ± 18263	17220 ± 16521		16111 ± 15806	19027 ± 17769		19445 ± 16975	14661 ± 15579	
Mediana (rango)	11500 (3000-54000)	11150 (1000-68000)	0,974[†]	11000 (1000-65000)	11650 (2300-68000)	0,442[†]	12000 (3000-68000)	10000 (1000-65000)	0,167[†]
≤20000	5 (71%)	42 (75%)	1,000[‡]	30 (81%)	17 (65%)	0,240[‡]	21 (68%)	23 (82%)	0,243[‡]
>20000	2 (29%)	14 (25%)		7 (19%)	9 (35%)		10 (32%)	5 (18%)	
Recuento de N (μL)									
Media ± DE	296 ± 260	714 ± 589		641 ± 578	706 ± 584		685 ± 528	652 ± 654	
Mediana (rango)	200 (45-770)	520 (0-2340)	0,025[†]	420 (0-2080)	520 (48-2340)	0,514[†]	520 (0-1980)	420 (48-2340)	0,164[†]
≤500	6 (86%)	25 (44%)	0,050[‡]	20 (54%)	11 (41%)	0,322[‡]	13 (42%)	16 (55%)	0,438[‡]
>500	1 (14%)	32 (56%)		17 (46%)	16 (59%)		18 (58%)	13 (45%)	
≤200	4 (57%)	10 (17%)	0,036[‡]	8 (22%)	6 (22%)	1,000[‡]	7 (23%)	7 (24%)	1,000[‡]
>200	3 (44%)	47 (83%)	OR:6,267	29 (78%)	21 (78%)		24 (77%)	22 (76%)	
Reticulocitos (%)									
Media ± DE	0,4 ± 0,4	0,7 ± 0,7		0,6 ± 0,8	0,6 ± 0,5		0,6 ± 0,5	0,7 ± 0,8	
Mediana (rango)	0,5 (0,0-0,9)	0,5 (0,0-2,8)	0,619[†]	0,5 (0-2,8)	0,6 (0-2,2)	0,379[†]	0,6 (0-1,8)	0,4 (0-2,8)	0,486[†]
Severidad, n (%)									
AA muy severa	4 (57%)	10 (17%)	0,047[#]	8 (21%)	6 (22%)	0,660[#]	7 (22%)	7 (24%)	0,652[#]
AA severa	3 (43%)	38 (67%)		25 (68%)	16 (59%)		21 (68%)	17 (59%)	
AA moderada	0 (0%)	9 (16%)		4 (11%)	5 (19%)		3 (10%)	5 (17%)	

a: alta; i: intermedia; b: baja; DE: desvío estándar; Hb: hemoglobina; Pq: plaquetas; N: neutrófilos. * Debido al n=6, la categoría alta se agrupó con la intermedia para el análisis. † Test de *Mann-Whitney*, ‡ test Exacto de *Fisher*, § test de *t*, # test Chi-cuadrado; OR: *Odds ratio*.

Tabla 12: Características clínicas al diagnóstico de los pacientes con AA en relación a la presencia de los polimorfismos del gen *TGFB1*, +869 C/T, +915 G/C y la combinatoria de ambos SNPs

	SNP +869 C/T (<i>TGFB1</i>)			SNP +915 G/C (<i>TGFB1</i>)			Combinatoria de ambos SNPs (<i>TGFB1</i>)		
	T/T (a)	T/C+C/C (i+b)	Valor p	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor p	Alta	Intermedia + baja	Valor p
Edad (años)									
Media ± DE	21 ± 14	23 ± 18		23 ± 17	20 ± 18		22 ± 15	23 ± 20	
Mediana (rango)	16 (5-50)	17 (2-74)	0,872 [†]	17 (2-74)	15 (2-70)	0,409 [†]	16 (3-61)	15 (2-74)	0,218 [†]
Relación de géneros									
Masculino/femenino	10/7	23/24	0,577 [‡]	26/26	8/6	0,766 [‡]	18/20	15/11	0,455 [‡]
Nivel de Hb (g/dL)									
Media ± DE	7,2 ± 1,5	7,4 ± 2,2	0,729 [§]	7,3 ± 2,0	7,3 ± 2,4	0,927 [§]	7,6 ± 1,9	6,8 ± 2,3	0,143 [§]
Mediana (rango)	7,4 (3,8-9,6)	7,3 (3,0-11,5)		7,3 (3,6-11,5)	6,9 (3,0-10,6)		7,8 (3,8-11,5)	6,4 (3,0-10,6)	
<7	6 (38%)	20 (47%)		21 (42%)	6 (55%)		13 (36%)	13 (57%)	
≥7	10 (62%)	23 (53%)	0,571 [†]	29 (58%)	5 (45%)	0,515 [†]	23 (64%)	10 (43%)	0,179 [†]
Recuento de Pq (μL)									
Media ± DE	10807 ± 6015	18993 ± 18474		17110 ± 16616	16036 ± 15353		14440 ± 13782	20583 ± 19775	
Mediana (rango)	10000 (2300-22000)	11000 (1000-68000)	0,409 [†]	11300 (1000-68000)	8000 (3000-54000)	0,774 [†]	11000 (1000-60000)	11000 (3000-68000)	0,316 [†]
≤20000	14 (93%)	30 (70%)		38 (78%)	7 (64%)		29 (83%)	15 (65%)	
>20000	1 (7%)	13 (30%)	0,087 [‡]	11 (22%)	4 (36%)	0,442 [‡]	6 (17%)	8 (35%)	0,209 [‡]
Recuento de N (μL)									
Media ± DE	724 ± 634	654 ± 573		690 ± 595	595 ± 518		754 ± 649	545 ± 453	
Mediana (rango)	543 (77-2080)	500 (0-2340)	0,319 [†]	518 (0-2340)	500 (48-1980)	0,171 [†]	543 (0-2340)	480 (48-1980)	0,047 [†]
≤500	6 (38%)	22 (51%)		23 (46%)	6 (55%)		15 (42%)	13 (57%)	
>500	10 (62%)	21 (49%)	0,393 [‡]	27 (54%)	5 (45%)	0,743 [‡]	21 (58%)	10 (43%)	0,297 [‡]
≤200	4 (25%)	9 (21%)		11 (22%)	2 (18%)		9 (25%)	4 (17%)	
>200	12 (75%)	34 (79%)	1,000 [†]	39 (78%)	9 (82%)	1,000 [†]	27 (75%)	19 (83%)	0,540 [†]
Reticulocitos (%)									
Media ± DE	0,8 ± 0,8	0,6 ± 0,6		0,6 ± 0,6	0,6 ± 0,8		0,7 ± 0,7	0,6 ± 0,6	
Mediana (rango)	0,6 (0,0-2,8)	0,5 (0,0-2,3)	0,214 [†]	0,6 (0,0-2,8)	0,5 (0,1-2,2)	0,642 [†]	0,5 (0,0-2,8)	0,5 (0,1-2,2)	0,947 [†]
Severidad, n (%)									
AA muy severa	4 (25%)	9 (21%)		11 (22%)	2 (18%)		9 (25%)	4 (17%)	
AA severa	11 (69%)	27 (63%)	0,601 [#]	32 (64%)	8 (73%)	0,847 [#]	21 (58%)	17 (74%)	0,460 [#]
AA moderada	4 (6%)	7 (16%)		7 (14%)	1 (9%)		6 (17%)	2 (9%)	

a: alta; i: intermedia; b: baja; DE: desvío estándar; Hb: hemoglobina; Pq: plaquetas; N: neutrófilos. [†] Test de *Mann-Whitney*, [‡] test Exacto de *Fisher*, [§] test de *t*, [#] test Chi-cuadrado; OR: *Odds ratio*.

2.3.1.2. Asociación con respuesta al tratamiento

Se evaluó la respuesta a la TIS en relación a la presencia de los polimorfismos estudiados en pacientes con AA que recibieron como tratamiento inicial una combinación de GAT y CsA (n=38). El análisis mostró que los genotipos 12/12 CA + 12/no-12 CA, asociados a mayor producción de *IFNG*, fueron más frecuentes entre los pacientes que alcanzaron una respuesta global (RC o RP), la cual fue evaluada luego de 6 meses de haber iniciado la TIS (21/26, 81% vs. 5/12, 42%; $p=0,026$, OR: 0,170). Los restantes polimorfismos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la respuesta global alcanzada (Tabla 13).

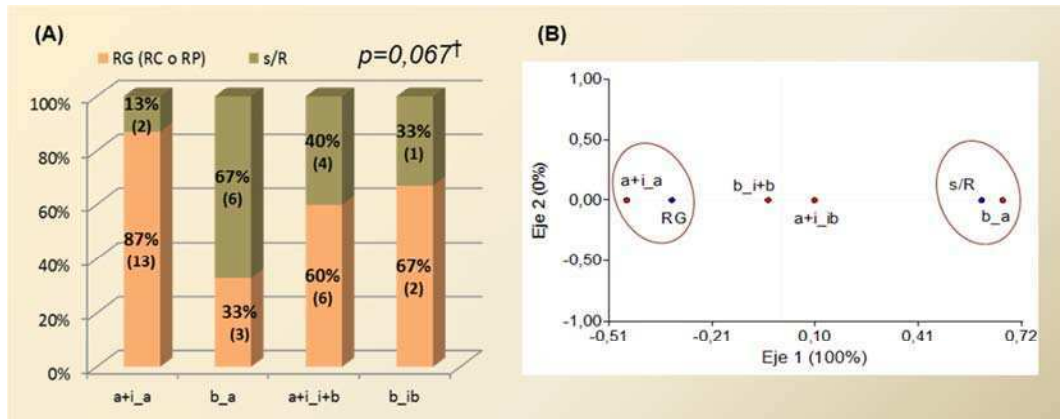
Tabla 13: Polimorfismos en los genes de citoquinas y respuesta a la TIS

	SNP -308 G/A (<i>TNF</i>)			Polimorfismo +875 CA _n (<i>IFNG</i>)			SNP -174 G/C (<i>IL6</i>)		
	A/A+A/G (a)	G/G (b)	Valor <i>p</i>	12/12 CA +12/no-12 CA (a+i)	no-12/no-12 CA (b)	Valor <i>p</i>	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor <i>p</i>
RG	2 (50%)	24 (71%)	0,577 [†]	21 (81%)	5 (42%)	0,026 [†] OR:0,170	16 (67%)	8 (67%)	1,000 [†]
s/R	2 (50%)	10 (29%)		5 (19%)	7 (58%)		8 (33%)	4 (33%)	
	SNP +869 C/T (<i>TGFB1</i>)			SNP +915 G/C (<i>TGFB1</i>)			Combinatoria de ambos SNPs (<i>TGFB1</i>)		
	T/T (a)	T/C+C/C (i+b)	Valor <i>p</i>	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor <i>p</i>	Alta	Intermedia + baja	Valor <i>p</i>
RG	7 (70%)	17 (68%)	1,000 [†]	19 (63%)	5 (83%)	0,411 [†]	14 (67%)	10 (71%)	1,000 [†]
s/R	3 (30%)	8 (32%)		11 (37%)	1 (17%)		7 (33%)	4 (29%)	

RG: respuesta global; s/R: sin respuesta; a: alta; i: intermedia; b: baja. [†] Test exacto de Fisher, OR: Odds ratio.

Debido a la asociación encontrada entre una respuesta global a la TIS y los genotipos de mayor producción de *IFNG*, se evaluó si la presencia de algún otro genotipo (*TNF*, *IL6* y *TGFB1*) en combinación podría contribuir a esta asociación. El análisis mostró que los genotipos de mayor y menor producción de *IFNG* se relacionan, respectivamente, con una respuesta global (RC o RP) y con *refractariedad* a la TIS, independientemente de la presencia del genotipo de alta producción de *IL6* (Figura 20 A). Este resultado también puede observarse en el análisis de correspondencia simple (Figura 20 B), el cual grafica cada combinación de genotipos y la respuesta a la TIS, mostrando las categorías principalmente asociadas en forma positiva debido a su alejamiento del origen y la cercanía entre ellas.

Figura 20: Combinación de genotipos correspondiente a los polimorfismos en los genes *IFNG* e *IL6* y su relación con respuesta a la TIS

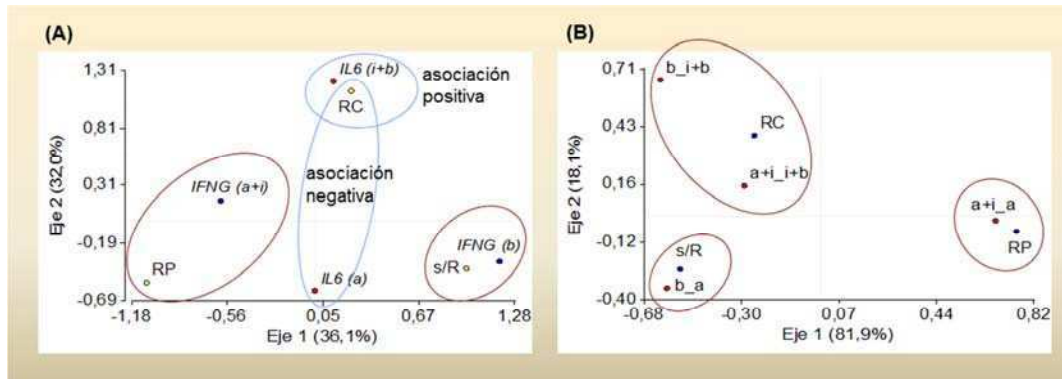


Análisis de la combinación de genotipos correspondientes al polimorfismo +875 CA del gen *IFNG* y al SNP -174 G/C del gen *IL6* (*IFNG_IL6*) y su relación con respuesta a la TIS en pacientes con AA. (A) Gráfico de barras indicando las frecuencias absolutas (n) y las frecuencias relativas (%) de cada grupo de pacientes. [†] Test Chi-cuadrado. (B) Análisis de correspondencia simple representando las relaciones entre las diferentes categorías de las dos variables estudiadas. RG: respuesta global; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; s/R: sin respuesta; a: alta; i: intermedia; b: baja, respecto de la combinación *IFNG_IL6*.

Sin embargo, al evaluar la respuesta global desglosada en RC y RP, un análisis de correspondencia múltiple muestra que ambos polimorfismos contribuyen al grado de respuesta alcanzada. El resultado puede observarse gráficamente en la Figura 21 A en donde sobre el eje 1 se representa la asociación de *IFNG* con el grado de respuesta y sobre el eje 2 la influencia de *IL6*. Por ende, los genotipos asociados a mayor producción de *IFNG* se relacionan principalmente con una RP. Mientras que, el genotipo de alta producción de *IL6* se asocia negativamente con alcanzar una RC. El análisis de correspondencia simple (Figura 21 B) describe gráficamente la combinación de los genotipos y el grado de respuesta, mostrando que los pacientes que no responden a la TIS poseen el genotipo asociado con baja producción de *IFNG* y alta producción de *IL6*.

La combinación de genotipos de *IFNG* y *TNF* no pudo realizarse debido al escaso número de pacientes con genotipo A/A+G/A (n=4) evaluables en cuanto al grado de respuesta. El resto de las combinaciones posibles no mostraron ninguna contribución y/o asociación con la respuesta a la TIS.

Figura 21: Análisis de los polimorfismos en los genes *IFNG* e *IL6* y su relación con el grado de respuesta alcanzada



(A) Análisis de correspondencia múltiple representando las relaciones entre cada polimorfismo y el grado de respuesta. En rojo se engloban las relaciones evaluadas a partir del eje 1, y en celeste aquellas evaluadas a partir del eje 2. (B) Análisis de correspondencia simple representando las relaciones entre la combinación de genotipos correspondiente al polimorfismo +875 C/A del gen *IFNG* y al SNP -174 G/C del gen *IL6* (*IFNG_IL6*) y su relación con el grado de respuesta alcanzada. RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; s/R: sin respuesta; a: alta, i: intermedia, b: baja, respecto de la combinación *IFNG_IL6*.

2.3.2 Asociación con parámetros clínicos en SMD

Para la población de pacientes con SMD se analizaron diferentes características clínicas al diagnóstico en relación a la presencia de los polimorfismos estudiados (Tabla 14 y 15). Los parámetros evaluados fueron: edad, relación de géneros, nivel de hemoglobina, recuento de plaquetas, recuento de neutrófilos, porcentaje de blastos en MO y cariotipo. Las variables que indican el grado de las citopenias y la presencia de blastos en MO fueron categorizadas considerando los criterios de riesgo del sistema de puntaje pronóstico para los SMD (IPSS-R: *revised International Prognostic Scoring System*) (Greenberg y col., 2012). Además, fue evaluada la necesidad de requerir transfusiones durante el seguimiento de la enfermedad, así como también la sobrevida, la evolución de los pacientes a LMA y las causas de muerte (Tabla 16).

2.3.2.1. Asociación con características clínicas al diagnóstico

El análisis del SNP -308 G/A del gen *TNF* mostró que la presencia del alelo -308A se asoció con un nivel de hemoglobina menor (8,5 vs. 9,7 g/dL; $p=0,009$) y con un recuento de plaquetas inferior (90000 vs. 138000/ μ L; $p=0,004$). Además, estos pacientes mostraron un riesgo incrementado de presentar niveles de hemoglobina ≤ 8 g/dL (15/33, 45% vs. 23/98, 24%; $p=0,026$, OR: 2,681) y recuentos de plaquetas $< 50000/\mu$ L (11/31, 35,5% vs. 14/94, 15%; $p=0,019$, OR: 3,143), al diagnóstico (Tabla 14).

Con respecto al gen *IFNG*, el análisis del polimorfismo de repetición +875 CAn mostró que los pacientes con SMD homocigotas para el alelo 12 CA presentaron una edad menor (61 vs. 66 años; $p=0,050$) y un recuento de neutrófilos inferior (1164 vs. 1791/ μ L; $p=0,019$), al diagnóstico (Tabla 14). En el análisis del SNP +874 A/T fueron encontradas las mismas asociaciones en los pacientes con genotipo T/T, debido al fuerte desequilibrio de ligamiento entre los alelos +874T y 12 CA ($D'=0,99$).

En el estudio del SNP -174 G/C del gen *IL6*, los pacientes con genotipo G/G, asociado a alta producción de *IL6*, mostraron un grado de anemia más severa (8,7 vs. 10,0 g/dL; $p=0,007$), con un mayor riesgo de presentar niveles de hemoglobina ≤ 8 g/dL (12/25, 48% vs. 9/61, 15%; $p=0,002$, OR: 5,333), al diagnóstico (Tabla 14).

En cuanto a los polimorfismos del gen *TGFB1*, cada uno de los SNPs, +869 C/T y +915 G/C, mostraron asociaciones con diferentes variables: recuento de neutrófilos y plaquetas, respectivamente (Tabla 15). El análisis de la combinatoria de los SNPs +869 C/T - +915 G/C mostró que las relacionadas a menor producción de esta citoquina (intermedia + baja) se asoció con un recuento de plaquetas inferior (100500 vs. 142500/ μ L; $p=0,011$), al diagnóstico, potenciando el resultado obtenido para el SNP +915 G/C en forma individual (Tabla 15).

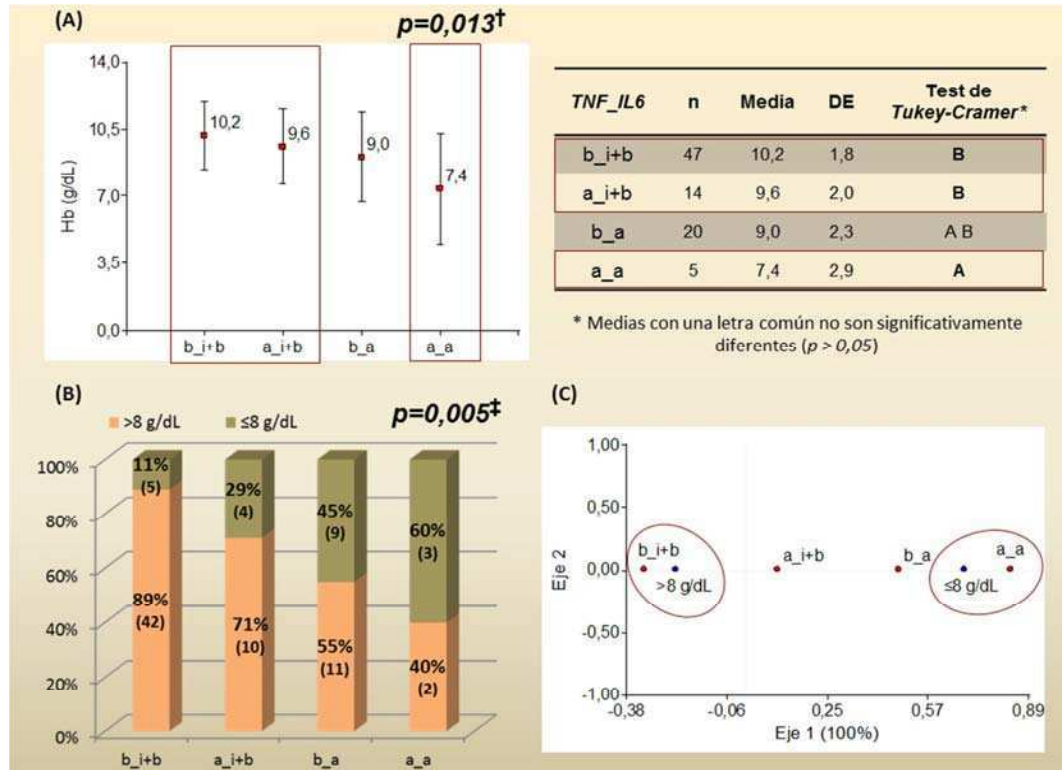
Dentro de la población de SMD, 5 pacientes fueron clasificados como Síndrome 5q-, y debido a que este síndrome se caracteriza por el elevado recuento de plaquetas (mediana de plaquetas de los 5 pacientes con Síndrome 5q-: 400000/ μ L), estos pacientes fueron excluidos al analizar este parámetro clínico.

De igual manera que en el análisis de la AA, se evaluaron diferentes combinaciones de genotipos, a fin de establecer si alguna en particular contribuye a las asociaciones descritas en el análisis individual de cada polimorfismo.

Una de las combinaciones de interés involucra a los SNPs -308 G/A del gen *TNF* y -174 G/C del gen *IL6*, debido a que ambos presentaron una importante asociación con el nivel de hemoglobina al diagnóstico. Este análisis mostró que los pacientes con los genotipos que combinan mayor producción de *TNF* (A/A+G/A) e *IL6* (G/G) presentaron niveles de hemoglobina más bajos respecto a aquellos pacientes que no portan el genotipo asociado a mayor producción de *IL6* (Figura 22 A). Además, esta combinación fue más frecuente principalmente entre pacientes que presentaron un nivel de hemoglobina ≤ 8 g/dL. Mientras que, la combinación contraria, genotipo de baja producción de *TNF* e *IL6*, mostró una frecuencia mayor en pacientes con niveles de hemoglobina > 8 g/dL, al diagnóstico (Figura 22 B). El gráfico de correspondencia simple muestra que la presencia de ambos genotipos de alta producción se asocia con

hemoglobinas ≤ 8 g/dL (Figura 22 C). Con lo cual, la combinación de los genotipos de *TNF* e *IL6* son los que principalmente contribuyen a las diferencias observadas en el nivel de hemoglobina al diagnóstico en los pacientes con SMD.

Figura 22: Combinación de genotipos correspondiente a los polimorfismos en los genes *TNF* e *IL6* y su relación con el nivel de hemoglobina



Análisis de la combinación de genotipos correspondiente a los SNPs -308 G/A del gen *TNF* y -174 G/C del gen *IL6* (*TNF_IL6*) y su relación con el nivel de hemoglobina al diagnóstico en los pacientes con SMD. (A) Gráfico y tabla mostrando las medias \pm DE para cada grupo de pacientes. † ANOVA, método de comparación test de *Tukey-Cramer*. (B) Gráfico de barras indicando las frecuencias absolutas (n) y las frecuencias relativas (%) para cada grupo de pacientes. ‡ Test Chi-cuadrado. (C) Análisis de correspondencia simple representando las relaciones entre las diferentes categorías de las dos variables estudiadas. a: alta; i: intermedia; b: baja, respecto de la combinación *TNF_IL6*.

Por otro lado, se analizó la combinación que incluye también al SNP -308 G/A del gen *TNF* y la combinatoria de los SNPs asociados a una expresión diferencial de *TGFB1*, debido a la asociación con el recuento de plaquetas. En este caso, las combinaciones de genotipos no mostraron diferencias significativas con respecto al recuento de plaquetas al diagnóstico. Una cuestión importante a tener en cuenta es la limitación en el número de pacientes incluidos en el análisis, debido a que los polimorfismos en los genes *IL6* y *TGFB1* fueron estudiados en una casuística menor.

El resto de las combinaciones posibles no mostraron ninguna contribución y/o asociación con las características clínicas evaluadas.

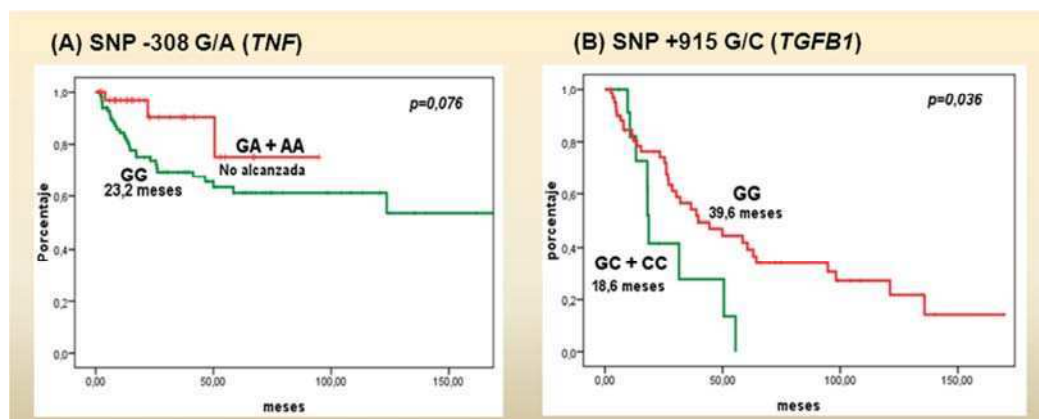
2.3.2.2. Asociación con características clínicas relacionadas con seguimiento y evolución de la enfermedad

Se evaluaron parámetros clínicos que caracterizan el curso de la enfermedad en los pacientes con SMD, incluyendo la necesidad de requerir transfusiones, la evolución a LMA y la sobrevida, en relación a la presencia de los polimorfismos estudiados.

El análisis mostró que los pacientes con genotipo A/A+G/A, asociado a mayor expresión de *TNF*, presentaron un riesgo incrementado de requerir transfusiones durante el seguimiento (25/32, 78% vs. 46/91, 50,5%; $p=0,007$, OR: 3,494) (Tabla 16), lo cual es consistente con la asociación encontrada entre el alelo -308A y un grado de anemia y plaquetopenia más severa (Tabla 15). Además, estos pacientes mostraron una tendencia de mayor sobrevida libre de evolución a LMA ($p=0,076$) (Figura 23 A) y un riesgo menor de muerte relacionada a la progresión leucémica (3/15, 20% vs. 30/52, 58%; $p=0,017$, OR: 0,183) (Tabla 16).

Por otro lado, el análisis del SNP +915 G/C mostró una asociación entre los genotipos G/C+C/C de menor producción de TGF- β 1 y una menor sobrevida (18,6 vs. 39,6 meses; $p=0,036$) (Tabla 16; Figura 23 B). Esta asociación se pierde al analizar este polimorfismo combinado con el SNP +869 C/T.

Figura 23: Análisis de los polimorfismos en los genes *TNF* y *TGFB1* y su relación con la sobrevida libre de evolución a LMA y la sobrevida global



Curvas según *Kaplan-Meier*: (A) Sobrevida libre de evolución a LMA con respecto al SNP -308 G/A del gen *TNF* (131 pacientes). (B) Sobrevida global con respecto al SNP +915 G/C del *TGFB1* (75 pacientes).

El resto de los polimorfismos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a estos parámetros analizados (Tabla 16).

Tabla 14: Características clínicas al diagnóstico de los pacientes con SMD en relación a la presencia de los polimorfismos -308 G/A (TNF), +875 CAn (IFNG), agrupado de acuerdo a la presencia del alelo 12 CA, y -174 G/C (IL6)

	SNP -308 G/A (TNF)			Polimorfismo +875 CAn (IFNG)			SNP -174 G/C (IL6)		
	A/A+G/A (a)	G/G (b)	Valor p	12/12 CA (a)	12/no-12CA + no-12/no-12 CA (i+b)	Valor p	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor p
Edad (años)									
Media ± DE	57 ± 20	64 ± 14		57 ± 16	63 ± 16		60 ± 17	64 ± 15	
Mediana (rango)	63 (14-87)	66 (21-89)	0,101 [†]	61 (21-84)	66 (14-89)	0,050 [†]	62 (21-82)	67 (21-86)	0,325 [†]
Relación de géneros									
Masculino/femenino	16/17	55/43	0,545 [†]	11/11	59/50	0,816 [†]	11/14	35/26	0,342 [†]
Nivel de Hb (g/dL)									
Media ± DE	8,5 ± 2,3	9,7 ± 2,2	0,009 [§]	9,7 ± 2,8	9,3 ± 2,2	0,492 [§]	8,7 ± 2,5	10,0 ± 1,8	0,007 [§]
Mediana (rango)	8,7 (4,4-13,4)	9,7 (4,6-14,8)		9,7 (4,4-14,8)	9,4 (4,5-14,2)		8,9 (5,0-13,8)	9,8 (5,0-13,8)	
≤8	15 (45%)	23 (24%)	0,026 [†]	6 (27%)	32 (27%)	1,000 [†]	12 (48%)	9 (15%)	0,002 [†]
>8	18 (55%)	74 (76%)	OR:2,681	16 (73%)	77 (73%)		13 (52%)	52 (85%)	OR:5,333
Recuento de Pq (μL)*									
Media ± DE	122581 ± 122582	166564 ± 123583		111925 ± 58381	162024 ± 132600		148460 ± 135749	160850 ± 122420	
Mediana (rango)	90000 (8500-482000)	138000 (10000-600000)	0,004 [†]	116500 (10000-650000)	132500 (5000-600000)	0,388 [†]	123000 (8500-587000)	130000 (10000-600000)	0,273 [†]
<50000	11 (35%)	14 (15%)	0,019 [†]	4 (20%)	22 (21%)	1,000 [†]	7 (28%)	9 (15%)	0,223 [†]
≥50000	20 (65%)	80 (85%)	OR:3,143	16 (80%)	84 (79%)		18 (72%)	51 (85%)	
Recuento de N (μL)									
Media ± DE	2205 ± 1939	2067 ± 1563		1422 ± 957	2247 ± 1734		2251 ± 2135	2047 ± 1602	
Mediana (rango)	1763 (372-10200)	1710 (117-9044)	0,966 [†]	1164 (372-4510)	1791 (117-10200)	0,019 [†]	1849 (418-9044)	1575 (117-10200)	0,875 [†]
<800	17 (51%)	18 (19%)	0,795 [†]	7 (32%)	15 (14%)	0,059 [†]	7 (28%)	9 (15%)	0,221 [†]
≥800	16 (49%)	79 (81%)		15 (68%)	93 (86%)		18 (72%)	52 (85%)	
Blastos en MO (%)									
Media ± DE	4,1 ± 5,6	3,7 ± 5,1		4,2 ± 6,2	3,7 ± 5,0		3,8 ± 5,1	4,8 ± 5,8	
Mediana (rango)	2,0 (0,0-17,0)	1,0 (0,0-17,5)	0,803 [†]	1,0 (0,0-17,0)	1,5 (0,0-17,5)	0,831 [†]	1,0 (0,0-17,0)	2,0 (0,0-17,0)	0,601 [†]
<5	24 (73%)	69 (69%)	0,827 [†]	15 (68%)	60 (57%)	0,803 [†]	17 (68%)	38 (62%)	0,805 [†]
≥5	9 (27%)	30 (31%)		7 (32%)	45 (43%)		8 (32%)	23 (38%)	
Cariotipo, n (%)									
Normal	14 (44%)	52 (57%)	0,220 [†]	10 (50%)	55 (54%)	0,810 [†]	14 (58%)	34 (59%)	1,000 [†]
Anormal	18 (56%)	39 (43%)		10 (50%)	47 (46%)		10 (42%)	24 (41%)	

a: alta; i: intermedia; b: baja; DE: desvío estándar; Hb: hemoglobina; Pq: plaquetas; N: neutrófilos; MO: médula ósea. *5 pacientes clasificados como Síndrome 5q- fueron excluidos del análisis debido a su elevado recuento de plaquetas. [†] Test de Mann-Whitney, [‡] test Exacto de Fisher, [§] test de t; OR: Odds ratio.

Tabla 15: Características clínicas al diagnóstico de los pacientes con SMD en relación a la presencia de los polimorfismos del gen *TGFB1*, +869 C/T, +915 G/C y la combinatoria de ambos SNPs

	SNP +869 C/T (<i>TGFB1</i>)			SNP +915 G/C (<i>TGFB1</i>)			Combinatoria de ambos SNPs (<i>TGFB1</i>)		
	T/T (a)	T/C+C/C (i+b)	Valor p	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor p	Alta	Intermedia + baja	Valor p
Edad (años)									
Media \pm DE	64 \pm 17	63 \pm 16		64 \pm 16	61 \pm 18		65 \pm 17	58 \pm 17	
Mediana (rango)	69 (21-87)	65 (21-86)	$0,542^{\dagger}$	68 (21-87)	68 (21-79)	$0,753^{\dagger}$	68 (21-87)	57 (21-79)	$0,085^{\dagger}$
Relación de géneros									
Masculino/femenino	10/12	31/21	$0,798^{\dagger}$	34/28	9/4	$0,377^{\dagger}$	28/21	11/5	$0,559^{\dagger}$
Nivel de Hb (g/dL)									
Media \pm DE	9,5 \pm 2,1	9,5 \pm 2,1	$0,965^{\S}$	9,5 \pm 2,2	9,0 \pm 2,4	$0,412^{\S}$	9,6 \pm 2,1	9,6 \pm 2,2	$0,965^{\S}$
Mediana (rango)	9,8 (5,0-13,4)	9,5 (5,0-13,8)		9,7 (5,0-13,8)	8,1 (4,4-13,4)		9,7 (5,0-13,8)	9,1 (5,0-13,4)	
≤ 8	6 (27%)	14 (27%)	$1,000^{\ddagger}$	16 (26%)	6 (46%)	$0,183^{\ddagger}$	13 (27%)	3 (19%)	$0,741^{\ddagger}$
> 8	16 (73%)	38 (73%)		66 (74%)	7 (54%)		36 (73%)	13 (81%)	
Recuento de Pq (μL)*									
Media \pm DE	160762 \pm 100283	153049 \pm 123715		171336 \pm 124349	102461 \pm 94804		179896 \pm 125535	96844 \pm 64928	
Mediana (rango)	152000 (10000-350000)	127500 (8500-587000)	$0,599^{\dagger}$	138000 (8500-587000)	77000 (15000-369000)	$0,048^{\dagger}$	142500 (10000-587000)	100500 (8500-243000)	$0,011^{\dagger}$
< 50000	2 (9%)	12 (24%)	$0,204^{\ddagger}$	9 (15%)	5 (38%)	$0,062^{\ddagger}$	5 (11%)	6 (38%)	$0,022^{\ddagger}$
≥ 50000	19 (91%)	39 (76%)		52 (85%)	8 (62%)		43 (87%)	10 (62%)	OR: 0,194
Recuento de N (μL)									
Media \pm DE	1553 \pm 1284	2311 \pm 2037		2173 \pm 2003	1891 \pm 1423		2206 \pm 2135	1996 \pm 1331	
Mediana (rango)	1140 (180-5220)	1637 (117-10200)	$0,048^{\dagger}$	1500 (117-10200)	1443 (380-5150)	$0,828^{\dagger}$	1505 (117-10200)	1366 (754-5150)	$0,873^{\dagger}$
< 800	8 (36%)	7 (13%)	$0,054^{\ddagger}$	13 (21%)	3 (23%)	$1,000^{\ddagger}$	11 (22%)	2 (12%)	$0,388^{\ddagger}$
≥ 800	14 (64%)	45 (84%)		49 (79%)	10 (77%)		38 (78%)	14 (88%)	
Blastos en MO (%)									
Media \pm DE	6,0 \pm 6,0	4,2 \pm 5,5		4,7 \pm 5,6	7,5 \pm 6,1		4,8 \pm 5,8	6,0 \pm 6,0	
Mediana (rango)	4,5 (0,0-17,0)	1,0 (0,0-17,0)	$0,138^{\dagger}$	2,5 (0,0-17,0)	6,0 (0,0-17,0)	$0,111^{\dagger}$	3,0 (0,0-17,0)	5,0 (0,0-17,0)	$0,427^{\dagger}$
< 5	11 (50%)	35 (67%)	$0,195^{\ddagger}$	39 (63%)	4 (31%)	$0,061^{\ddagger}$	31 (63%)	7 (44%)	$0,243^{\ddagger}$
≥ 5	11 (50%)	17 (33%)		23 (32%)	9 (69%)		18 (37%)	9 (56%)	
Cariotipo, n (%)									
Normal	13 (62%)	28 (55%)	$0,613^{\ddagger}$	32 (53%)	7 (70%)	$0,495^{\ddagger}$	28 (58%)	8 (53%)	$0,772^{\ddagger}$
Anormal	8 (38%)	23 (45%)		28 (47%)	3 (30%)		20 (42%)	7 (47%)	

a: alta; i: intermedia; b: baja; d.e.: desvío estándar; Hb: hemoglobina; Pq: plaquetas; N: neutrófilos; MO: médula ósea. *5 pacientes clasificados como Síndrome 5q- fueron excluidos del análisis debido a su elevado recuento de plaquetas. † Test de *Mann-Whitney*, ‡ test Exacto de *Fisher*, § test de *t*; OR: *Odds ratio*.

Tabla 16: Características clínicas de los pacientes con SMD relacionadas con el seguimiento y la evolución de la enfermedad en relación a la presencia de los polimorfismos en genes de citoquinas

	SNP -308 G/A (<i>TNF</i>)			Polimorfismo +875 CAn (<i>IFNG</i>)			SNP -174 G/C (<i>IL6</i>)		
	A/A+A/G (a)	G/G (b)	Valor <i>p</i>	12/12 CA (a)	12/no-12CA + no-12/no-12 CA (i+b)	Valor <i>p</i>	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor <i>p</i>
Requerimiento transfusional, n (%)									
Si	25 (78%)	46 (51%)	0,007[†]	11 (61%)	60 (57%)	0,802[†]	15 (60%)	27 (49%)	0,470[†]
No	7 (22%)	45 (49%)	OR:3,494	7 (39%)	45 (43%)		10 (40%)	28 (51%)	
Evolución a LMA 25% (meses)	n.a.	23,2	0,076[‡]	13,6	46,5	0,420[‡]	22,2	26,0	0,841[‡]
Causas de muerte, n (%)									
Relacionadas a LMA	3 (20%)	30 (58%)	0,017[†]	7 (50%)	25 (47%)	1,000[†]	6 (60%)	18 (47%)	0,724[†]
Otras causas	12 (80%)	22 (42%)	OR:0,183	7 (50%)	28 (53%)		4 (40%)	20 (53%)	
Sobrevida Mediana (meses)	39,7	57,7	0,350[‡]	26,8	57,7	0,938[‡]	59,5	38,8	0,165[‡]
	SNP +869 C/T (<i>TGFB1</i>)			SNP +915 G/C (<i>TGFB1</i>)			Combinatoria de ambos SNPs (<i>TGFB1</i>)		
	T/T (a)	T/C+C/C (i+b)	Valor <i>p</i>	G/G (a)	G/C+C/C (i+b)	Valor <i>p</i>	Alta	Intermedia + baja	Valor <i>p</i>
Requerimiento transfusional, n (%)									
Si	8 (42%)	31 (62%)	0,177[†]	31 (54%)	9 (69%)	0,371[†]	22 (50%)	11 (69%)	0,248[†]
No	11 (58%)	19 (38%)		26 (46%)	4 (31%)		22 (50%)	5 (31%)	
Evolución a LMA 25% (meses)	22,2	23,2	0,418[‡]	23,2	14,2	0,317[‡]	23,2	12,8	0,610[‡]
Causas de muerte, n (%)									
Relacionadas a LMA	8 (57%)	13 (48%)	0,744[†]	17 (49%)	5 (56%)	1,000[†]	14 (48%)	6 (60%)	0,716[†]
Otras causas	6 (43%)	14 (52%)		18 (51%)	4 (44%)		15 (52%)	4 (40%)	
Sobrevida Mediana (meses)	30,4	55,5	0,433[‡]	39,6	18,6	0,036[‡]	38,8	25,4	0,543[‡]

a: alta; i: intermedia; b: baja; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; n.a.: no alcanzan. [†] Test Exacto de Fisher, [‡] Test según Kaplan-Meier y test de log-Rank, OR: Odds ratio.

***Resultados – Capítulo 2: Análisis de
expresión génica***

Análisis de expresión génica

1. Optimización de los parámetros de la PCR cuantitativa en tiempo real

La determinación de los niveles de expresión de un ARN mensajero (ARNm) de interés requiere la puesta a punto de las condiciones óptimas de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), las cuales incluyen la utilización de *primers* específicos adecuados y el ajuste de las condiciones tanto de reacción como de ciclado. La optimización consiste en hacer que las variaciones normales de la prueba no causen efectos importantes sobre las determinaciones realizadas. Los criterios más importantes para la optimización son la eficiencia, la sensibilidad, la reproducibilidad y la especificidad de la qPCR.

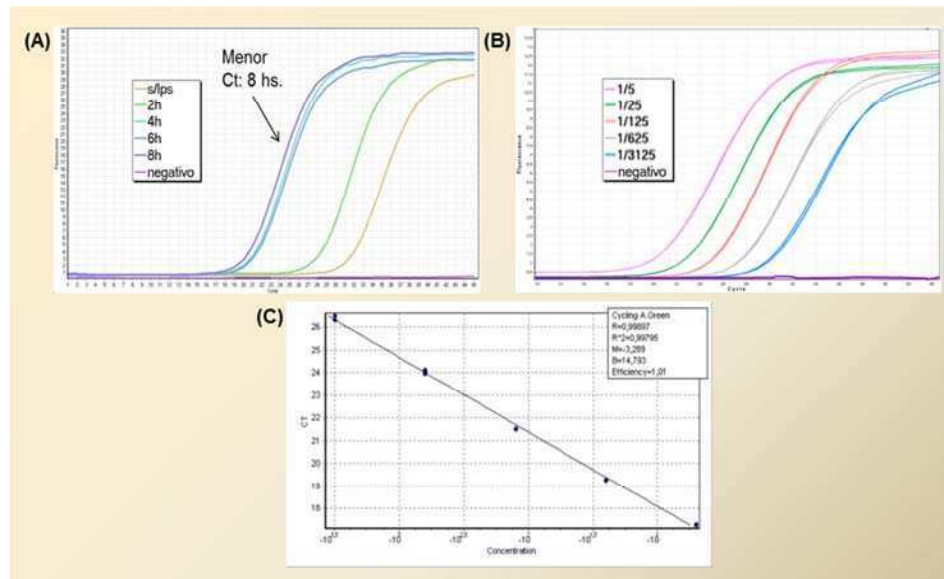
1.1. Eficiencia de amplificación y sensibilidad de la qPCR

Las eficiencias de amplificación de las qPCRs de los genes *target* y del gen *housekeeping*, la cual resulta específica del par de *primers* y de las condiciones utilizadas, se determinaron a partir de la realización de una curva estándar para cada uno de ellos.

A fin de lograr curvas que permitan la cuantificación relativa en un rango dinámico adecuado, inicialmente se evaluó la expresión de cada gen *target* mediante qPCR en diferentes condiciones de cultivo: a distintos tiempos de estimulación (2, 4, 6 y 8 hs.) con el agregado de LPS y sin estimulación (ver Materiales y métodos sección 5.2). Para la construcción de la curva estándar, se optó por trabajar con el ADNc del cultivo que presentó el menor valor de Ct para cada gen *target* (Figura 24 A). A partir de esta muestra, se realizaron diluciones seriadas 1/5 del ADNc y se amplificó cada punto de la curva por duplicado (Figura 24 B). El valor de la pendiente de la recta resultante se determinó graficando los valores de Ct *versus* el logaritmo de la concentración (dilución del ADNc) (Figura 24 C). La eficiencia de amplificación se calculó a partir de la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$.

En la Tabla 17 se muestran los valores de eficiencia obtenidos a partir de las curvas estándar realizadas para cada gen *target* y el gen *housekeeping*. Además, la realización de las curvas estándar también permitió determinar la sensibilidad límite o límite de detección (cantidad mínima de ADNc detectable) para cada uno de los genes estudiados.

Figura 24: Curva estándar para el cálculo de la eficiencia de la reacción de qPCR



Determinación de la eficiencia de amplificación de la qPCR a partir de la realización de una curva estándar. (A) Evaluación de la expresión génica de cada gen *target* mediante qPCR en diferentes condiciones de cultivo (ejemplo: gen *IFNG*). (B) Diluciones seriadas 1/5 del ADNc y amplificación de cada punto de la curva por duplicado. (C) Gráfico de los valores de Ct *versus* el logaritmo de la concentración (dilución del ADNc).

1.2. Reproducibilidad de la qPCR: variación intra- e inter-ensayo

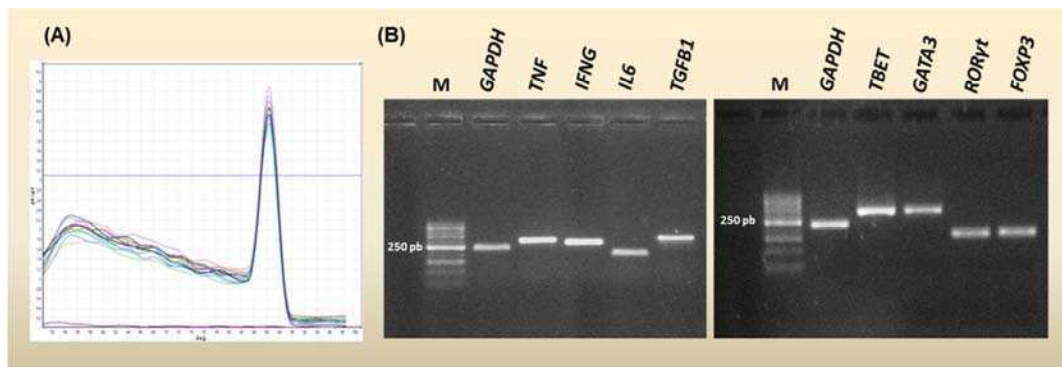
Los pasos realizados para el análisis mediante qPCR, desde el procesamiento de la muestra hasta la detección final de los productos, influyen en la reproducibilidad del ensayo. Este parámetro evalúa la capacidad de una prueba para obtener iguales resultados a partir de mediciones de una misma muestra. Para confirmar la reproducibilidad de las qPCRs, la variación intra-ensayo se determinó a partir de los valores de Ct obtenidos por duplicado de una dilución correspondiente a la curva estándar para cada gen. Mientras que, la variación inter-ensayo se investigó evaluando los valores Ct promedios de una dilución, a partir de tres curvas estándar independientes realizadas para cada gen. La variabilidad intra- e inter-ensayo se estimó mediante el coeficiente de variación (CV) de los valores Ct, el cual se utiliza habitualmente como un indicador de la reproducibilidad de una prueba (Tabla 17).

1.3. Especificidad de la qPCR

Cuando se utilizan colorantes fluorescentes, como *Eva Green* o *SYBR Green*, en la metodología de qPCR, debe considerarse que estos colorantes se intercalan cuantitativamente en cualquier especie de ADN doble cadena. Por lo tanto, al unirse al

total de ácidos nucleicos en la reacción de qPCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son, incluyendo los dímeros de *primers*. Para comprobar que el producto amplificado que prevalece es el producto PCR específico para cada gen estudiado, se analizaron cualitativamente las curvas de desnaturalización o curvas de *melting* (*Melting curves*). Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos. Las curvas de *melting* son características de cada producto PCR específico y depende de su longitud, de su secuencia de bases y de su contenido de GC. Todas las reacciones de qPCR presentaron un pico único en la curva de *melting* (Figura 25 A), lo cual garantizó la especificidad de la amplificación. Además, para complementar el análisis, los productos de cada reacción de qPCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v y BrEt a 0,25 µg/mL, el cual se reveló observando la fluorescencia producida en un transiluminador UV, obteniéndose para todos los genes bandas únicas de amplificación (Figura 25 B).

Figura 25: Especificidad de la qPCR



Determinación de la especificidad de la reacción de qPCR. (A) Análisis cualitativo de las curvas de desnaturalización o curvas de *melting*, donde la presencia de un pico único garantiza la especificidad de la amplificación. (B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos en cada reacción de qPCR. M: marcador de peso molecular.

2. Validación del modelo de cuantificación: el método comparativo $2^{-\Delta Ct}$

Para validar la cuantificación relativa de la expresión génica obtenida mediante el método comparativo $2^{-\Delta Ct}$, se verificó que la eficiencia de la reacción de qPCR sea óptima y que la eficiencia de amplificación de cada gen *target* y del gen *housekeeping* sean iguales (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008).

2.1. Eficiencias de amplificación

La eficiencia de amplificación de la qPCR para cada gen *target* y el gen *housekeeping* se determinó a partir de la realización de una curva estándar (ver Materiales y métodos sección 5.2). Se establecieron como óptimos aquellos valores de eficiencia dentro de un rango considerando un 10% de variabilidad a partir del valor máximo (valor máximo: 1,0; rango de eficiencias óptimas: 0,90-1,10) (Tabla 17). Además, se evaluó que los criterios de sensibilidad, reproducibilidad y especificidad de la reacción de qPCR sean los adecuados para la aplicación de esta metodología, como se especificó anteriormente.

Tabla 17: Valores de eficiencias y reproducibilidad de las qPCRs

Gen	Eficiencia*	Reproducibilidad intra-ensayo (CV)	Reproducibilidad inter-ensayo (CV)
<i>GAPDH</i> [†]	0,94	0,21%	0,30%
<i>TNF</i>	0,93	0,54%	0,70%
<i>IL6</i>	0,94	0,55%	0,62%
<i>IFNG</i>	0,98	0,19%	0,28%
<i>TGFB1</i>	0,98	0,38%	0,46%
<i>GAPDH</i> [‡]	0,92	0,32%	0,40%
<i>TBET</i>	0,94	0,43%	0,52%
<i>GATA3</i>	0,94	0,39%	0,50%
<i>RORγt</i>	0,98	0,28%	0,36%
<i>FOXP3</i>	0,98	0,41%	0,62%

CV: coeficiente de variación expresado como porcentaje.* Corresponde al valor de eficiencia promedio obtenido a partir de tres curvas estándar independientes para cada gen. [†] Sistema Mezcla Real (*Biodynamics*), [‡] sistema *SYBR Selected Master Mix* (*Applied Biosystem*).

2.2. Igualdad en las eficiencias de amplificación

Para verificar que las eficiencias de amplificación del gen *target* y del gen *housekeeping* sean iguales, se testeó cómo varían los ΔC_t en cada una de las diluciones de las curvas estándar realizadas para cada uno de ellos. Se calculó el ΔC_t para cada punto de la curva, se realizó una regresión lineal verificando que la pendiente de la recta resultante no sea estadísticamente diferente a cero (Figura 26). Este resultado garantizó la igualdad en las eficiencias de las qPCR del gen *target* y *housekeeping*, y la validación de los resultados obtenidos mediante la aplicación del método de cuantificación relativa $2^{-\Delta C_t}$.

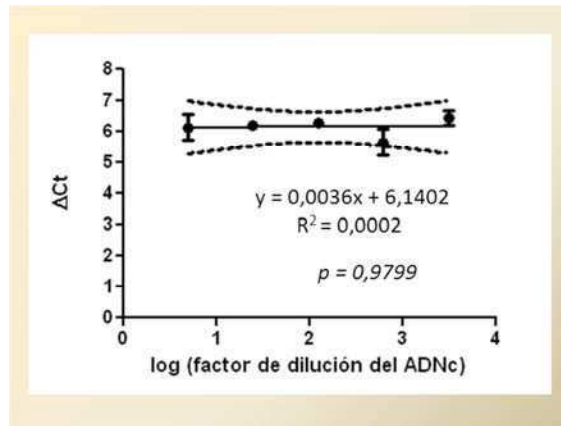


Figura 26: Verificación de la igualdad en las eficiencias de las qPCR

Regresión lineal para verificar la igualdad en las eficiencias de las qPCRs de cada gen *target* y el *housekeeping*.

3. Estudios de expresión génica en AA

La expresión de los genes que codifican citoquinas (*TNF*, *IL6*, *IFNG* y *TGFB1*) y factores de transcripción críticos en la diferenciación de las células T (*TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3*), relativa al gen *housekeeping GAPDH*, fue evaluada a partir de muestras de SP en 34 pacientes con AA y 23 individuos controles.

La población de AA presentó una media de edad de 21 años (\pm DE: 18) con una mediana de 14 años (rango: 2-74), y una relación de género masculino/femenino (M/F) de 19/15: 1,3. La población control presentó una media de edad de 35 años (\pm DE: 9) con una mediana de 32 años (rango: 25-56), y una relación de género M/F de 10/13: 0,8. Se evaluaron los niveles de expresión génica en la población total de AA y, también, se consideró la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra. Con respecto a esta situación, 12 pacientes se encontraban bajo TIS, 13 sin tratamiento (al diagnóstico y/o citopénicos) y 6 en remisión (3 pacientes no determinados). Dado que la TIS podría afectar los niveles de expresión de los genes estudiados, principalmente disminuyendo el nivel de aquellos involucrados con un perfil pro-inflamatorio, también fue realizado el mismo análisis excluyendo los pacientes que se encontraban bajo este tratamiento.

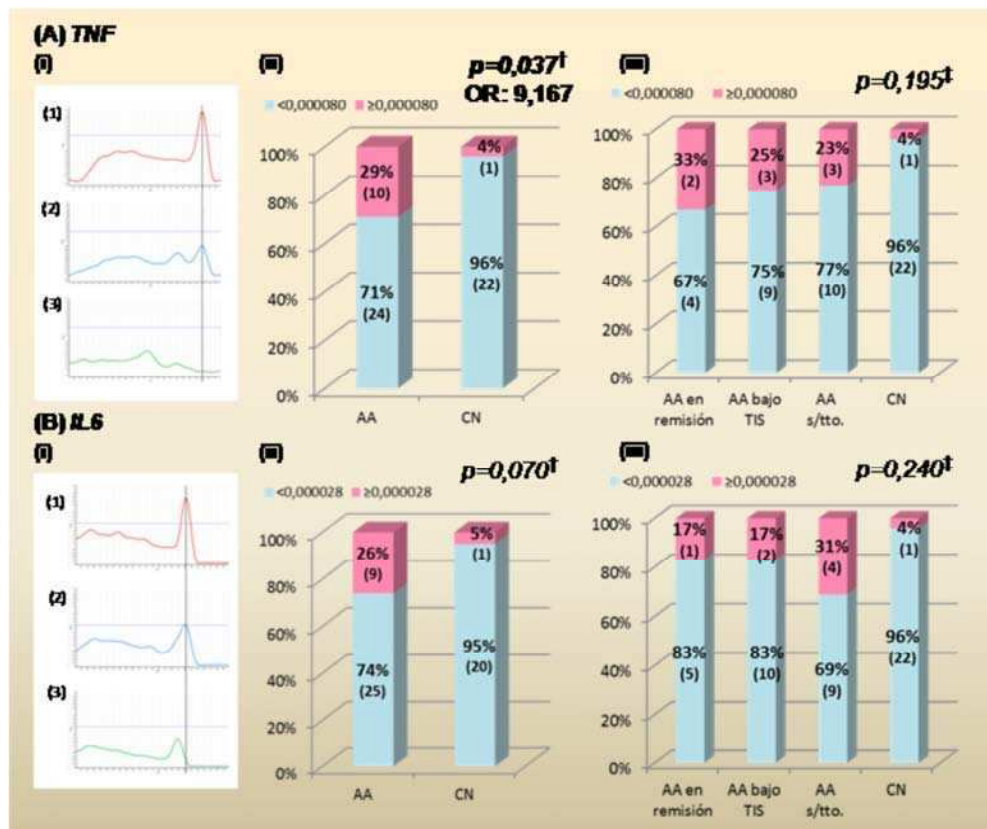
3.1. Niveles de expresión de los genes de citoquinas (*TNF*, *IL6*, *IFNG* y *TGFB1*)

3.1.1. Expresión génica de *TNF* e *IL6*

En la determinación de la cuantificación relativa de los genes *TNF* e *IL6* se obtuvieron tres tipos de muestras de acuerdo a las curvas de *melting* presentadas en cada caso: (1) amplificación sólo de producto específico, (2) amplificación de producto específico + inespecífico y (3) ausencia de producto específico [Figura 27 A y B, (i)]. Las

muestras con presencia de producto específico + inespecífico no pudieron ser cuantificadas mediante esta metodología debido a que su resultado se encuentra sobre-estimado como consecuencia de la amplificación del producto inespecífico. Tampoco pudieron cuantificarse aquellas muestras con producto específico no detectable. Debido a esta dificultad en la cuantificación, a partir de la curva estándar de cada gen se logró determinar en qué dilución la cantidad de transcripto disminuyó en tal medida que el producto inespecífico comienza a interferir con la amplificación del producto de interés. Para el gen *TNF* el punto de corte fue definido en un valor de cuantificación relativa de 0,000080, y para el gen *IL6* en un valor de 0,000028. Por lo tanto, el análisis fue realizado considerando 2 grupos de cuantificación relativa respecto al punto de corte definido para cada uno de los genes: superior [muestras (1)] e inferior [muestras (2) y (3)].

Figura 27: Expresión génica de *TNF* e *IL6*



Resultados de la cuantificación relativa de los genes *TNF* (A) e *IL6* (B) en los pacientes con AA y en los controles normales (CN). (i) Determinación del tipo de muestra de acuerdo a las curvas de *melting* obtenidas en cada caso: (1) amplificación sólo de producto específico, (2) amplificación de producto específico + inespecífico y (3) ausencia de producto específico. (ii) Comparación entre la población total de pacientes con AA y los CN. (iii) Comparación considerando la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra. Los gráficos indican las frecuencias absolutas (n) y las frecuencias relativas

como porcentajes para cada grupo analizado. † Test exacto de Fisher, ‡ test Chi-cuadrado, OR: Odds ratio.

Como resultado del análisis del gen *TNF* se observó que la población total de AA presentó un porcentaje mayor de muestras con nivel de cuantificación relativa superior al punto de corte *versus* el grupo control (10/34, 29% *vs.* 1/23, 4%; $p=0,037$, OR: 9,167) [Figura 27 A, (ii)]. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la expresión génica de *TNF* al considerar la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra [Figura 27 A, (iii)]. Al excluir los pacientes bajo TIS, la población de AA también mostró un porcentaje mayor de muestras con nivel de cuantificación relativa superior al punto de corte *versus* los controles (7/22, 32% *vs.* 1/23, 4%; test exacto de Fisher: $p=0,022$, OR: 10,267), manteniéndose el mismo resultado obtenido al analizar la población total de pacientes.

En cuanto al gen *IL6*, la población total de AA no mostró diferencias significativas respecto a los controles [Figura 27 B, (ii)], así como tampoco al considerar la situación al momento de la toma de la muestra [Figura 27 B, (iii)]. Sin embargo, al excluir aquellos pacientes que se encontraban bajo TIS, el porcentaje de muestras con niveles de cuantificación relativa superior al punto de corte fue mayor en AA *versus* el grupo control (7/22, 32% *vs.* 1/21, 5%; test exacto de Fisher: $p=0,046$, OR: 9,333), indicando que la TIS podría disminuir los niveles del gen *IL6* en los pacientes tratados.

Finalmente, considerando en el análisis la expresión de ambos genes (Figura 28), los pacientes con AA son los que presentaron un porcentaje mayor de muestras que involucran un nivel de cuantificación relativa superior al punto de corte para *TNF* y/o *IL6* *versus* el grupo control (15/34, 45% *vs.* 2/21, 10%; test exacto de Fisher: $p=0,015$, OR: 7,500).

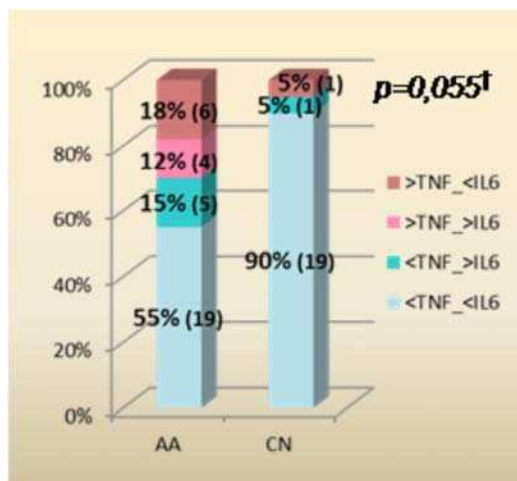


Figura 28: Expresión génica de *TNF* e *IL6*, considerando los niveles de ambos genes

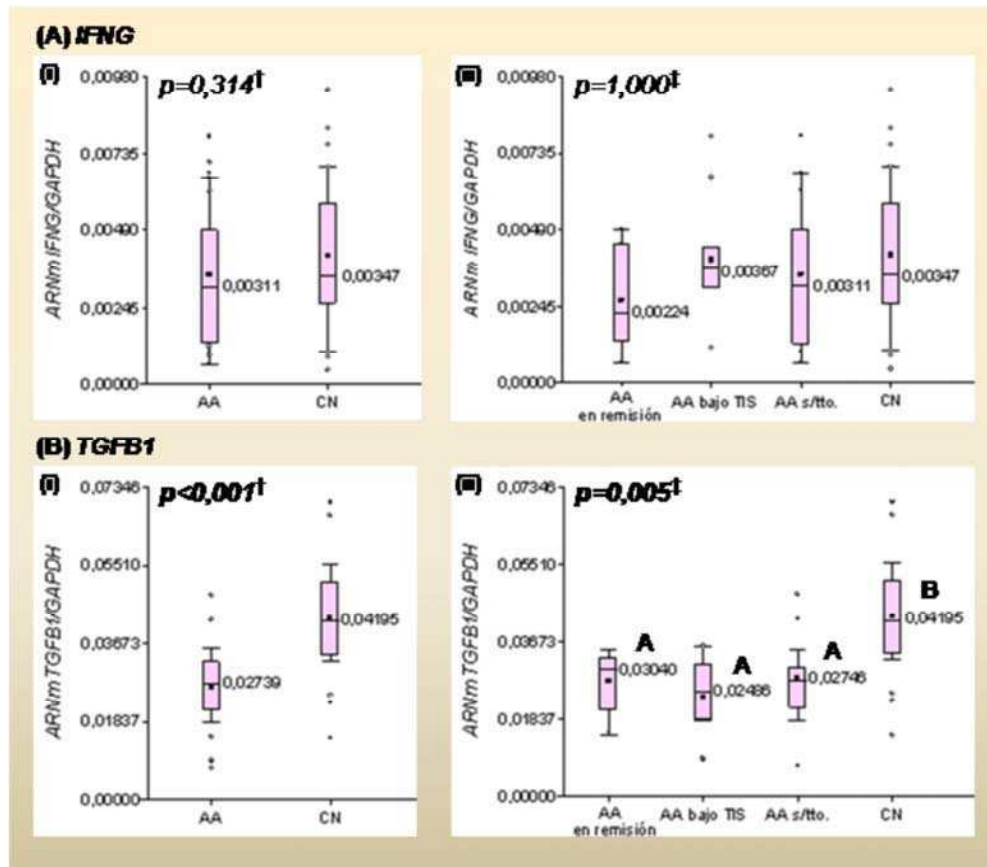
Resultados de la cuantificación relativa de los genes *TNF* e *IL6*, considerando los niveles de ambos genes (*TNF_IL6*). Comparación entre la población total de pacientes con AA y los controles normales (CN). El gráfico indica las frecuencias absolutas (n) y las frecuencias relativas como porcentajes para cada grupo analizado. † Test Chi-cuadrado.

Estos resultados reflejarían un estado pro-inflamatorio que predomina en la población de AA, con niveles de expresión génica de *TNF* e *IL6* incrementados, lo cual podría contribuir a la supresión hematopoyética.

3.1.2. Expresión génica de *IFNG* y *TGFB1*

Los resultados obtenidos para el gen *IFNG* no mostraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión entre los pacientes con AA *versus* los controles; así como tampoco al considerar la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra [Figura 29 A, (i) y (ii)]. Estos resultados no se modificaron al excluir los pacientes que se encontraban bajo TIS (0,00286 vs. 0,00347; test de *Mann-Whitney*: $p=0,196$).

Figura 29: Expresión génica de *IFNG* y *TGFB1*



Resultados de la cuantificación relativa del gen *IFNG* (A) y *TGFB1* (B) en los pacientes con AA y en los controles normales (CN). (i) Comparación entre la población total de pacientes con AA y los CN. (ii) Comparación considerando la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra. Los gráficos indican el valor correspondiente a la mediana (raya) y la media (punto) \pm DE para cada grupo. † Test de *Mann-Whitney*, ‡ test de *Kruskal-Wallis* (valores de medianas con una letra común no son significativamente diferentes: $p>0,05$).

El análisis de la cuantificación relativa del gen *TGFB1* mostró una disminución significativa en los niveles de expresión de esta citoquina en la población total de AA *versus* el grupo control ($p < 0,001$) [Figura 29 B, (i)]. Esta diferencia se mantuvo al considerar la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra ($p = 0,005$) [Figura 29 B, (ii)]. La población de AA también mostró niveles de cuantificación relativa inferiores respecto a los controles (0,02978 vs. 0,04196; test de *Mann-Whitney*: $p < 0,001$) al excluir los pacientes bajo TIS.

Los niveles génicos de *IFNG*, una típica citoquina pro-inflamatoria Th1, no mostraron un aumento en la población de AA. Sin embargo, la disminución de *TGFB1* podría reflejar anomalías en el *subset* de linfocitos Treg, principalmente de los iTreg, por su necesidad de requerir TGF- β 1 para su diferenciación a nivel periférico.

3.1.3. Expresión plasmática de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ

Para complementar los resultados de expresión a nivel de ARNm de los genes *TNF*, *IL6* e *IFNG* se determinaron los niveles plasmáticos de estas citoquinas en muestras de SP de 15 pacientes con AA y 9 individuos controles.

Los resultados arrojaron que los pacientes con AA presentaron niveles plasmáticos de IL-6 incrementados respecto a la población control (6,59 pg/mL vs. niveles no detectables; test de *Mann-Whitney*: $p = 0,006$), observándose para TNF- α la misma tendencia (31,35 vs. 28,71 pg/mL; test de *Mann-Whitney*: $p = 0,086$). Con respecto a los niveles plasmáticos de IFN- γ , las diferencias encontradas entre la población de AA y los controles no fueron estadísticamente significativas (18,34 vs. 13,33 pg/mL; test de *Mann-Whitney*: $p = 0,890$).

Si bien la determinación de estas citoquinas en plasma fue realizada en una serie menor de pacientes y controles, los resultados son consistentes con los obtenidos a nivel de expresión génica.

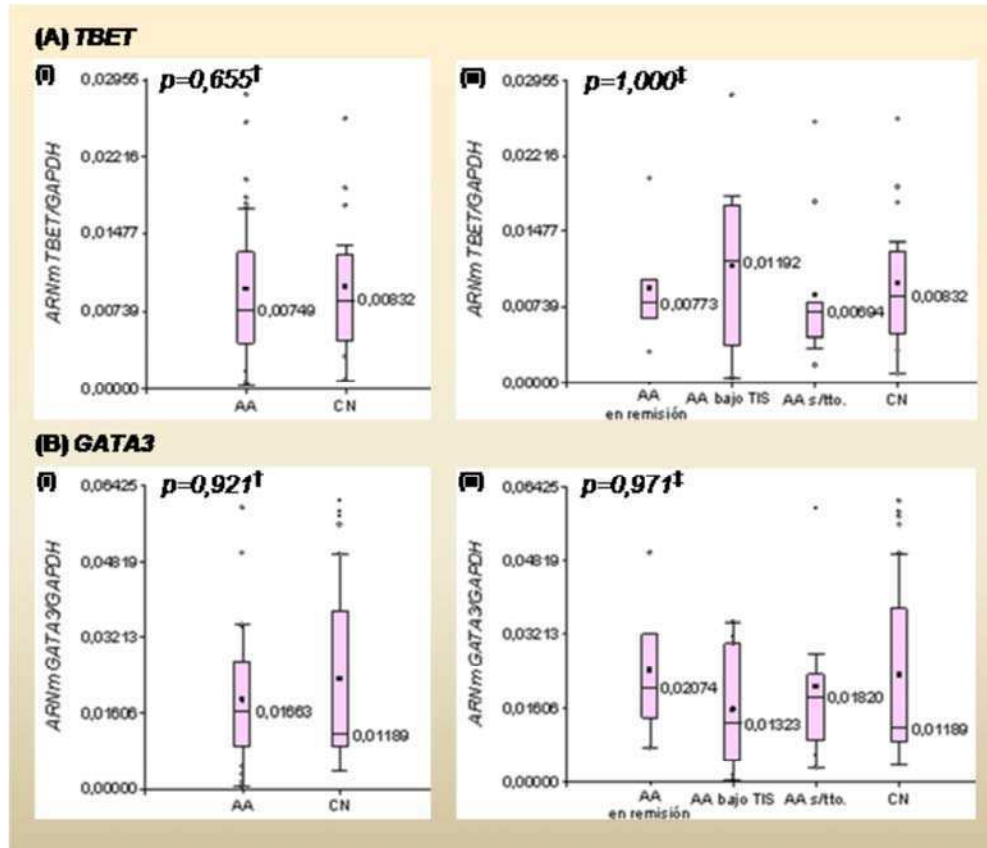
3.2. Niveles de expresión génica de los factores de transcripción (*TBET*, *GATA3*, *RORyt* y *FOXP3*)

3.2.1. Expresión génica de *TBET*, *GATA3*, *RORyt* y *FOXP3*

Los genes *TBET* y *GATA3*, los cuales codifican los factores de transcripción “reguladores maestros” de los linajes Th1 y Th2, respectivamente, no mostraron diferencias significativas en cuanto a sus niveles de expresión entre la población de AA *versus* los controles [Figura 30 A y B, (i)]; así como tampoco al considerar la

situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra [Figura 30 A y B, (ii)]. Estos resultados no se modificaron al excluir los pacientes que se encontraban bajo TIS (*TBET*: 0,00712 vs. 0,00832, y *GATA3*: 0,01753 vs. 0,01190; test de *Mann-Whitney*: $p=0,374$ y $p=0,880$, respectivamente).

Figura 30: Expresión génica de *TBET* y *GATA3*



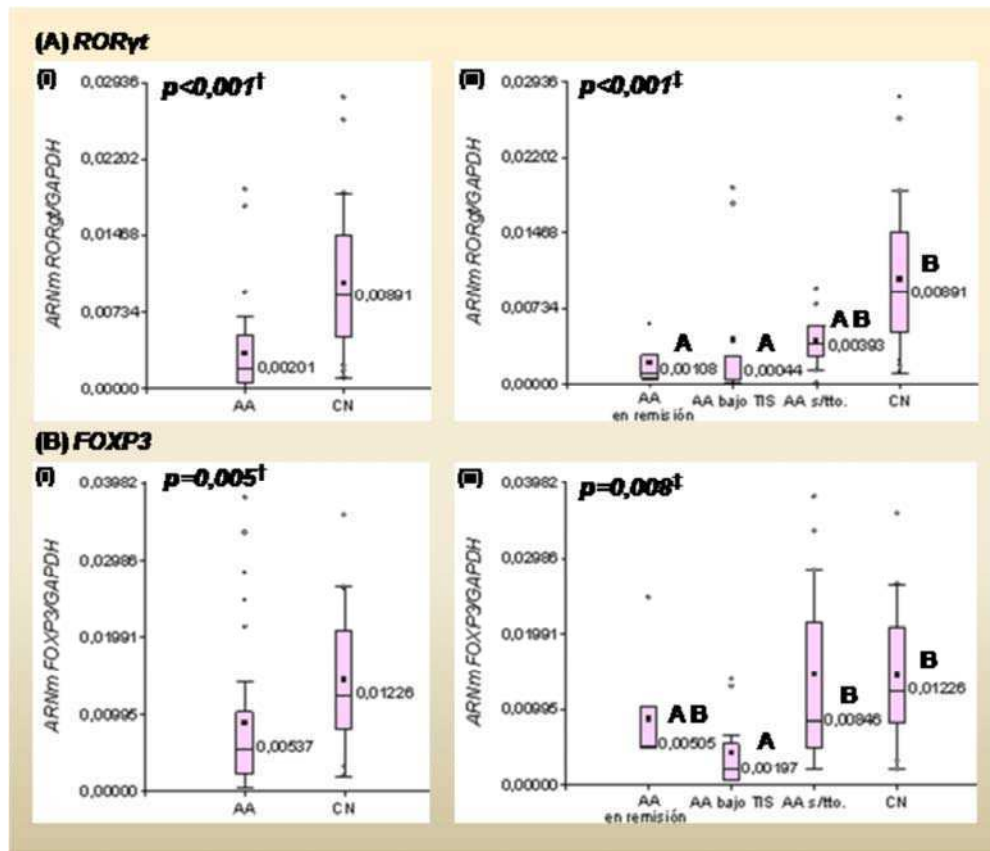
Resultados de la cuantificación relativa de los genes *TBET* (A) y *GATA3* (B) en los pacientes con AA y en los controles normales (CN). (i) Comparación entre la población total de pacientes con AA y los CN. (ii) Comparación considerando la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra. Los gráficos indican el valor correspondiente a la mediana (raya) y la media (punto) \pm DE para cada grupo. † Test de *Mann-Whitney*, ‡ test de *Kruskal-Wallis* (valores de medianas con una letra común no son significativamente diferentes: $p>0,05$).

Como resultado de la cuantificación relativa del gen *ROR γ t*, factor de transcripción responsable de la diferenciación del linaje Th17, se encontró una disminución significativa en sus niveles de expresión al comparar la población total de AA *versus* el grupo control ($p<0,001$) [Figura 31 A, (i)]. Esta diferencia también fue observada al considerar la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra, donde el grupo de pacientes bajo TIS y el grupo en remisión fueron los que presentaron los niveles menores de este gen ($p<0,001$) [Figura 31 A, (ii)]. Al excluir los pacientes bajo

TIS, la población de AA también mostró niveles de cuantificación relativa inferiores respecto a los controles (0,00261 vs. 0,00891; test de *Mann-Whitney*: $p < 0,001$).

Asimismo, la población total de AA presentó niveles de expresión génica disminuidos de *FOXP3*, el factor de transcripción crítico en la diferenciación de las células Treg, respecto al grupo control ($p = 0,005$) [Figura 31 B, (ii)]; siendo los pacientes bajo TIS los que mostraron el menor nivel de expresión de este gen ($p = 0,008$) [Figura 31 B, (ii)]. Debido a esto, al excluir los pacientes bajo TIS, sólo se observa una tendencia hacia menores niveles de *FOXP3* en los pacientes remanentes con AA (0,00576 vs. 0,01226; test de *Mann-Whitney*: $p = 0,086$).

Figura 31: Expresión génica de *RORγt* y *FOXP3*



Resultados de la cuantificación relativa de los genes *RORγt* (A) y *FOXP3* (B) en los pacientes con AA y en los controles normales (CN). (i) Comparación entre la población total de pacientes con AA y los CN. (ii) Comparación considerando la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra. Los gráficos indican el valor correspondiente a la mediana (raya) y la media (punto) \pm DE para cada grupo. † Test de *Mann-Whitney*, ‡ test de *Kruskal-Wallis* (valores de medianas con una letra común no son significativamente diferentes: $p > 0,05$).

La evaluación de los niveles de expresión génica de los factores de transcripción *TBET* y *GATA3* involucrados en la diferenciación de las respuestas efectoras Th1 y

Th2, respectivamente, no mostraron un aumento en la población de AA. Sin embargo, la disminución de *FOXP3* reflejaría una desregulación en el desarrollo y/o función del *subset* de linfocitos Treg. Asimismo, tanto la disminución de *FOXP3* como *RORγt*, podrían estar relacionadas con la disminución de *TGFB1*, ya que el desarrollo de ambos linajes (iTreg y Th17) requieren de la señalización vía TGF-β1 para inducir su diferenciación. Debido a que los linfocitos Treg ejercen funciones inmunosupresoras que contrarrestan las respuestas efectoras, su desregulación podría contribuir al componente autoinmune evidenciado en la fisiopatología de la AA.

3.2.2. Relación entre la expresión génica de *TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3*

Al evaluar la relación del nivel de expresión génica entre los factores de transcripción *TBET*, *GATA3* y *RORγt*, podemos describir el balance entre las diferentes respuestas efectoras (Th1, Th2 y Th17, respectivamente) (Figura 32 A).

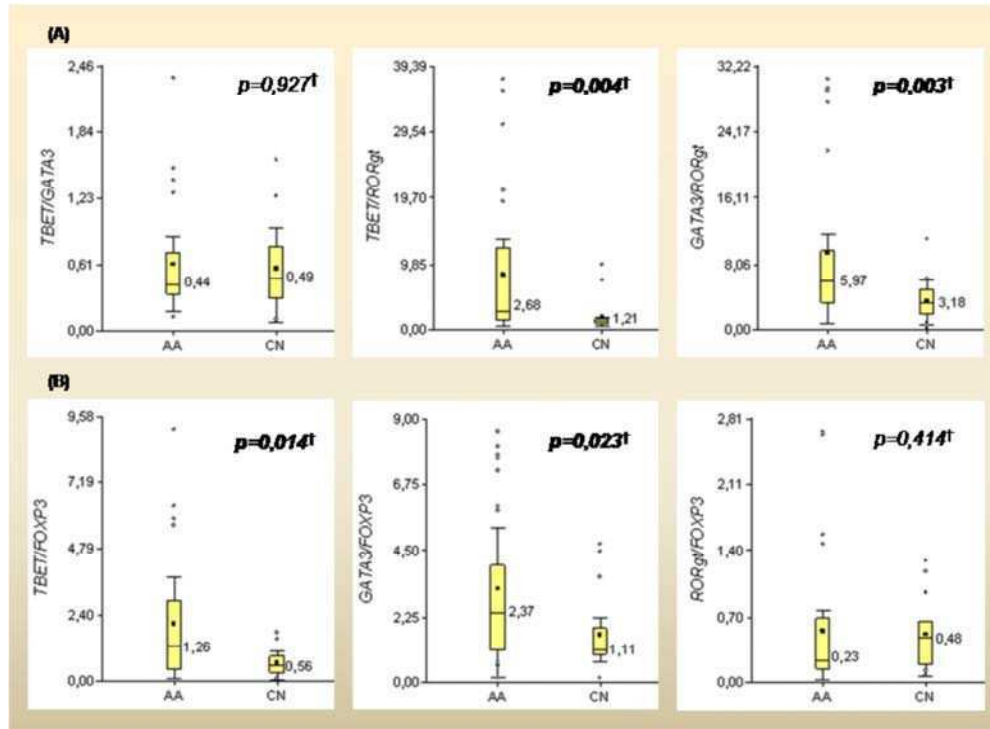
La relación *TBET/GATA3* no mostró diferencias significativas al comparar la población total de AA *versus* el grupo control (Figura 32 A); así como tampoco al considerar la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra (test de *Kruskal-Wallis*: $p=1,000$) y al excluir los pacientes bajo TIS (0,41 vs. 0,49; test de *Mann-Whitney*: $p=0,615$). Sin embargo, las relaciones *TBET/RORγt* y *GATA3/RORγt* mostraron un aumento significativo en la población de AA ($p=0,004$ y $p=0,003$, respectivamente) (Figura 32 A). Esta diferencia no fue observada al considerar la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra (test de *Kruskal-Wallis*: $p=1,000$ y $p=0,792$, respectivamente). Al excluir los pacientes bajo TIS, la población de AA también mostró un aumento significativo en estas relaciones respecto a los controles (*TBET/RORγt*: 2,57 vs. 1,21, y *GATA3/RORγt*: 7,39 vs. 3,18; test de *Mann-Whitney*: $p=0,012$ y $p=0,001$, respectivamente).

Para describir el balance entre cada respuesta efectora (Th1, Th2 y Th17) y la respuesta regulatoria, se evaluaron las relaciones de los niveles de expresión entre cada factor de transcripción (*TBET*, *GATA3* y *RORγt*, respectivamente) y *FOXP3* (Figura 32 B).

La población total de AA presentó relaciones *TBET/FOXP3* y *GATA3/FOXP3* aumentadas con respecto a los controles ($p=0,014$ y $p=0,023$, respectivamente), no mostrando diferencias en cuanto a la relación *RORγt/FOXP3* (Figura 32 B). Al considerar la situación de los pacientes al momento de la toma de la muestra, las relaciones *TBET/FOXP3*, *GATA3/FOXP3* y *RORγt/FOXP3* no mostraron diferencias significativas (test de *Kruskal-Wallis*: $p=0,1305$, $p=0,084$ y $p=0,177$, respectivamente).

En cuanto que, al excluir los pacientes bajo TIS las diferencias observadas entre la población de AA y los controles no fueron estadísticamente significativas ($TBET/FOXP3$: 0,71 vs. 0,56, $GATA3/FOXP3$: 1,90 vs. 1,11, y $ROR\gamma t/FOXP3$: 0,23 vs. 0,48; test de *Mann-Whitney*: $p=0,277$, $p=0,234$ y $p=0,067$, respectivamente).

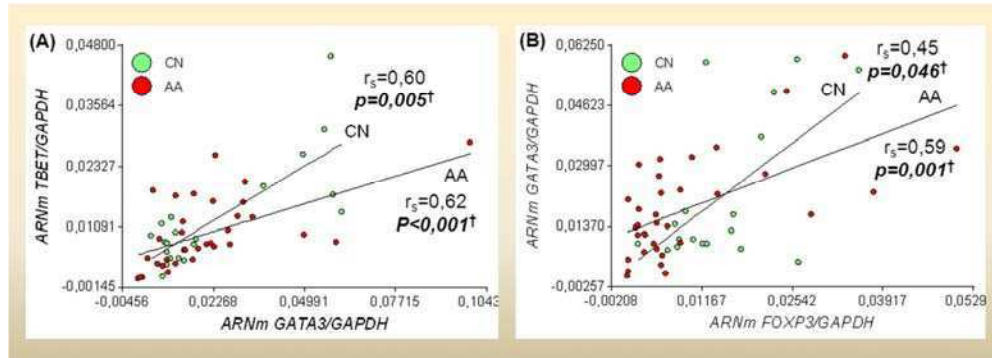
Figura 32: Relación entre la expresión génica de *TBET*, *GATA3*, *ROR γ t* y *FOXP3*



Relación entre los niveles génicos de *TBET*, *GATA3*, *ROR γ t* y *FOXP3*. (A) Evaluación del balance entre las diferentes respuestas efectoras. Comparación de las relaciones $TBET/GATA3$, $TBET/ROR\gamma t$ y $GATA3/ROR\gamma t$ entre los pacientes con AA y los controles normales (CN). (B) Evaluación del balance entre las respuestas efectoras y la respuesta regulatoria. Comparación de las relaciones $TBET/FOXP3$, $GATA3/FOXP3$ y $ROR\gamma t/FOXP3$ entre los pacientes con AA y los CN. Los gráficos indican el valor correspondiente a la mediana (raya) y la media (punto) \pm DE para cada grupo. † Test *Mann-Whitney*.

Los niveles génicos de *TBET* y *GATA3* presentaron una correlación positiva significativa tanto en la población de pacientes con AA como en los controles normales (Figura 33 A). También fue observada una correlación positiva significativa entre los niveles de expresión génica de *GATA3* y *FOXP3* en los pacientes y el grupo control (Figura 33 B). El resto de los factores de transcripción no mostraron asociaciones o covariaciones significativas entre sus niveles de expresión génica.

Figura 33: Correlaciones significativas entre la expresión génica de *TBET*, *GATA3* y *FOXP3*



Relación entre los niveles génicos de *TBET*, *GATA3* y *FOXP3*. (A) Correlación entre *TBET* y *GATA3*. (B) Correlación entre *GATA3* y *FOXP3*. Los gráficos de dispersión muestran la asociación entre los niveles de expresión de los genes analizados en la población de AA y en los controles normales (CN), indicando el correspondiente ajuste de los datos a una recta. r_s : coeficiente de correlación, † Correlación de Spearman.

La descripción del balance entre los diferentes factores de transcripción muestra una prevalencia de las respuestas efectoras Th1 y Th2 en los pacientes con AA, sobre la respuesta Th17, por defecto de la expresión génica de *ROR γ t*. Además, se describe una relación inversa entre las respuestas efectoras (Th1 y Th2) y Treg en la población de AA, como consecuencia de la disminución significativa de los niveles de expresión génica de *FOXP3*. Estos resultados proporcionan evidencia de que una deficiencia en la diferenciación y/o función de los linfocitos Treg, asociada con las respuestas efectoras mediadas por Th1 y Th2, jugaría un rol importante en el desarrollo y/o progresión de la AA.

Discusión

Discusión

La AA es una insuficiencia medular global de tipo cuantitativo, caracterizada por una médula ósea hipo o a-celular y pancitopenia periférica. Si bien la mayoría de los casos diagnosticados son de etiología idiopática, existe evidencia que involucra a un desorden autoinmune subyacente como posible mecanismo patogénico. La AA posee un riesgo potencial de progresión a enfermedades hematológicas clonales, entre las que se encuentran los SMD. La AA y los SMD presentan zonas de intersección clínica, lo cual genera controversias en el diagnóstico diferencial entre ambos desórdenes y, además, estos solapamientos podrían reflejar mecanismos patogénicos compartidos.

Los mecanismos involucrados en la patogénesis de la AA incluyen alteraciones en la inmunidad celular, la destrucción progresiva de las células hematopoyéticas y un microambiente medular anormal (Zeng y col., 2004; Young y Maciejewski, 2007; Shipounova y col., 2009). La desregulación y la disfunción de diferentes *subsets* de células T y la anormal producción de citoquinas son factores claves para el desarrollo de la AA (Kook y col., 2002; Giannakoulas y col., 2004; Feng y col., 2010). La principal evidencia clínica que involucra a un mecanismo autoinmune mediado por células T en la fisiopatología de la AA, es la respuesta efectiva de los pacientes a las TIS (Marsh y col., 2009; Scheinberg y col., 2011).

Inicialmente, las células Tc CD8+ se asociaron a la patogénesis de las respuestas autoinmunes. Sin embargo, los estudios más recientes confirman la importancia de las células T CD4+ en la inducción de la autoinmunidad y que, incluso, pueden ser más importantes que las células Tc CD8+ (Perez-Diez y col., 2007). Estos linfocitos T CD4+ incluyen: células productoras de IFN- γ (linfocitos Th1), células productoras de IL-4 (linfocitos Th2), células productoras de IL-17 (linfocitos Th17), y células Treg. La adecuada función de los *subsets* celulares Th1, Th2, Th17 y Treg requiere de un equilibrio entre los factores de transcripción responsables de su diferenciación: T-bet, GATA-3, RoRyt y Foxp3, respectivamente (Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Basu y col., 2013; Cosmi y col., 2013). Es poco probable que la expansión oligoclonal aberrante de células Tc CD8+, como un evento aislado, sea el mecanismo principal en la inducción de la insuficiencia medular en AA. Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, las células T CD4+ serían importantes impulsoras de la respuesta inmune a antígeno(s) no identificados. El rol de estos linajes T CD4+ en la patogénesis de la AA aún no ha sido claramente caracterizado.

Si bien las evidencias involucran la presencia de un estado activado de linfocitos T en los pacientes con AA, no hay pruebas convincentes acerca de la participación de

antígenos que impulsen esta respuesta inmune celular, y mucho menos del antígeno causal que provoca la agresión de las células T al tejido hematopoyético. Si existiera un reconocimiento específico de las células hematopoyéticas por los linfocitos T, debería encontrarse en pacientes con AA una expansión clonal de un número limitado de linfocitos T. Además, si un antígeno común fuera el responsable de desencadenar esta respuesta, las expansiones clonales de linfocitos T en diferentes pacientes deberían compartir un clonotipo.

Diversos estudios analizaron la región determinante de complementariedad 3 (CDR3: *complementarity-determining region 3*) de la cadena variable β ($V\beta$) del receptor de los linfocitos T a fin de caracterizar el repertorio de la población de células T en los pacientes con AA. En la mayoría de los pacientes se encontró una sobre-representación de diferentes familias $V\beta$, tanto en linfocitos T efectores CD4+ como CD8+, y se determinó que las poblaciones eran oligoclonales de acuerdo al patrón de distribución de tamaños del CDR3 en ciertas familias $V\beta$ (Manz y col., 1997; Zeng y col., 1999; Kook y col., 2002; Risitano y col., 2002; Kordasti y col., 2012). Sin embargo, no pudieron ser identificados patrones específicos de $V\beta$ comunes a todos los pacientes, lo cual puede deberse a la heterogeneidad que presenta el CMH o el sistema HLA. Esta expansión oligoclonal de unas pocas familias $V\beta$ disminuye o desaparece en respuesta a diferentes protocolos de TIS (Manz y col., 1997; Zeng y col., 1999; Kook y col., 2002; Risitano y col., 2002; Kordasti y col., 2012). Los hallazgos son compatibles con una respuesta antígeno-específica de las células T, donde la expansión de múltiples clones media el proceso inmunológico subyacente en la patogénesis de la AA.

Los principales mecanismos efectores implicados en la patogénesis de la AA incluyen: los linfocitos Th1, los linfocitos Tc, la consecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente IFN- γ y TNF- α , con actividad inhibitoria sobre los progenitores hematopoyéticos, y el aumento de la apoptosis (Maciejewski y col., 1995; Kook y col., 2002; Sloand y col., 2002; Giannakoulas y col., 2004). También se ha involucrado la participación de células Th17, aunque su rol potencial en la fisiopatología de la AA aún se encuentra discutido. La diferenciación de este linaje celular puede ser inducida en presencia de TGF- β 1 e IL-6, y ejerce su función mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-17, TNF- α e IL-6). Además, existiría una deficiencia en el *subset* de células Treg, claves en la supresión de las células T auto-reactivas, en los pacientes con AA. La citoquina TGF- β 1 es importante para la funcionalidad del *subset* Treg en general y para la diferenciación de células

iTreg en particular, cuyos mecanismos efectores incluyen la producción de citoquinas inhibitoras, como TGF- β 1 e IL-10.

Por lo tanto, el presente trabajo incluye el estudio de polimorfismos asociados con la expresión diferencial de los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*, los cuales codifican citoquinas involucradas en la patogénesis de la AA, a fin de establecer su relación con susceptibilidad y/o características clínico-patológicas en pacientes con AA y SMD. Además, con el objetivo de caracterizar una posible desregulación en la producción de citoquinas, se estudiaron los niveles de expresión de los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1* en pacientes con AA. Asimismo, para evaluar el papel potencial de las células T CD4+ en la enfermedad, se determinaron los niveles de expresión génica de los factores de transcripción claves en las respuestas Th1, Th2, Th17 y Treg: *TBET*, *GATA3*, *ROR γ t* y *FOXP3*, respectivamente, en pacientes con AA.

1. Estudio de los polimorfismos en genes de citoquinas en AA y SMD

1.1. Relación con susceptibilidad

La existencia de una predisposición genética a desarrollar estados patológicos autoinmunes es reconocida en numerosas enfermedades. La inducción de la autoinmunidad involucra factores inmuno-genéticos que pueden desempeñar una predisposición importante hacia un aumento/ reducción de la respuesta inmune. En diversos genes de citoquinas, existen polimorfismos que se encuentran ubicados en regiones promotoras o reguladoras y están asociados con su expresión diferencial. Los polimorfismos funcionales en genes que codifican para citoquinas representan un grupo de factores inmuno-genéticos de gran interés para evaluar la susceptibilidad/protección a desórdenes autoinmunes (Pociot y col., 1993; Wilson AG y col., 1994; Heward y Gough, 1997; Rood y col., 2000; Waldron-Lynch y col., 2001; Sauntharajah y col., 2002; Gidvani y col., 2007). Además, su estudio en varios SFM adquiridos ha permitido definir su asociación con susceptibilidad y/o con manifestaciones clínicas específicas (Dufour y col., 2004; Fermo y col., 2004; Gidvani y col., 2007; Parnes y col., 2010; Bestach y col., 2011; Lee y col., 2011; Serio y col., 2011; Bestach y col., 2015). Particularmente, la presencia de las variantes polimórficas relacionadas a un incremento en la producción de las citoquinas *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1* podría estar asociada con susceptibilidad hacia una respuesta inmune alterada y una desregulación hematopoyética en los SFM adquiridos, incluyendo a la AA y a los SMD en las etapas tempranas del desarrollo.

Los resultados obtenidos en el estudio del SNP -308 G/A del gen *TNF* mostraron que los genotipos A/A+G/A, asociados a mayor producción del gen, no se encuentran sobre-representados en la población de AA respecto a la población control. Este resultado es concordante con otros estudios, donde describen que no habría una asociación entre este SNP y susceptibilidad a AA (Fermo y col., 2004; Lee y col., 2011; Serio y col., 2011). Mientras que, en los pacientes con SMD sí se observó una frecuencia significativamente mayor, indicando que la presencia del alelo -308A en el genotipo podría conferir susceptibilidad a la enfermedad. La misma relación con predisposición fue descrita en otras series de pacientes con SMD (Powers y col., 2007; Bestach y col., 2011; Serio y col., 2011).

Con respecto a los polimorfismos +874 A/T y +875 CAn del gen *IFNG*, no se encontró una relación entre la presencia de los alelos +874T y 12 CA, asociados a mayor producción del gen, y susceptibilidad a AA. Sin embargo, otros trabajos sí describen la existencia de esta relación (Dufour y col., 2004; Fermo y col., 2004; Gidvani y col., 2007). Los criterios de inclusión/ exclusión pueden afectar, entre otras variables, los resultados discordantes: Serio y col. relacionan al genotipo asociado a mayor producción de *IFNG* (T/T) en los pacientes con AA que presentaban un clon HPN. Al respecto, la detección de un clon HPN >1,5% fue criterio de exclusión en la presente serie de AA. Tampoco se observó asociación con predisposición en los pacientes con SMD, coincidiendo con el resultado del único trabajo realizado por los mismos autores, quienes estudiaron sólo el SNP +874 A/T (Serio y col., 2011).

En el análisis del SNP -174 G/C del gen *IL6* los hallazgos mostraron que no habría una asociación con susceptibilidad en relación a la AA, siendo este resultado consistente con otros trabajos (Fermo y col., 2004; Serio y col., 2011). Sin embargo, la población de SMD presentó una frecuencia significativamente mayor de los genotipos G/C+C/C y del alelo -174C, asociados a menor producción de *IL6*, respecto a los controles. Los resultados de este trabajo indicarían un efecto protector del alelo -174G en la población normal. Estos resultados no fueron observados por Aladzcity y col., único trabajo que evalúa este SNP en pacientes con SMD (Aladzcity y col., 2009).

Los SNPs +869 C/T y +915 G/C del gen *TGFB1* no mostraron asociaciones con predisposición a AA, así como tampoco a SMD. De igual manera la combinatoria de ambos SNPs no arrojó diferencias en cuanto a las frecuencias de los genotipos asociados a alta, intermedia y baja producción de esta citoquina respecto al grupo control. Sin embargo, otros trabajos relacionaron genotipos asociados a alta producción de *TGFB1* con susceptibilidad a AA (Fermo y col., 2004; Serio y col., 2011) y, también, a SMD (Powers y col., 2007; Serio y col., 2011).

En cuanto a la comparación de las frecuencias alélicas de estos polimorfismos entre ambas patologías se observó, en los pacientes con SMD, una mayor frecuencia de variantes polimórficas asociadas a alta producción de *TNF* (-308A) e *IFNG*, (+874T y 12 CA), y una tendencia a respecto a la combinación de SNPs (+869 C/T - +915 G/C) de *TGFB1*. Mientras que, en la población de AA, se observó una mayor frecuencia del alelo asociado a alta producción de *IL6* (-174G) respecto a la población con SMD. Lo cuál podría indicar una presión selectiva diferente en las células dañadas y/o susceptibles a desarrollar estas enfermedades.

Las discrepancias mencionadas al comparar nuestros resultados y los diferentes trabajos que estudian estos polimorfismos en los genes de citoquinas podrían relacionarse a diversos factores. Entre las principales causas que pueden afectar los estudios de asociación de una determinada variante polimórfica con susceptibilidad o protección a la enfermedad se encuentran: 1) los criterios de inclusión/ exclusión de los pacientes al estudio, 2) el tamaño de la serie, y 3) el origen étnico de las poblaciones analizadas.

La selección de los pacientes con AA varía de acuerdo a los criterios de inclusión/ exclusión considerados en cada trabajo publicado. Entre los principales criterios se encuentran: incluir o no pacientes con un clon HPN, incluir o no pacientes con un cariotipo alterado al diagnóstico, incluir o no casos de AA secundarios, incluir sólo pacientes pediátricos o adultos, o ambos. La serie analizada en este trabajo no incluyó pacientes con AA que presentaron un clon HPN >1,5% determinado por citometría de flujo, así como tampoco incluyó pacientes con cariotipo alterado al diagnóstico, ni casos de AA secundarios (hepatitis, intoxicación con metales pesados, entre otros). Una revisión de la literatura mostró que la distribución de edades de las series de AA muestra un amplio espectro de valores de mediana, media y rango (ver Introducción Tabla 2). En relación a la edad, en este trabajo no se aplicó ningún criterio de exclusión, por lo tanto, fueron incluidos tanto pacientes pediátricos como adultos. Además, resultó muy difícil encontrar estudios que incluyan grandes poblaciones de pacientes con AA, principalmente en aquellos que involucran análisis experimentales, siendo la mayoría de las series inferiores a 80 pacientes (ver Introducción Tabla 2).

Igualmente, los criterios de selección de los pacientes con SMD pueden variar por la utilización de diferentes criterios de diagnóstico/ clasificación e inclusión de casos en estadios más avanzados o con SMD secundarios a la exposición a quimioterapia. Los pacientes de la serie analizada fueron clasificados según la OMS y, por lo tanto, se excluyeron pacientes con LMA/ AREBt y con LMMC. Al menos uno de ellos o ambos subtipos morfológicos pertenecientes a la clasificación FAB fueron incluidos en los

trabajos de Kádár y col., 2005; Parnes y col., 2010; Serio y col., 2011; ó, como en el caso de Balog y col., 2005, quienes sólo analizaron pacientes con el subtipo AR. Además, otro parámetro importante es el porcentaje de cariotipos alterados, el cual varía en las diferentes series entre 80% (Serio y col., 2011) a sólo 1 (13%) de los 8 pacientes evaluables del trabajo de Powers y col, 2007. La distribución de los diferentes subtipos morfológicos, la presencia de cariotipos alterados (47%), la relación de sexo (1,2), entre otros parámetros, de la presente serie es similar a lo descrito previamente para la población Argentina (Belli y col, 2014).

Las frecuencias alélicas pueden variar en los diferentes grupos étnicos. Por lo tanto, se realizaron búsquedas en distintas bases de datos a fin de evaluar esta variabilidad: *US National Library of Medicine, National Institutes of Health (PubMed), International HapMap Project, 1000 Genomes Project phase 1* (actualización Diciembre 2014), y en la base de datos de SNPs (dbSNP) del *National Center of Biotechnology (NCBI)*.

Para el SNP -308 G/A del gen *TNF*, la frecuencia del alelo -308A no mostró grandes variaciones entre las diferentes poblaciones controles (en comparación con los restantes polimorfismos estudiados), oscilando entre aproximadamente 2% a 17%. En los extremos se encuentran las frecuencias encontradas en la población de Taipei, Taiwán (0,018) y la observada en los pobladores del condado de Utah con ancestros de Europa del Norte y del Oeste (0,173). La frecuencia alélica en nuestra población (0,069) es similar a la observada en la población italiana de Padua y en los pobladores con ancestros mexicanos oriundos de California (0,060).

Las frecuencias de los alelos +874T y 12 CA, respecto de los polimorfismos +874 A/T y +875 CAn del gen *IFNG*, parecen ser específicas de la población estudiada, oscilando entre 9% a 50%. La población de origen asiático (Japón y China) presenta la frecuencia alélica más baja (0,093); mientras que, las poblaciones de Europa (Italia, Reino Unido y España, entre otros) son las que alcanzan los valores superiores (0,497). La frecuencia alélica de nuestra población control (0,367) es similar a la observada en las poblaciones de Rio de Janeiro y San Pablo, Brasil (0,399).

Con respecto al SNP -174 G/C del gen *IL6*, las frecuencias alélicas también parecen variar con respecto a la población analizada. La frecuencia del alelo -174C oscila entre 0% a 50%. Los valores más bajos (0%) se observan en la población asiática y en los africanos provenientes de Kenia y Nigeria. Mientras que, este alelo es más frecuente entre los pobladores del condado de Utah con ancestros de Europa del Norte y del Oeste (0,500), finlandeses (0,441) y británicos (0,399). La frecuencia alélica observada en nuestra población (0,252) es similar a la observada en los colombianos de Medellín

(0,283) y los puertorriqueños (0,209), e inferior a los italianos de la Toscana (0,352) y a los europeos de la península Ibérica (0,321).

Los polimorfismos del gen *TGFB1* también presentan un grado de variación en sus frecuencias alélicas de acuerdo a las poblaciones analizadas. Para el SNP +869 C/T, la frecuencia del alelo +869C varía entre 32% a 61%, correspondiendo estas frecuencias extremas a la población finlandesa (0,317) y a la población del sur de China (0,605). En nuestra población, la frecuencia de este alelo (0,488) es similar a la encontrada en la población americana y en los europeos de la península Ibérica (0,464). Mientras que, para el SNP +915 G/C, la frecuencia del alelo +915C parece ser homogénea entre los distintos grupos controles, variando entre 0% y 10%. La frecuencia en nuestra población (0,068) es intermedia a la frecuencia observada en la población americana (0,041) y la europea (0,078).

El análisis de asociación de variantes polimórficas y susceptibilidad a enfermedad se evalúa con respecto a su población control. Las frecuencias alélicas encontradas en población argentina, del presente trabajo, son similares a las encontradas en las restantes poblaciones americanas relevadas y, levemente, diferentes a las de las poblaciones italianas e ibéricas. La población argentina es un crisol de razas altamente influenciada por corrientes migratorias mayoritariamente provenientes de España e Italia (INDEC, 2012). Sin embargo, el análisis de variaciones de secuencia de ADN mitocondrial muestra una alta frecuencia de haplogrupos de origen amerindio (Bobillo y col., 2010).

La revisión de las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados muestra que existe variabilidad étnica y geográfica. Los polimorfismos de los genes *IFNG* e *IL6* son los que presentan las diferencias más importantes entre las distintas poblaciones, con frecuencias alélicas que oscilan entre ausencia total del alelo o valores muy bajos (0%-2%) hasta frecuencias alélicas del 50%. Con lo cual, debido a la variabilidad observada en estas frecuencias, podrían existir discrepancias entre poblaciones de distinta etnia respecto al análisis de estas variantes polimórficas. La búsqueda de trabajos en *PubMed* que analicen estos polimorfismos en los diferentes SFM arroja muy pocos estudios como para poder realizar un meta-análisis mediante el cual se podría evaluar la influencia de los polimorfismos, el origen étnico y la patología.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los polimorfismos estudiados en los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1* no estarían asociados con susceptibilidad a AA, en la población analizada. Mientras que, existiría una relación entre los SNP -308 G/A del gen *TNF* y -174 G/C del gen *IL6* y susceptibilidad a SMD. La presencia del alelo -

308A, asociado a mayor producción de *TNF*, estaría relacionado con un mayor riesgo de desarrollar un SMD, en la población estudiada; y, por otro lado, la presencia del alelo -174G, asociado a menor producción de *IL6*, presentaría un efecto protector, confiriendo menor predisposición a la enfermedad.

1.2. Relación con características clínico-patológicas

En la mayoría de los trabajos que estudian polimorfismos relacionados con la expresión diferencial de los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*, analizan si las variantes polimórficas asociadas a un incremento en la producción de estas citoquinas podrían predisponer a quienes las hereden a desarrollar AA o SMD. Sin embargo, independientemente de la asociación encontrada o no con susceptibilidad/ protección a la enfermedad, son escasos o ausentes los estudios que evalúen una posible asociación con las características clínicas de los pacientes con AA y/o SMD. Poco se sabe en qué medida la presencia de estas variantes polimórficas podrían afectar la severidad del cuadro clínico presentado al diagnóstico y/o modificar el curso natural de estas enfermedades.

El análisis de las características clínico-patológicas de los pacientes con AA y SMD en relación a los polimorfismos de los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*, además incluyó la evaluación de diferentes combinaciones de genotipos, a fin de establecer si alguna en particular contribuye y/o potencia las asociaciones descritas en el análisis individual de cada polimorfismo.

Los resultados obtenidos en AA mostraron que la presencia del alelo -308A, relacionado a mayor producción de *TNF*, se asoció con una edad menor y una neutropenia más severa, al diagnóstico. Además, el genotipo A/A+G/A mostró una frecuencia mayor en los pacientes clasificados como AA muy severa. Este resultado es consistente con la asociación encontrada entre el alelo -308A y una mayor severidad de la neutropenia, debido a que el criterio de clasificación de enfermedad muy severa se define en aquellos pacientes con recuentos de neutrófilos $\leq 200/\mu\text{L}$, al diagnóstico (Bestach y col., 2015). Con respecto al grado de anemia, los pacientes que portan en su genotipo los alelos +874T y 12 CA, asociados a mayor producción de *IFNG*, son los que presentaron los niveles de hemoglobina más bajos, al diagnóstico (Bestach y col., 2015). La combinación de genotipos mostró que aquellos pacientes con AA que porta los genotipos asociados a mayor producción de *IFNG* (12/12 CA + 12/no-12 CA) y menor producción de *TGFB1* (intermedia + baja) son los que presentaron los menores niveles de hemoglobina, al diagnóstico. Hasta el momento,

éste es el primer estudio que relaciona estos polimorfismos con características clínicas al diagnóstico en AA.

Además, la caracterización de las variantes polimórficas en los genes de citoquinas también podría proporcionar información en la toma de decisión terapéutica. El algoritmo de tratamiento (ver Introducción Figura 1) plantea la posibilidad de proceder con la TIS basada en la combinación de GAT y CsA en aquellos pacientes que carecen de un donante relacionado para llevar a cabo un TCPH. Sin embargo, el 30% no responden a las TIS y otro 30% recae luego de los 6 meses. Por lo tanto, la indicación del TCPH con donante no relacionado se presenta como una posibilidad curativa, aunque asociada con una alta morbi-mortalidad.

En el presente trabajo se evaluó el grado de respuesta a las TIS (combinación de GAT y CsA como tratamiento inicial) a los 6 meses en pacientes con AA. Se observó que los polimorfismos del gen *IFNG* e *IL6* contribuyeron al grado de respuesta alcanzada. Los genotipos asociados a mayor producción de *IFNG* (12/12 CA + 12/no-12 CA) se relacionaron principalmente con RP. Mientras que, el genotipo asociado con alta producción de *IL6* (G/G) se relacionó con *refractoriedad*. Además, se observa una asociación entre los pacientes que no respondieron a la TIS y el genotipo relacionado a baja producción de *IFNG* (no-12/no-12 CA) en combinación con el de alta producción de *IL6* (G/G).

En la presente serie, 49 (71%) pacientes recibieron una TIS con un grado de respuesta global del 68% comparable con lo publicado internacionalmente. Un total de 13 (20%) pacientes recibieron un TCPH, 5 de los cuales fueron refractarios al uso de TIS (ver Introducción Tabla 9). Aunque el TCPH con donante relacionado es la indicación de tratamiento de primera línea en pacientes jóvenes, pudimos observar que en nuestro medio el TIS es ampliamente utilizado. Frente a la indicación de un TCPH se debe tener en cuenta que la tipificación HLA y la realización de otros estudios, incluyendo la exclusión del diagnóstico de Anemia de Fanconi (test de sensibilidad al DEB), consumen un tiempo considerable para los pacientes. Luego de la confirmación diagnóstica, el tiempo promedio para lograr un TCPH con donante histo-idéntico es de 3,5 meses, según los datos del Grupo Argentino de Trasplante de Médula Ósea (GATMO).

Además, sólo alrededor del 15-30% de los pacientes disponen de un donante relacionado HLA compatible. La probabilidad de encontrar un donante óptimo no relacionado varía entre los grupos raciales y étnicos, debido a que los genes HLA son altamente polimórficos. Según los datos analizados del *National Marrow Donor*

Program (NMDP), que incluyen a más de 10,5 millones de adultos voluntarios y cerca de 200.000 unidades de cordón umbilical, la probabilidad de encontrar un donante adulto adecuado (8/8 HLA *match*) entre descendiente de hispanos del sur o América central es del 34%. Y, la probabilidad de encontrar una unidad de cordón adecuada (6/6 HLA *match*) es del 5% y 17% para los pacientes mayores y menores de 20 años, respectivamente (Gragert y col., 2014). En nuestro país, la mediana de tiempo para lograr un TCPH no relacionado es de 6,5 meses, según los datos del GATMO. Ambos factores son importantes en el contexto de la gravedad de la enfermedad; por lo tanto, el uso de una TIS puede beneficiar al paciente mientras tanto se confirma el TCPH con un donante relacionado adecuado.

Si bien no se encontraron trabajos que relacionen al SNP -174 G/C del gen *IL6* y la respuesta a las TIS, sólo dos trabajos describen una relación entre la presencia de los polimorfismos en los genes *IFNG* (Lee y col., 2011; Bestach y col., 2015) y *TGFB1* (Lee y col., 2011) o del alelo -308A del gen *TNF* (Demeter y col., 2002) con una mayor tasa de respuesta. Por lo tanto, la caracterización del perfil de polimorfismos de los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*, podría contribuir en la identificación de pacientes candidatos que se beneficiarían con la TIS. Y, por el contrario, acelerar la búsqueda de un donante (relacionado o no) en aquellos casos en los cuales su perfil prediga *refractoriedad* a las TIS.

Con respecto a los SMD, los resultados demuestran una asociación entre el SNP -308 G/A del *TNF* y las características clínicas de los pacientes. La presencia del alelo -308 A se asoció con mayor severidad de la anemia y trombocitopenia al diagnóstico. Además, su hallazgo incrementaría más de tres veces la necesidad de requerir soporte transfusional durante el transcurso de la enfermedad, predeciría una mayor probabilidad de muerte asociada a la presencia de citopenias (sangrados, sepsis y exacerbación de enfermedades cardíacas por agravamiento de la anemia) y una tendencia a mayor supervivencia libre de LMA. Previamente, los genotipos A/A y G/A, asociados a mayor producción de *TNF*, habían sido asociados con neutropenia (Parnes y col., 2010) y con mayor tasa de muerte no relacionada al tratamiento en pacientes con SMD sometidos a un TCPH (Newel y col., 2010), respectivamente.

El TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria que posee un rol pleiotrópico en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes y neoplasias hematológicas, incluyendo los SMD. La secreción de esta citoquina mielosupresora a partir de células de la MO, es estimulada por interacciones parácrinas entre el estroma medular y células mononucleares. Procesos inflamatorios simulados *in vitro* del microambiente medular demuestran que el aumento en los niveles de TNF- α correlaciona con la

apoptosis de las células troncales CD34+ (Navas y col., 2008). Además, esta citoquina suprime la formación de colonias hematopoyéticas, inhibe la eritropoyesis *in vitro* estimulada por EPO o por combinaciones de diversas citoquinas; asimismo, ejerce una regulación negativa sobre la producción endógena de EPO (Musto y col., 1994; Rusten y col., 1995). La sobreproducción de TNF- α ha sido demostrada tanto en el microambiente medular como en el plasma de pacientes con SMD (Mundle y col., 1999; Deeg y col., 2000). Altos niveles séricos de TNF- α han sido inversamente correlacionados con los valores de hemoglobina, la respuesta al tratamiento con EPO y la evolución clínica de los pacientes (Verhoef y col., 1992; Musto y col., 1994; Stasi y col., 1997; Tsimberidou y col., 2008). Otros estudios muestran que el incremento de los niveles de esta citoquina en la MO se correlaciona con la tasa de apoptosis intramedular (Musto y col., 1992), el grado de anemia y el pronóstico de los pacientes con SMD (Stifter y col., 2005).

La falla funcional de la hematopoyesis se encuentra directamente relacionada con la presencia de citopenias refractarias en los SMD. Su asociación con la desregulación en la producción de citoquinas es considerada como uno de los mecanismos de interés para el desarrollo de terapias inmunomoduladoras (Rusten y col., 1995; Maciejewski y col., 2002). El bloqueo del TNF- α en pacientes con SMD disminuye la proporción de células apoptóticas e incrementa la formación de colonias hematopoyéticas y el potencial clonogénico de las células progenitoras megacariocíticas y mieloides (Gersuk y col., 1998; Boula y col., 2006). La neutralización de la actividad de esta citoquina utilizando un receptor recombinante soluble (Etanercept: Enbrel®) o un anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF- α (cA2) muestra grados variables en la mejoría del nivel de citopenias de los pacientes con SMD. Estos resultados reflejarían heterogeneidad en la población bajo tratamiento (Maciejewski y col., 2002; Boula y col., 2006; Rosenfeld y col., 2002; Deeg y col., 2002). El uso de terapias combinadas con Etanercept y GAT o 5-azacitidina en ensayos de fase II mostraron una respuesta global en el 70% de los pacientes (Scott y col., 2010a; 2010b). La detección del SNP -308 G/A del gen *TNF* podría ser útil para futuros ensayos clínicos, particularmente aquellos que bloqueen o modulen la actividad de esta citoquina pro-inflamatoria.

Los pacientes con SMD con genotipo 12/12 CA, asociado a alta producción de *IFNG*, presentaron menores recuentos de neutrófilos, al diagnóstico. IFN- γ , al igual que TNF- α , también ejerce un efecto supresor sobre el proceso hematopoyético, inhibiendo la proliferación y diferenciación de las células progenitoras mieloides y eritroides mediante la inducción de la apoptosis al incrementar la expresión de Fas en la células

CD34+ (Maciejewskiy y col., 1995a; Selleri y col., 1996; Dai y col., 1998; Yang y col., 2005; Joshi y col., 2011). Sin embargo, el efecto inhibitorio de ambas citoquinas sobre la hematopoyesis estaría mediado por diferentes vías. Particularmente, el *IFN regulatory factor-1* (IRF1) estaría involucrado en la activación de genes responsables de los efectos supresores mediados por IFN- γ (Sato y col., 1995) y también en la regulación de la apoptosis. El perfil de transcripción, tanto de células CD34+ como de células provenientes del estroma, cambia luego de la exposición *in vitro* a IFN- γ . Algunos de estos cambios son concordantes entre ambos tipos celulares y otros específicos de las células CD34+ (Zheng y col., 2006). Entre los genes involucrados en una respuesta anti-proliferativa y la regulación de la apoptosis se encuentran STAT1, CASP1 y la Ciclina A1. La sobre-expresión de la Ciclina A1 en ratones transgénicos deriva en una mielopoyesis anormal (Liao y col., 2001). Además, IFN- γ reduce la diferenciación de los neutrófilos inducida por el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), vía SOCS3, al inhibir la fosforilación de STAT3 (de Bruin y col., 2012). El perfil de expresión de células CD34+ provenientes de pacientes con SMD muestra una marcada sobre-expresión de genes inducibles por *IFNG*: *Interferon-Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1* (IFIT1) e *interferon induced transmembrane protein* (IFITM1), quienes juegan un papel en el efecto anti-proliferativo de esta citoquina (Pellagati y col., 2006).

En los pacientes con SMD, el genotipo asociado con mayor expresión de *IL6* (G/G) se asoció con menores niveles de hemoglobina, al diagnóstico. Los pacientes con SMD presentan altos niveles de IL-6 en plasma (Feng y col., 2011), asociado con menor sobrevida y menores tiempos de sobrevida libre de evolución a LMA (Pardani y col., 2012), aunque no predeciría el comportamiento clínico de los pacientes con SMD de alto riesgo o con LMA (Tsimberidou y col., 2008). La liberación de IL-6 está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- α (Stirewalt y col., 2008). Lo cual es coherente con que los pacientes que presentan la combinación de los genotipos asociados a alta producción de ambas citoquinas presenten niveles de hemoglobina más bajos.

Si bien el genotipo G/G en la posición -174 de *IL6* poseería un efecto protector en el desarrollo de los SMD, la presencia del alelo -174G conferiría una mayor sensibilidad a la estimulación con IL-1 o con LPS mostrando un franco incremento en su expresión (Fishman y col., 1998). IL-6 es el mediador más importante del incremento de la hepcidina en el proceso inflamatorio. La hepcidina es un regulador de la homeostasis del hierro, controlando su absorción en el duodeno, su liberación por los macrófagos y, potencialmente, está involucrada en la distribución del hierro en los diferentes órganos.

Aunque los pacientes con SMD de bajo riesgo poseen menores niveles de hepcidina, su desregulación es complicada y heterogénea (Santini y col., 2011). Por un lado, los depósitos de hierro incrementados por el requerimiento transfusional tienden a inhibir la absorción duodenal. Por el otro lado, hay fuerzas opuestas como la eritropoyesis inefectiva, la cual demanda un mayor transporte de hierro a la MO y, por lo tanto *down*-regula la producción de hepcidina. Por lo tanto, la expresión incrementada de IL-6, asociada a la presencia del genotipo G/G podría contribuir en la desregulación de la expresión de hepcidina observada en los pacientes con SMD.

Debido al importante rol de la IL-6 en la anemia por inflamación asociada a los SMD, el siltuximab, un anticuerpo monoclonal quimérico anti-IL-6 ha sido probado en un estudio de fase II en pacientes con bajo riesgo y requerimiento transfusional. Sin embargo, el estudio no prosiguió ya que no pudo demostrarse la eficacia de la droga en disminuir el requerimiento transfusional de los pacientes (García Manero y col., 2014). La detección del SNP -174 G/C de *IL6* podría ser útil para futuros ensayos clínicos.

La combinatoria de los genotipos de *TGFB1* asociados con su mayor expresión se asoció con un menor recuento de plaquetas en los pacientes con SMD. En las células estromales productoras de trombopoyetina (TPO), TGF- β 1 induce fuertemente la expresión del ARNm de esta molécula. La TPO, por su parte, induce la expresión de los receptores 1 y 2 de TGF- β 1 en los megacarioblastos en el estadio intermedio. En éste estadio, TGF- β 1 es capaz de arrestar la maduración de las unidades formadoras de colonias megacariocíticas (CFU-Meg). En los pacientes con Púrpura Trombocitopénica Idiopática se observa que los valores de TGF- β 1 y del ARNm de TPO se encuentran correlativamente incrementados y se observa un arresto en los megacariocitos. Por ende, tanto los resultados *in vitro* como los *in vivo* sugieren a TGF- β 1 como uno de los principales reguladores de la megacariopoyesis (Sakamayi y col., 1999).

Los resultados obtenidos en el análisis de los polimorfismos en los genes *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1* sugieren que la presencia de las variantes polimórficas estaría relacionada con diferentes características clínico-patológicas, tanto en los pacientes con AA como en los SMD. Los polimorfismos en genes de citoquinas inmunoregulatoras podrían actuar como modificadores genéticos de la enfermedad en ambas patologías. Con lo cual, un estado pro-inflamatorio basal cooperaría con defectos intrínsecos de los progenitores hematopoyéticos incrementando la severidad de las citopenias observadas al diagnóstico en estos pacientes. Sin embargo, estas asociaciones parecieran ser dependientes de cada patología en particular.

Si bien tanto la AA y los SMD son SFM adquiridos y que, en ciertos casos, presentan características clínicas y patológicas que se superponen, son enfermedades diferentes. Los cuadros clínicos que presentan los pacientes con AA al diagnóstico son más homogéneos, los cuales solo varían en cuanto a la severidad de las citopenias, y dentro de ellas, lo más relevante es la severidad de la neutropenia (Camitta y col., 1975; Bacigalupo y col., 1988). En cambio, los SMD pueden presentarse al diagnóstico con cuadros clínicos mucho más heterogéneos, cuya variabilidad se observa tanto en los distintos subtipos morfológicos (Bennet y col., 1982; Vardiman y col., 2009) como el comportamiento clínico. La gran heterogeneidad de la patología se refleja en un abanico de posibilidades terapéuticas, y por lo tanto se los estratifica de acuerdo a diferentes sistemas (Greenberg y col., 1997; 2012; 2013).

Además, de acuerdo a los criterios estrictos, la AA no sería una enfermedad clonal, aunque con riesgo de progresión a SMD o HPN, y aquellos pacientes con cariotipos alterados deberían ser clasificados como SMD. Mediante las nuevas técnicas de secuenciación, Kulasekararaj y col., 2014, observaron casi un 20% de los pacientes con AA con mutaciones en genes asociados a neoplasias mieloides y su presencia incrementaría en un 40% el riesgo a progresar a SMD. Sin embargo, el 10% de la serie de pacientes presentaban cariotipo alterado al diagnóstico, ya sea por técnica citogenética convencional o por FISH, reflejando la disparidad en los criterios de selección de los pacientes estudiados, aún en la actualidad (Kulasekararaj y col., 2014).

2. Análisis de los niveles de expresión génica en AA

2.1. Expresión génica de las citoquinas *TNF*, *IL6*, *IFNG* y *TGFB1*

Los resultados del análisis de expresión génica en pacientes con AA mostraron un incremento de *TNF*, *IL6*, disminución de *TGFB1*; mientras que no se observaron diferencias en los niveles del gen *IFNG* al compararlos con los valores obtenidos de la población control.

Una de las principales vías involucradas en la patogénesis de la AA es la respuesta inmune celular Th1. Estas células producen altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente IFN- γ y TNF- α , las cuales son inhibidores potentes de la hematopoyesis. Estas citoquinas pueden inducir la expresión del receptor Fas y/o activar sus receptores específicos en las células hematopoyéticas *targets* impulsando vías intracelulares inhibitorias del ciclo celular (Maciejewski y col., 1995a; Selleri y col., 1996; Nagata, 1997). La sobre-expresión de estas citoquinas en pacientes con AA ha

sido demostrada en diversos estudios, tanto a nivel de expresión proteica como génica (Dufour y col., 2001; Sloand y col., 2002a; Dubey y col., 2005). Además, las células mononucleares de estos pacientes exhiben hipersensibilidad a la estimulación con fitohemaglutinina mostrando niveles incrementados para ambas citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos (Hsu y col., 1996). Si bien la mayoría de los trabajos observan altos niveles de estas citoquinas a nivel de la MO, un estudio realizado por Schultz y Shahidi, 1994, en muestras de SP indicaría sobre-expresión de TNF- α pero no de IFN- γ en los pacientes con AA, coincidiendo con nuestros resultados. Sin embargo, Feng y col., 2011, no observaron incremento en ninguna de las dos al analizar un panel de 31 citoquinas.

Como resultado de los estudios de expresión de *IL6*, se observaron niveles génicos aumentados en los pacientes con AA respecto al grupo control, sólo al excluir del análisis a los pacientes que se encontraban bajo TIS.

La IL-6 es una citoquina con una amplia variedad de funciones biológicas, dentro de las cuales puede estimular la hematopoyesis (Rodríguez y col., 2004), además de ser un componente muy importante en el proceso inflamatorio. La sobre-expresión de esta citoquina ha sido descrita en varios SFM (Gidvani y col., 2007; Feng y col., 2011; Pardani y col., 2012) y el significado de este incremento en la patogénesis de la AA aún no está claramente definido. Un aumento en los niveles de IL-6 podría representar sólo una respuesta reactiva o implicar una contribución al desarrollo de la enfermedad. La capacidad de las células estromales para producir factores de crecimiento hematopoyéticos es normal o elevada en la mayoría de los pacientes con AA, incluyendo: la IL-6, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor *stem cells* (SCF) (Kojima, 1998). Un estudio realizado en un modelo murino, en el cual se induce la AA mediante irradiación y quimioterapéuticos, sugiere que el nivel de secreción de IL-6 se incrementa a medida que se profundiza el cuadro. Este nivel anormal de IL-6 probablemente podría interferir con la estabilidad del microambiente hematopoyético en la MO (Chen y col., 2013).

Por otro lado, la IL-6 participa en la respuesta inmune celular Th17, y se ha descrito que la IL-17 induce la producción *in vitro* de IL-6, IL-8 y TNF- α por los macrófagos de pacientes con AA (Gu y col., 2008). Además, la producción de IL-6, entre otras citoquinas pro-inflamatorias, se incrementa en respuesta a TNF- α e IL-1. Con lo cual, en muchos casos, se cree que el aumento en los niveles de IL-6 es secundario a otros mediadores inflamatorios. El efecto de la TIS sobre los niveles de IL-6 en los pacientes con AA aún no ha sido descrito. Con respecto a otras enfermedades que involucran

un desorden inflamatorio, algunos trabajos relacionan el tratamiento con CsA y una reducción efectiva en la persistencia de citoquinas inflamatorias, incluyendo a la IL-6 (Hamada y col., 2012); mientras que otros autores no describen esta asociación (Djalilian y col., 2006). La CsA es un inhibidor de la calcineurina, la cual media la activación de los linfocitos; sin embargo, su mecanismo inmunosupresor no está claramente caracterizado. El agregado de CsA a cultivos de células periféricas mononucleadas estimuladas con diferentes ligandos específicos para los receptores *Toll like* (TLRs) disminuye la expresión de citoquinas, incluida IL6 (Howell y col., 2013).

TGF- β 1 se ha descrito como un importante regulador negativo de la hematopoyesis, siendo su inhibición más pronunciada en las células hematopoyéticas primitivas (Dybedal y Jacobsen, 1995; Polyak, 1996; Cheng y col., 2001). Sin embargo, esta citoquina también puede tener funciones estimulantes sobre este proceso. Estas diferencias dependen del estado de diferenciación de la célula diana y de la presencia de otras citoquinas que interactúan con ella. Un efecto biológico importante de TGF- β 1 sobre el crecimiento de las células hematopoyéticas es la capacidad de inducir un estado quiescente, o G0, reversible (Keller y col., 1992), dependiendo del contexto de otras citoquinas como el factor inhibidor de macrófagos 1 α (MIP1 α), entre otros (Graham y col., 1990; Keller y col., 1992).

Por otro lado, TGF- β 1 es una citoquina importante para el mantenimiento del programa funcional de la respuesta Treg. Dependiendo del entorno de citoquinas, TGF- β 1 puede promover la diferenciación de células iTreg a nivel periférico (Oh y Li, 2013) y también es importante para la función de las nTreg que emigran del timo (Marie y col., 2005).

Son escasos los trabajos que evalúen la contribución de TGF- β 1 en la patogénesis de la AA. Rizzo y col., describieron una reducción significativa en los niveles de TGF- β 1 en el suero de los pacientes con AA y, además, encontraron una correlación entre la respuesta al tratamiento y el aumento de sus niveles séricos (Rizzo y col., 1999), coherente con los resultados obtenidos en la presente serie.

Por lo tanto, la disminución encontrada de los niveles génicos de *TGFB1* en los pacientes con AA podría afectar tanto al proceso hematopoyético como al *subset* de linfocitos Treg.

Los resultados de la cuantificación génica indican un incremento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias *TNF* e *IL6*, una disminución de *TGFB1*. Aunque no se determinó la contribución de los polimorfismos a los niveles de expresión génica, los genotipos asociados con los niveles de expresión descritos mostraron asociación con características clínico-patológicas más severas.

2.2. Expresión génica de los factores de transcripción *TBET*, *GATA3*, *ROR γ t* y *FOXP3*

Las células T CD4⁺ pueden subdividirse, desde el punto de vista funcional en dos subgrupos principales: células efectoras, que proporcionan protección contra agentes patógenos ofensivos, y células Treg, cuyas funciones involucran evitar reacciones autoinmunes y detener la respuesta efectora desencadenada frente a patógenos. Las células T CD4⁺ efectoras, a su vez, se clasifican en diferentes linajes Th, dependiendo de sus funciones inmunológicas, que involucran principalmente la expresión de factores de transcripción, distintos perfiles de citoquinas y receptores de expresión de *homing* (Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Cosmi y col., 2013). Los factores de transcripción específicos de linaje, sustentan tanto la divergencia como la estabilización del fenotipo de las células T CD4⁺, actuando sobre la expresión o represión de grandes conjuntos de genes, lo que determina el programa funcional de la célula T diferenciada. La especificación de los linajes Th1, Th2, Th17 y Treg requiere de los factores de transcripción “reguladores maestros” T-bet, GATA-3, ROR γ t y Foxp3, respectivamente (Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Basu y col., 2013; Cosmi y col., 2013). La anormal expresión de estos factores de transcripción contribuye al desbalance y la alteración de los diferentes linajes de células T CD4⁺. Una desregulación tanto de las diferentes respuestas efectoras como de la respuesta reguladora ha sido implicada en la patogénesis de diversas enfermedades que involucran trastornos autoinmunes e inflamatorios.

Como resultado de los estudios de expresión, los genes *TBET* y *GATA3*, los cuales codifican los factores de transcripción “reguladores maestros” de los linajes Th1 y Th2, respectivamente, no mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión entre la población de AA y los controles. Mientras que, el gen *ROR γ t*, factor de transcripción responsable de la diferenciación del linaje Th17, mostró una disminución significativa en sus niveles de expresión en la población de AA respecto al grupo control. Asimismo, los pacientes con AA también presentaron niveles de expresión génica significativamente disminuidos de *FOXP3*, el factor de transcripción crítico en la diferenciación de las células Treg, respecto al grupo control. Tanto la disminución observada para el gen *ROR γ t* como *FOXP3* fue importante en el grupo de pacientes bajo TIS.

La relación del nivel de expresión génica entre los factores de transcripción *TBET*, *GATA3* y *ROR γ t*, permite describir el balance entre las diferentes respuestas efectoras (Th1, Th2 y Th17, respectivamente). Si bien la relación *TBET/GATA3* no mostró

diferencias al comparar la población de AA y el grupo control, las relaciones *TBET/RORγt* y *GATA3/RORγt* mostraron un aumento significativo en la población de AA.

Por otro lado, la descripción del balance entre cada respuesta efectora (Th1, Th2 y Th17) y la respuesta reguladora (Treg) puede evaluarse mediante las relaciones de los niveles de expresión entre cada factor de transcripción (*TBET*, *GATA3* y *RORγt*, respectivamente) y *FOXP3*. Este análisis mostró que la población de AA presentó relaciones *TBET/FOXP3* y *GATA3/FOXP3* aumentadas con respecto a los controles; mientras que, la relación *RORγt/FOXP3* no presentó diferencias.

Si bien son escasos los trabajos que evalúen una posible desregulación entre los diferentes linajes de linfocitos Th en AA, la mayoría describen una polarización de la respuesta inmune hacia Th1 frente a Th2, evaluada mediante la relación de las citoquinas producidas IFN-γ/IL-4 (Tsuda y Yamasaki, 2000; Giannakoulas y col., 2004; Li y col., 2010; Chen H y col., 2014). Sin embargo, también se ha documentado un aumento significativo del *subset* celular Th2 (en adición a Th1) en los pacientes con AA, observando una correlación entre esta expansión de linfocitos Th2 y la severidad de la enfermedad (Kordasti y col., 2012).

También ha sido sugerido una participación de la respuesta Th17 al observarse un aumento en la proporción de linfocitos Th17 acompañado de un incremento en los niveles de expresión de *RORγt*, en los pacientes con AA al diagnóstico (de Latour y col., 2010; Du y col., 2013). Kordasti y col., 2012, restringen este hallazgo sólo a los casos de AA severa. De Latour y col., proponen que las poblaciones de células Th17 favorecerían el reclutamiento de células Th1 y un entorno de citoquinas pro-inflamatorias en la MO durante las primeras etapas de la insuficiencia medular. Sin embargo, el papel potencial de Th17 en la fisiopatología de la AA permanece en discusión.

Si bien los niveles génicos de *TBET* y *GATA3* no mostraron un aumento en la población de AA, el incremento en las relaciones *TBET/RORγt* y *GATA3/RORγt*, por defecto de la expresión de *RORγt*, podría indicar una prevalencia de las respuestas efectoras Th1 y Th2 sobre la respuesta Th17. El resultado obtenido para el gen *TBET* es concordante con la evaluación de *IFNG*, dado que tampoco mostró diferencias significativas en su nivel de expresión génica. Además, debido a que no se observó un aumento de la respuesta efectora Th17, el incremento de *IL6* observado en AA podría estar relacionado principalmente con una respuesta reactiva y/o en respuesta a la presencia de otros mediadores inflamatorios.

La alteración en el *subset* de linfocitos Treg también ha sido sugerida como un posible mecanismo que contribuye al desorden autoinmune en AA, que finalmente, conduciría a la falla medular. Los mecanismos de regulación de los linfocitos Treg pueden incluir alteraciones a nivel de tres categorías: la insuficiencia en el número de las células Treg, defectos en la función de estas células y/o la resistencia de las células T efectoras a la supresión mediada por las células Treg. Los estudios realizados evidencian una disminución en el número de las células Treg, tanto en muestras de SP como de MO de los pacientes (Solomou y col., 2007; de Latour y col., 2010; Kordasti y col., 2012; Shi y col., 2012). Además, también se observa una disminución en la capacidad del potencial migratorio de los linfocitos Treg de SP, lo cual podría contribuir con un deterioro en su función inmunosupresora a nivel de la MO en los pacientes con AA (Shi y col., 2012). Por lo tanto, los trabajos realizados en AA muestran que la desregulación en la inmunosupresión mediada por los linfocitos Treg sería intrínseca de estas células más que a la resistencia de las células T efectoras a la supresión.

La disminución de los niveles génicos de *FOXP3* en los pacientes con AA reflejaría anomalías en el desarrollo y/o función del *subset* de linfocitos Treg. Además, el aumento en las relaciones *TBET/FOXP3* y *GATA3/FOXP3*, por defecto en la expresión de *FOXP3*, indicaría una prevalencia de las respuestas efectoras (Th1 y Th2) con respecto a la respuesta regulatoria ejercida por los Treg en AA. La disminución observada para el gen *FOXP3* fue más evidente en el grupo de pacientes bajo TIS. Este resultado es consistente con el trabajo de Kordasti y col., quienes encontraron una disminución en el número de células Treg en pacientes tratados con TIS respecto a los pacientes pre-tratamiento (Kordasti y col., 2012). Aunque el mecanismo de acción de las TIS sobre los Treg aún no ha sido estudiado, ambos resultados podrían indicar un efecto de estas terapias sobre este *subset* de linfocitos.

Además, los niveles de expresión génica de *GATA3* y *FOXP3* mostraron una asociación positiva, tanto en los pacientes y como en el grupo control. Esta observación apoyaría la hipótesis que postula al factor de transcripción GATA-3 como esencial para la función de las células Treg (Wang y col., 2011).

La disminución en los niveles génicos de *TGFB1* observada en los pacientes, podría estar relacionadas con la disminución tanto de *FOXP3* como de *ROR γ t*, ya que el desarrollo de ambos linajes (iTreg y Th17) requieren de la señalización vía TGF- β 1 para inducir su diferenciación. Además, TGF- β 1 es fundamental para el mantenimiento del programa funcional del *subset* de Treg en general, con lo cual su disminución podría contribuir a una desregulación de estas células. Debido a que los linfocitos Treg ejercen funciones inmunosupresoras que contrarrestan las respuestas efectoras, su

desregulación podría favorecer al componente autoinmune evidenciado en la fisiopatología de la AA.

Una cuestión importante a tener en cuenta es que, en los últimos años, diversos trabajos evidenciaron una considerable plasticidad de las células T CD4+ que permite la conversión a otros fenotipos. Aunque las células Th1 y Th2 son las que muestran fenotipos más estables, las células Th17 e iTreg pueden cambiar fácilmente a otros programas de células Th bajo ciertas condiciones de citoquinas (Zhou y col., 2009; O'Shea y Paul, 2010; Basu y col., 2013; Cosmi y col., 2013; Geginat y col., 2014). Los linfocitos Th17 que se desplazan hacia un fenotipo Th1 o Th2 en condiciones inflamatorias, adquiriendo la capacidad de producir IFN- γ o IL-4, parecen ser particularmente los más agresivos y patogénicos (Nistala y col., 2010; Cosmi y col., 2011; Zielinski y col., 2012; Cosmi y col., 2013). Si bien no está completamente claro cómo se produce tal desplazamiento entre los fenotipos y cuál es su importancia en el curso de las respuestas fisiológicas a los agentes patógenos, esta plasticidad parece tener implicancias importantes en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes.

Los resultados obtenidos en este trabajo, al evaluar la relación de los diferentes factores de transcripción, podrían vincularse con una deficiencia en la diferenciación y/o función de los linfocitos Treg favoreciendo las respuestas efectoras mediadas por Th1 y Th2. Los niveles disminuidos de *TGFB1* también podrían asociarse con la disfuncionalidad de las células Treg, contribuyendo a un estado pro-inflamatorio con altos niveles de *TNF* e *IL6*.

La caracterización molecular detallada de las vías que podrían estar involucradas en desarrollo de la AA apunta tanto a la comprensión del mecanismo fisio-patogénico como también al desarrollo de posibles estrategias para la intervención terapéutica de la enfermedad.

Conclusiones

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos y discutidos se desglosan las siguientes conclusiones:

1. Estudio de polimorfismos en genes de citoquinas

1.1. Descripción de las frecuencias alélicas y genotípicas en AA y SMD, su relación con susceptibilidad

- Los polimorfismos estudiados no estarían relacionados con susceptibilidad a AA en nuestra población. Sin embargo, el alelo -308A, asociado a mayor producción del gen *TNF*, podría predisponer a los pacientes con AA a un cuadro más severo al diagnóstico.
- En la población con SMD la sobre-representación del alelo -308A, asociado a mayor producción del gen *TNF*, y del alelo -174C, asociado a menor producción del gen *IL6*, indicarían una relación entre la presencia de estas variantes y susceptibilidad a la enfermedad.
- Al comparar ambas patologías, las variantes alélicas estudiadas difieren en cuanto a su frecuencia de aparición.

1.2. Asociación con características clínico-patológicas

La presencia de los polimorfismos estudiados se asoció con diferentes características clínico-patológicas tanto en los pacientes con AA como en los SMD; sin embargo, estas asociaciones parecieran ser propias de cada patología.

En AA:

- Los polimorfismos en los genes *TNF* y *TGFB1* contribuyen al grado de neutropenia y los de *IFNG* y *TGFB1* al grado de anemia, al diagnóstico.
- Los polimorfismos en los genes *IFNG* e *IL6* afectarían al grado de respuesta a la TIS, evaluada a los 6 meses de iniciado el tratamiento.

En SMD:

- Los polimorfismos en los genes *TNF* e *IL6* contribuyen al grado de anemia, en *TNF* y *TGFB1* con los recuentos plaquetarios, y en *IFNG* al grado de neutropenia, al diagnóstico.

- La variante de alta expresión del gen *TNF*, asociada con la severidad de las citopenias, contribuiría con la necesidad de requerir transfusiones y con el incremento en las causas de muerte no relacionadas a la progresión leucémica.
- El genotipo +915 G/G relacionado a mayor expresión de *TGFB1* se asoció con mayor sobrevida global. Estos pacientes presentaron mayores recuentos de plaquetas y una tendencia a menor porcentaje de blastos en MO.

2. Estudios de expresión génica en AA

- El perfil de expresión génica mostró un aumento de *TNF* e *IL6* y una disminución de *TGFB1*, favoreciendo un estado pro-inflamatorio en estos pacientes. Aunque no se determinó la contribución de los polimorfismos a los niveles de expresión génica, los genotipos relacionados con el perfil de expresión mencionado se asociaron con características clínico-patológicas más severas.
- Las relaciones *TBET/RORyt* y *GATA3/RORyt* incrementadas, por defecto de la expresión de *RORyt*, podrían indicar una prevalencia de las respuestas efectoras Th1 y Th2 sobre la respuesta Th17.
- El aumento de las relaciones *TBET/FOXP3* y *GATA3/FOXP3*, por defecto de la expresión de *FOXP3*, indicaría una disminución en la respuesta reguladora (Treg) en favor de las respuestas efectoras (Th1 y Th2). La menor expresión génica de *TGFB1* también podría estar relacionada con una deficiencia de las células Treg.

Conclusión general

Los polimorfismos en los genes de citoquinas estudiados podrían actuar como modificadores genéticos de la enfermedad tanto en AA como en SMD, profundizando la severidad de las citopenias observadas al diagnóstico en estos pacientes. Además, un estado pro-inflamatorio con una deficiencia en la diferenciación y/o función de los linfocitos Treg cooperaría con la susceptibilidad y/o defectos intrínsecos de los progenitores hematopoyéticos en el desarrollo de los SFM.

Bibliografía

Bibliografía

- Afable MG, Tiu RV, Maciejewski JP. Clonal evolution in aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;90-95.
- Aladzcity I, Kovács M, Semsei A, Falus A, Szilágyi A, Karádi I, Varga G, Füst G, Várkonyi J. Comparative analysis of IL6 promoter and receptor polymorphisms in myelodysplasia and multiple myeloma. *Leuk Res* 2009; 33:1570-1573.
- Alter B. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;29-39.
- Ashton-Rickardt PG. The granule pathway of programmed cell death. *Crit Rev Immunol* 2005; 25:161-182.
- Auerbach AD, Adler B, Chaganti RS. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. *Pediatrics* 1981; 67:128-35.
- Aul C, Bowen D, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998; 83:71-86.
- Bacigalupo A, Hows JM, Gluckman E, Nissen C, Marsh J, Van Lint MT, Congiu M, De Planque MM, Ernst P, McCann S. Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): a report of the EBMT SAA Working Party. *Br J Haematol* 1988; 70:177-182.
- Bacigalupo A, Bruno B, Saracco P, Di Bona E, Locasciulli A, Locatelli F, Gabbas A, Dufour C, Arcese W, Testi G, Brocchia G, Carotenuto M, Coser P, Barbui T, Leoni P, Ferster A. Antilymphocyte globulin, cyclosporine, prednisolone, and granulocyte colony-stimulating factor for severe aplastic anemia: an update of the GITMO/EBMT study on 100 patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party on Severe Aplastic Anemia and the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2000; 95:1931-1934.
- Bagby GC, Lipton JM, Sloand EM, Schiffer CA. Marrow Failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004;318-336.
- Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* 1998; 91:3582-3592.
- Ballen KK, Koreth J, Chen YB, Dey BR, Spitzer TR. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood* 2012; 119:1972-1980.
- Balog A, Borbényi Z, Gyulai Z, Molnár L, Mándi Y. Clinical importance of transforming growth factor-beta but not of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in patients with the myelodysplastic syndrome belonging to the refractory anemia subtype. *Pathobiology* 2005; 72:165-170.
- Basu R, Hatton RD, Weaver CT. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunol Rev* 2013; 252:89-103.
- Belli C, Acevedo S, Bengio R, Arrossagaray G, Watman N, Rossi N, Flores G, Goldztein S, Larripa I. Detection of Risk Groups in Myelodysplastic Syndrome. A multicenter study. *Haematologica* 2002; 87:9-16.
- Belli C, Bengió R, Negri Aranguren P, Sakamoto F, Flores MG, Watman N, Nucifora E, Prates MV, Arbelbide J, Larripa I. Partial and total monosomal karyotypes in Myelodysplastic Syndromes: comparative prognostic relevance among 421 patients. *Am J Hematology* 2011b; 86: 540-545.

- Belli C, Bestach J, Kornblitt L; Larripa I. Prognostic impact of cytogenetic findings in Myelodysplastic Syndromes. *Oncol Hematol Rev (formerly US Oncology & Hematology)* 2013; 9:60–7.
- Belli CB, Bestach Y, Giunta M, Iastrebner M, Santos I, Pintos N, Arbelbide J, Basquiera AL, Bengió R, Larripa I. Application of the revised International Prognostic Scoring System for myelodysplastic syndromes in Argentinean patients. *Ann Hematol* 2014; 93:705-707.
- Bestach Y, Belli CB, Sieza Y, Gelemur M, Giunta M, Flores MG, Watman N, Bengió R, Larripa I. The presence of -308A TNF α is associated with anemia and thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis* 2011; 47:255-258.
- Bestach Y, Flores MG, Sakamoto F, Bengió R, Larripa I, Belli CB. The presence of -308A TNF allele is associated with clinical parameters of Myelodysplastic Syndromes. Ed. Escarra A. En: *Tumor Necrosis Factor: Structure, Enzyme Regulation and Role in Health and Disease*. Nova Biomedical Books 2013; pp 75-92.
- Bestach Y, Sieza Y, Attie M, Riccheri C, Verri V, Bolesina M, Bengió R, Larripa I, Belli C. Polymorphisms in TNF and IFNG are associated with clinical characteristics of aplastic anemia in Argentinean population. *Leuk Lymphoma* 2015; 21:1-6.
- Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Galton D, Gralnick H, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic Syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51:189-199.
- Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British cooperative group. *Ann Intern Med* 1985; 103:626-629.
- Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 104-110.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441:235-238.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; 8:345-350.
- Bobillo MC, Zimmermann B, Sala A, Huber G, Röck A, Bandelt HJ, Corach D, Parson W. Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *Int J Legal Med* 2010;124:263-268.
- Böttiger LE, Westerholm B. Aplastic anaemia: I. Incidence and aetiology. *Acta Med Scand* 1972; 192:315-318.
- Boula A, Voulgarelis M, Giannouli S, Katrinakis G, Psyllaki M, Pontikoglou C, Markidou F, Eliopoulos GD, Papadaki HA.. Effect of cA2 Anti-Tumor Necrosis Factor-A Antibody Therapy on Hematopoiesis of Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3099-3108.
- Broxmeyer HE, Starnes T, Ramsey H, Cooper S, Dahl R, Williamson E, Hromas R. The IL-17 cytokine family members are inhibitors of human hematopoietic progenitor proliferation. *Blood* 2006; 108:770.
- Calado RT, Graf SA, Wilkerson KL, Kajigaya S, Ancliff PJ, Dror Y, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. Mutations in the SBDS gene in acquired aplastic anemia. *Blood* 2007; 110:1141-1146.

- Callera F, Falcão RP. Increased apoptotic cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1997; 98:18-20.
- Camitta BM, Rapoport JM, Parkman R, Nathan DG. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood* 1975; 45:355-363.
- Cartwright RA, McKinney PA, Williams L, Miller JG, Evans DI, Bentley DP, Bhavnani M. Aplastic anaemia incidence in parts of the United Kingdom in 1985. *Leuk Res* 1988; 12:459-463.
- Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98:1594-1600.
- Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic Syndromes- Coping with Ineffective Hematopoiesis. *N Engl J Med* 2005; 352:536-8.
- Chamuleau M, Westers TM, van Dreunen L, Groenland J, Zevenbergen A, Eeltink CM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2009; 94:496-506.
- Chauffard M. Un cas d'anémie pernicieuse aplastique. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1904; 21:313-315.
- Chen G, Zeng W, Miyazato A, Billings E, Maciejewski JP, Kajigaya S, Sloand EM, Young NS. Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood* 2004; 104:4210-4218.
- Chen H, Luo Z, Shen H, Ren C, Li Z, Tang J, Wang J, Wu T. Research on the roles of transcription factors T-bet and GATA-3 in aplastic anemia. *Clin Lab* 2014; 60:291-295.
- Cheng T, Shen H, Rodrigues N, Stier S, Scadden DT. Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1). *Blood* 2001; 98:3643-3649.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198:1875-1886.
- Chen YF, Wu ZM, Xie C, Bai S, Zhao LD. Expression level of IL-6 secreted by bone marrow stromal cells in mice with aplastic anemia. *ISRN Hematol* 2013; 2013:986219.
- Choudhry VP, Gupta S, Gupta M, Kashyap R, Saxena R. Pregnancy associated aplastic anemia--a series of 10 cases with review of literature. *Hematology* 2002; 7:233-238.
- Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: New players in asthma pathogenesis. *Allergy* 2011;66:989-998.
- Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A* 2014; 85(1):36-42.
- D'Alfonso S, Rampi M, Bocchio D, Colombo G, Scorza-Smeraldi R, Momigliano-Richiardi P. Systemic lupus erythematosus candidate genes in the Italian population: evidence for a significant association with interleukin-10. *Arthritis Rheum* 2000; 43:120-128.

- Dai CH1, Price JO, Brunner T, Krantz SB. Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon gamma to produce erythroid cell apoptosis. *Blood* 1998; 91:1235-1242.
- Davies SM, Walker DJ. Aplastic anaemia in the Northern Region 1971-1978 and follow-up of long term survivors. *Clin Lab Haematol* 1986; 8:307-313.
- de Bruin AM, Libregts SF, Valkhof M, Boon L, Touw IP, Nolte MA. IFN γ induces monoopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood* 2012; 119:1543-1554.
- de Latour RP, Visconte V, Takaku T, Wu C, Erie AJ, Sarcon AK, Desierto MJ, Scheinberg P, Keyvanfar K, Nunez O, Chen J, Young NS. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood* 2010; 116:4175-4184.
- de Masson A, Bouaziz JD, Peffault de Latour R, Benhamou Y, Moluçon-Chabrot C, Bay JO, Laquerrière A, Picquenot JM, Michonneau D, Leguy-Seguín V, Rybojad M, Bonnotte B, Jardin F, Lévesque H, Bagot M, Socié G. Severe aplastic anemia associated with eosinophilic fasciitis: report of 4 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2013; 92:69-81.
- Deeg H, Beckham C, Loken MR, Bryant E, Lesnikova M, Shulman HM, Gooley T. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2000; 37:405-14.
- Deeg HJ, Gotlib J, Beckham C, Dugan K, Holmberg L, Schubert M, Appelbaum F, Greenberg P.. Soluble TNF receptor fusion protein (etanercept) for the treatment of myelodysplastic syndrome: A pilot study. *Leukemia* 2002; 16:162-164.
- Demeter J, Messer G, Schrezenmeier H. Clinical relevance of the TNF-alpha promoter/enhancer polymorphism in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2002; 81:566-569.
- DeZern AE, Dorr D, Brodsky RA. Predictors of hemoglobin response to eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Haematol* 2013; 90:16-24.
- Djalilian AR, Nagineni CN, Mahesh SP, Smith JA, Nussenblatt RB, Hooks JJ. Inhibition of inflammatory cytokine production in human corneal cells by dexamethasone, but not cyclosporin. *Cornea* 2006; 25:709-714.
- Dokal I, Vulliamy T. Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 2010; 95:1236-1240.
- Du HZ, Wang Q, Ji J, Shen BM, Wei SC, Liu LJ, Ding J, Ma DX, Wang W, Peng J, Hou M. Expression of IL-27, Th1 and Th17 in patients with aplastic anemia. *J Clin Immunol* 2013; 33:436-445.
- Dubey S, Shukla P, Nityanand S. Expression of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in bone marrow T cells and their levels in bone marrow plasma in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2005; 84:572-577.
- Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Battilana N, Pistoia V. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001; 115:1023-1031.
- Dufour C, Capasso M, Svahn J, Marrone A, Haupt R, Bacigalupo A, Giordani L, Longoni D, Pillon M, Pistorio A, Di Michele P, Iori AP, Pongiglione C, Lanciotti M, Iolascon A. Homozygosity for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br J Haematol* 2004; 126:682-685.

- Dufour C, Svahn J, Bacigalupo A, Longoni D, Varotto S, Iori AP, Bagnasco F, Locasciulli A, Menna G, Ramenghi U, Lanciotti M; Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica; Dipartimento di Ematologia, Ospedale San Martino, Genova, Italy. Genetic polymorphisms of CYP3A4, GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NQO1 and the risk of acquired idiopathic aplastic anemia in Caucasian patients. *Haematologica* 2005; 90:1027-1031.
- Durães C, Moreira CS, Alvelos I, Mendes A, Santos LR, Machado JC, Melo M, Esteves C, Neves C, Sobrinho-Simões M, Soares P. Polymorphisms in the TNFA and IL6 genes represent risk factors for autoimmune thyroid disease. *PLoS One* 2014; 9:e105492.
- Dybedal I, Jacobsen SE. Transforming growth factor beta (TGF-beta), a potent inhibitor of erythropoiesis: neutralizing TGF-beta antibodies show erythropoietin as a potent stimulator of murine burst-forming unit erythroid colony formation in the absence of a burst-promoting activity. *Blood* 1995; 86:949-957.
- Ehrlich P. Ueber einen Fall von Anämie mit Bemerkungen über regenerative Veränderungen des Knochenmarks. *Charité-Ann* 1888; 13:300-309.
- El Mahgoub IR, Afify RA, Botros SK, Fawzy R. Immunoregulatory cytokines gene polymorphisms in Egyptian patients affected with acquired aplastic anemia. *Ann Hematol* 2014; 93:923-929.
- Enrico A, Flores MG, Kornblihtt L, Nucifora E, Bestach Y, Larripa IB, Belli CB. Anemia in Myelodysplastic Syndromes. (Ed) Hallman A, en *Anemia: Prevalence, Risk Factors and Management Strategies*. Nova Biomedical Books. pp65-98, 2014.
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004; 172:5149-5153.
- Feng X, Scheinberg P, Wu CO, Samsel L, Nunez O, Prince C, Ganetzky RD, McCoy JP Jr, Maciejewski JP, Young NS. Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2011; 96:602-606.
- Fermo E, Bianchi P, Barcellini W, Pedotti P, Boschetti C, Alfinito F, Cortelezzi A, Zanella A. Immunoregulatory cytokine polymorphisms in Italian patients affected by paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and aplastic anaemia. *Eur J Immunogenet* 2004; 31:267-269.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369-1376.
- Fliedner TM, Nothdurft W, Calvo W. The development of radiation late effects to the bone marrow after single and chronic exposure. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986; 49:35-46.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22:329-341.
- Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant* 2004; 4:1614-1627.
- Fukutani T, Hiromatsu Y, Kaku H, Miyake I, Mukai T, Imamura Y, Kohno S, Takane N, Shoji S, Otabe S, Yamada K. A polymorphism of interferon-gamma gene associated with changes of anti-thyrotropin receptor antibodies induced by

- antithyroid drug treatment for Graves' disease in Japanese patients. *Thyroid* 2004; 14:93-97.
- Garcia-Manero G, Gartenberg G, Steensma DP, Schipperus MR, Breems DA, de Paz R, Valcárcel D, Kranenburg B, Reddy M, Komrokji RS. A phase 2, randomized, double-blind, multicenter study comparing siltuximab plus best supportive care (BSC) with placebo plus BSC in anemic patients with International Prognostic Scoring System low- or intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol* 2014; 89:E156-162.
- Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, De Simone M, Pagani M1, Abrignani S. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol* 2014; 5:630.
- Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrand A, Troutt AB, Ledbetter JA, Deeg HJ. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1998; 103:176-188.
- Giannakoulas NC, Karakantza M, Theodorou GL, Pagoni M, Galanopoulos A, Kakagianni T, Kouraklis-Symeonidis A, Matsouka P, Maniatis A, Zoumbos NC. Clinical relevance of balance between type 1 and type 2 immune responses of lymphocyte subpopulations in aplastic anaemia patients. *Br J Haematol* 2004; 124:97-105.
- Gidvani V, Ramkissoon S, Sloand EM, Young NS. Cytokine gene polymorphisms in acquired bone marrow failure. *Am J Hematol* 2007; 82:721-724.
- Girnita DM, Burckart G, Zeevi A. Effect of cytokine and pharmacogenomic genetic polymorphisms in transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:614-625.
- Gonzalez MS, De Brasi CD, Bianchini M, Gargallo P, Moiraghi B, Bengió R, Larripa IB. BAX/BCL-XL gene expression ratio inversely correlates with disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 45:192-196.
- Gordon Smith EC. Aplastic anaemia-aetiology and clinical features. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2:1-18.
- Gowans D, O'Sullivan A, Rollinson S; Roddam P, Groves M, Fegan C, Morgan G, Bowen D. Allele and haplotype frequency at human leucocyte antigen class I/II and immunomodulatory cytokine loci in patients with myelodysplasia and acute myeloid leukaemia: in search of an autoimmune aetiology. *Br J Haematol* 2002; 117:541-545.
- Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, Hartzman R, Rizzo JD, Horowitz M, Confer D, Maiers M. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med* 2014; 371:339-348.
- Graham GJ, Wright EG, Hewick R, Wolpe SD, Wilkie NM, Donaldson D, Lorimore S, Pragnell IB. Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 1990; 344:442-444.
- Grant SF, Steinlicht S, Nentwich U, Kern R, Burwinkel B, Tolle R. SNP genotyping on a genome-wide amplified DOP-PCR template. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e125.
- Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and-yet-unanswered questions. *Autoimmun Rev* 2015; 14:105-116.
- Greenacre MJ. *Theory and Applications of Correspondence Analysis*. Academic Press, London, 1984
- Greenberg P, Cox C, LeBeau M, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennet J.

- International Scoring System for evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 1997; 89:2079-88. (erratum, *Blood* 1998; 91:1100)
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120:2454-2465.
- Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, Borate U, De Castro CM, Deeg HJ, Frankfurt O, Gaensler K, Garcia-Manero G, Gore SD, Head D, Komrokji R, Maness LJ, Millenson M, O'Donnell MR, Shami PJ, Stein BL, Stone RM, Thompson JE, Westervelt P, Wheeler B, Shad DA, Naganuma M. Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11:838-874.
- Gu Y, Hu X, Liu C, Qv X, Xu C. Interleukin (IL)-17 promotes macrophages to produce IL-8, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha in aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2008; 142:109-114.
- Gulbis B, Eleftheriou A, Angastiniotis M, Ball S, Surrallés J, Castella M, Heimpel H, Hill A, Corrons JL. Epidemiology of rare anaemias in Europe. *Adv Exp Med Biol* 2010; 686: 375-396.
- Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis A, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller T, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110:4385-4395.
- Hamada H, Suzuki H, Abe J, Suzuki Y, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Honda T, Onouchi Y, Terai M, Hata A. Inflammatory cytokine profiles during Cyclosporin treatment for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. *Cytokine* 2012; 60:681-685.
- Heaney M, Golde G. Myelodysplasia. *N Engl J Med* 1999; 340:1649-60.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:362-367.
- Heimpel, H. Epidemiology and aetiology of aplastic anaemia. In: *Aplastic Anaemia: Pathophysiology and Treatment* (ed. by H.Schrezenmeier & A.Bacigalupo), 2000; pp. 97–116. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Heuser M, Schlarmann C, Dobbernack V, Panagiota V, Wiehlmann L, Walter C, Beier F, Ziegler P, Yun H, Kade S, Kirchner A, Huang L, Koenecke C, Eder M, Brümmendorf TH, Dugas M, Ganser A, Thol F. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. *Haematologica* 2014; 99:e165-167.
- Heward J, Gough SC. Genetic susceptibility to the development of autoimmune disease. *Clin Sci (Lond)* 1997; 93:479-491.
- Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y, Milner JD, O'Shea JJ. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:1276-1287.

- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-1061.
- Howell J, Sawhney R, Testro A, Skinner N, Gow P, Angus P, Ratnam D, Visvanathan K. Cyclosporine and tacrolimus have inhibitory effects on toll-like receptor signaling after liver transplantation. *Liver Transpl* 2013;19: 1099-1107.
- Hsu HC, Tsai WH, Chen LY, Hsu ML, Ing-Tiau Kuo B, Ho CH, Lin CK, Wang SY. Production of hematopoietic regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells in patients with aplastic anemia. *Exp Hematol* 1996; 24:31-36.
- Hu LH, Chen FH, Li YR, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10:3514-3517.
- Hu S, Chen Y, Sun XD, Li FJ, Shu QF, Liu XL, Jiang SF. Association between IL-6-174G/C polymorphism and risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014; 18:127-130.
- INDEC. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010. Censo del Bicentenario Resultados Definitivos. Serie B Nº 2. Talleres Gráficos Prix, Buenos Aires 2012.
- International Agranulocytosis and Aplastic Anaemia Study group. Incidence of aplastic anaemia: The relevance of diagnostic criteria. *Blood* 1987; 70:1718-1721.
- Ismail M, Gibson FM, Gordon-Smith EC, Rutherford TR. Bcl-2 and Bcl-x expression in the CD34+ cells of aplastic anaemia patients: relationship with increased apoptosis and upregulation of Fas antigen. *Br J Haematol* 2001; 113:706-712.
- Issaragrisil S, Sriratanasatavorn C, Piankijagum A, Vannasaeng S, Porapakham Y, Leaverton PE, Kaufman DW, Anderson TE, Shapiro S, Young NS. Incidence of aplastic anemia in Bangkok. The Aplastic Anemia Study Group. *Blood* 1991; 77:2166-2168.
- Issaragrisil S, Leaverton PE, Chansung K, Thamprasit T, Porapakham Y, Vannasaeng S, Piankijagum A, Kaufman DW, Anderson TE, Shapiro S, Young NS. Regional patterns in the incidence of aplastic anemia in Thailand. The Aplastic Anemia Study Group. *Am J Hematol* 1999; 61:164-168.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121-1133.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman J. (Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2001.
- Jahromi M, Millward A, Demaine A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20:187-190.
- Jia S, Li C, Wang G, Yang J, Zu Y. The T helper type 17/regulatory T cell imbalance in patients with acute Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 162:131-137.
- Joshi S, Sharma B, Kaur S, Majchrzak B, Ueda T, Fukunaga R, Verma AK, Fish EN, Plataniias LC. Essential role for Mnk kinases in type II interferon (IFN γ) signaling and its suppressive effects on normal hematopoiesis. *J Biol Chem* 2011; 286:6017-6026.
- Kádár K, Demeter J, Andrikovics H y col. TNF-alpha promoter gene polymorphism in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2005; 113: 262-264.

- Kaplan E y Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:457-81.
- Kaufman DW, Kelly JP, Levy M, Shapiro S. The drug etiology of agranulocytosis and aplastic anemia. New York, Oxford University Press, 1991.
- Keller JR, Jacobsen SE, Dubois CM, Hestdal K, Ruscetti FW. Transforming growth factor-beta: a bidirectional regulator of hematopoietic cell growth. *Int J Cell Cloning* 1992; 10:2-11.
- Khani-Hanjani A, Lacaille D, Hoar D, Chalmers A, Horsman D, Anderson M, Balshaw R, Keown PA. Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000; 356:820-825.
- Killick SB, Cox CV, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Gibson FM. Mechanisms of bone marrow progenitor cell apoptosis in aplastic anaemia and the effect of anti-thymocyte globulin: examination of the role of the Fas-Fas-L interaction. *Br J Haematol* 2000; 111:1164-1169.
- Koijima S. Hematopoietic growth factors and marrow stroma in aplastic anemia. *Int J Hematol* 1998; 68:19-28.
- Kojima S, Ohara A, Tsuchida M, Kudoh T, Hanada R, Okimoto Y, Kaneko T, Takano T, Ikuta K, Tsukimoto I; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Risk factors for evolution of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after immunosuppressive therapy in children. *Blood* 2002; 100:786-790.
- Kondo A, Yamashita T, Tamura H, Zhao W, Tsuji T, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H, Tamada K, Chen L, Dan K, Ogata K. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2010; 116:1124-1131.
- Kook H, Risitano AM, Zeng W, Wlodarski M, Lottemann C, Nakamura R, Barrett J, Young NS, Maciejewski JP. Changes in T-cell VB-repertoire in aplastic anemia: effects of different immunosuppressive regimens. *Blood* 2002; 99:3668-3675.
- Kook H, Zeng W, Guibin C, Kirby M, Young NS, Maciejewski JP. Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp Hematol* 2001; 29:1270-1277.
- Kordasti SY, Alkhan SM, Lim Z, Abellan PP, Marsh JCW, Mufti GJ. Contrasting roles of Th1 and Th17 in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2009a; 114:1090.
- Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, Ingram W, Hayden J, Barber L, Matthews K, Chelliah R, Guinn B, Lombardi G, Farzaneh F, Mufti GJ. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2009b; 145:64-72.
- Kordasti S, Marsh J, Al-Khan S, Jiang J, Smith A, Mohamedali A, Abellan PP, Veen C, Costantini B, Kulasekararaj AG, Benson-Quarm N, Seidl T, Mian SA, Farzaneh F, Mufti GJ. Functional characterization of CD4+ T cells in aplastic anemia. *Blood* 2012; 119:2033-2043.
- Kouides P, Bennett J. Understanding the Myelodysplastic Syndromes. *The Oncologist* 1997; 2:389-401.
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34:391-399.

- Kulasekararaj AG, Jiang J, Smith AE, Mohamedali AM, Mian S, Gandhi S, Gaken J, Czepulkowski B, Marsh JC, Mufti GJ. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood* 2014; 124:2698-2704.
- Lee JH, Kwon KA, Lee S, Oh SY, Kim SH, Kwon HC, Han JY, Song MK, Chung JS, Lee HS, Kim YS, Lee SM, Joo YD, Kim HJ. Incidence and clinical characteristics of clonal cytogenetic abnormalities of acquired aplastic anemia in adults. *Korean J Hematol* 2010; 45:242-246.
- Lee JY, Goldman D, Pileri LM, Petri M, Sullivan KE. Interferon-gamma polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2001; 2:254-257.
- Lee YG, Kim I, Kim JH, Bae JY, Kwon JH, Shin DY, Lee JE, Song EY, Kim HK, Yoon SS, Park SS, Lee DS, Han KS, Park MH, Hong YC, Park S, Kim BK. Impact of cytokine gene polymorphisms on risk and treatment outcomes of aplastic anemia. *Ann Hematol* 2011; 90:515-521.
- Lee Harris N, Jaffe E, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink K, Vardiman J, Lister T, Bloomfield C. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissue: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting- Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17:3835-3849; *Ann Oncol* 10: 1419-32; *Histopathology* 6:69-86.
- Li X, Xu F, He Q, Wu L, Zhang Z, Chang C. Comparison of immunological abnormalities of lymphocytes in bone marrow in myelodysplastic syndrome (MDS) and aplastic anemia (AA). *Intern Med* 2010; 49:1349-1355.
- Li X, Chai W, Ni M, Xu M, Lian Z, Shi L, Bai Y, Wang Y. The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Biomed Res Int* 2014; 2014:265435.
- Liao C, Wang XY, Wei HQ, Li SQ, Merghoub T, Pandolfi PP, Wolgemuth DJ. Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:6853-6858.
- List A, Vardiman J, Issa J, DeWhitte T. Myelodysplastic Syndromes. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004; 297-317.
- Liu RY, Song X, Chen P, Lei Z, Miao J, Yi N, Zhang K, Pasche B, Zhang HT. Association between IL6 -174G/C and cancer: A meta-analysis of 105,482 individuals. *Exp Ther Med* 2012; 3:655-664.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- Locasciulli A, Oneto R, Bacigalupo A, Socié G, Korthof E, Bekassy A, Schrezenmeier H, Passweg J, Führer M, Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group. Haematologica* 2007; 92:11-18.
- Maciejewski JP, Hibbs JR, Anderson S, Katevas P, Young NS. Bone marrow and peripheral blood lymphocyte phenotype in patients with bone marrow failure. *Exp Hematol* 1994; 22:1102-1110.
- Maciejewski JP, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995a; 85:3183-3190.

- Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Anderson S, Young NS. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1995b; 91:245-252.
- Maciejewski J, Risitano A, Sloand EM, Nunez O, Young NS. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood* 2002; 99:3129-3135.
- Maciejewski JP, Risitano AM, Sloand EM; Wisch L, Geller N, Barrett JA, Young NS.. A pilot study of the recombinant soluble human tumour necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein in patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2002b; 117:119-126.
- Maciejewski J, Selleri C. Evolution of clonal cytogenetic abnormalities in aplastic anemia. *Leuk Lymphoma* 2004; 45:433-440.
- Maluf EM, Pasquini R, Eluf JN, Kelly J, Kaufman DW. Aplastic anemia in Brazil: incidence and risk factors. *Am J Hematol* 2002; 71:268-274.
- Manz CY, Dietrich PY, Schnuriger V, Nissen C, Wodnar-Filipowicz A. T-cell receptor beta chain variability in bone marrow and peripheral blood in severe acquired aplastic anemia. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23:110-122.
- Malkin D, Koren G, Saunders EF. Drug-induced aplastic anemia: pathogenesis and clinical aspects. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:402-410.
- Marcondes A, Mhyre AJ, Stirewalt DL, Kim SH, Dinarello CA, Deeg HJ. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:2865-70.
- Marsh J. Bone marrow failure Syndromes. *Clin Med* 2005; 5:332-336.
- Marsh JC, Ball SE, Cavenagh J, Darbyshire P, Dokal I, Gordon-Smith EC, Keidan J, Laurie A, Martin A, Mercieca J, Killick SB, Stewart R, Yin JA; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2009; 147:43-70.
- Mary JY, Baumelou M, Guiguet M, French Cooperative Group for Epidemiological Study of Aplastic Anemia. Epidemiology of aplastic anemia in France: a prospective multicentric study. *Blood* 1990; 75:1646-1653.
- Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201:1061-1067.
- Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Choay J, Trolard P, Schneider M, Hayat M, Schlumberger JR, Jasmin C. Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum. *Br Med J* 1970; 2:131-136.
- Mathew C, Easton D, Nakamura Y, Ponder B. Presymptomatic screening for multiple endocrine neoplasia type 2A with linked DNA markers. The MEN 2A International Collaborative Group. *Lancet* 1991; 337:7-11.
- Maynard SJ. *Evolutionary Genetics*. Second Edition. New York, Oxford University Press, 1998.
- Mikhailova N, Sessarego M, Fugazza G, Caimo A, De Filippi S, van Lint MT, Bregante S, Valeriani A, Mordini N, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Bacigalupo A. Cytogenetic abnormalities in patients with severe aplastic anemia. *Haematologica* 1996; 81:418-422.

- Montané E, Ibáñez L, Vidal X, Ballarin E, Puig R, García N, Laporte JR, Catalan Group for the Study of Agranulocytosis and Aplastic Anemia. Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study. *Haematologica* 2008; 93:518-523.
- Morari EC, Leite JL, Granja F, da Assumpção LV, Ward LS. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1485-1488.
- Mundle S, Reza S, Ali A, Mativi Y, Shetty V, Venugopal P, Gregory SA, Raza A. Correlation of tumor necrosis factor α (TNF α) with high caspase 3-like activity in myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett* 1999; 140:201-207.
- Musto P, Matera R, Minervini MM, Checchia-de Ambrosio C, Bodenizza C, Falcone A, Carotenuto M. Low serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-1 β in Myelodysplastic Syndromes responsive to recombinant erythropoietin. *Haematologica* 1994; 79:265-268.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88:355-365.
- Navas T, Zhou L, Estes M, Haghazari E, Nguyen AN, Mo Y, Pahanish P, Mohindru M, Cao T, Higgins LS, Plataniias LC, List A, Verma A, Bhagat T, Gajavelli S, Kambhampati S. Inhibition of p38 α MAPK disrupts the pathological loop of proinflammatory factor production in the Myelodysplastic Syndrome bone marrow microenvironment. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:1963-1975.
- Newell LF, Gooley T, Hansen JA, Stirewalt DL, Petersdorf EW, Deeg HJ. Tumor necrosis factor polymorphism affects transplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome but not in those with chronic myelogenous leukemia, independent of the presence of HLA-DR15. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16:1700-1706.
- Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M, Wedderburn LR. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:14751-14756.
- Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 2015; 45:344-355.
- Oh Sa, Li Mo. TGF- β : guardian of T cell function. *J Immunol* 2013; 191:3973-3979.
- O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010; 327:1098-1102.
- Pai SY, Kang BY, Sabadini AM, Parisini E, Truitt ML, Ho IC. Distinct structural requirements of GATA-3 for the regulation of thymocyte and Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2008; 180:1050-1059.
- Pardanani A, Finke C, Lasho TL, Al-Kali A, Begna KH, Hanson CA, Tefferi A. IPSS-independent prognostic value of plasma CXCL10, IL-7 and IL-6 levels in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2012; 26:693-699.
- Parker J, Mufti G, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia secondary to MDS. *Blood* 2000; 96:3932-38.
- Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socié G; International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106:3699-3709.
- Parnes A, Nikiforow S, Berliner N, Vanasse GJ. Single nucleotide polymorphisms in the human TNF gene are associated with anaemia and neutropenia in a cohort of

- patients with de novo myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2010; 150:700-701.
- Passweg JR, Pérez WS, Eapen M, Camitta BM, Gluckman E, Hinterberger W, Hows JM, Marsh JC, Pasquini R, Schrezenmeier H, Socié G, Zhang MJ, Bredeson C. Bone marrow transplants from mismatched related and unrelated donors for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37:641-649.
- Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis AA, Malcovati L, Porta MG, Killick S, Campbell LJ, Wang L, Langford CF, Fidler C, Oscier D, Aul C, Wainscoat JS, Boultonwood J. Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferon-stimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. *Blood* 2006; 108:337-345.
- Peng S. The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunology* 2006; 3:87-95.
- Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O, Matzinger P. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 2007; 109:5346-5354.
- Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transl Immunol* 1999; 7:127-128.
- Philpott NJ, Scopes J, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Gibson FM. Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. *Exp Hematol* 1995; 23:1642-1648.
- Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; 23:224-231.
- Polyak K. Negative regulation of cell growth by TGF beta. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1242:185-199.
- Powers MP, Nishino H, Luo Y, Raza A, Vanguri A, Rice L, Zu Y, Chang CC. Polymorphisms in TGFbeta and TNFalpha are associated with the myelodysplastic syndrome phenotype. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131:1789-1793.
- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999; 26:1-3.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000; 61:863-866.
- Prihartono N, Kriebel D, Woskie S, Thetkathuek A, Sripaung N, Padungtod C, Kaufman D. Risk of aplastic anemia and pesticide and other chemical exposures. *Asia Pac J Public Health* 2011; 23:369-377.
- Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet* 2001; 109:623-627.
- Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, DiFronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of therapy for severe aplastic anemia based on clinical, biologic, and treatment response parameters:

- conclusions of an international working group on severe aplastic anemia convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17:291-299.
- Rauff B, Idrees M, Shah SA, Butt S, Butt AM, Ali L, Hussain A, Irshad-Ur-Rehman, Ali M. Hepatitis associated aplastic anemia: a review. *Virology* 2011; 28:8:87.
- Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; 21:479-483.
- Risitano AM, Kook H, Zeng W, Chen G, Young NS, Maciejewski JP. Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V beta CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood* 2002; 100:178-183.
- Rizzo S, Killick SB, Patel S, Ball SE, Wadhwa M, Dilger P, Gordon-Smith EC, Gibson FM. Reduced TGF-beta1 in patients with aplastic anaemia in vivo and in vitro. *Br J Haematol* 1999; 107:797-803.
- Rodríguez M del C, Bernad A, Aracil M. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support. *Blood* 2004; 103:3349-3354.
- Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, Verduyn W, Westendorp RG, de Vries RR, Breedveld FC, Verweij CL, Huizinga TW. TNF -308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43:129-134.
- Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, Edwards BK, List AF. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001–2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 2008; 112: 45-52.
- Rosenfeld C, Bedell C. Pilot study of recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor (TNFR:Fc) in patients with low risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2002; 26:721-724.
- Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O, Young NS. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. *JAMA* 2003; 289:1130-1135.
- Rusten L, Jacobsen SE. Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha Directly Inhibits Human Erythropoiesis In Vitro: Role of p55 and p75 TNF Receptors. *Blood* 1995; 85: 889-996.
- Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol* 2013; 97:20-29.
- Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T, Kuroda H, Kusakabe T, Akiyama T, Konuma Y, Sasaki K, Tsuji N, Okamoto T, Kobune M, Kogawa K, Kato J, Takimoto R, Koyama R, Niitsu Y. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF-beta receptor on megakaryocytes and, in turn, renders them susceptible to suppression by TGF-beta itself with high specificity. *Blood* 1999; 94:1961-1970.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor University Press, 1989.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74, 54-63.
- Santini V, Girelli D, Sanna A, Martinelli N, Duca L, Campostrini N, Cortezzi A, Corbella M, Bosi A, Reda G, Olivieri O, Cappellini MD. Hepcidin levels and their

- determinants in different types of myelodysplastic syndromes. *PLoS One* 2011; 6:e23109.
- Sanz G, Sanz M, Vallespi T. Etiopathogenesis, prognosis and therapy of myelodysplastic syndromes. *Hematol Cell Ther* 1997; 39:277-94.
- Saracco P, Quarello P, Iori AP, Zecca M, Longoni D, Svahn J, Varotto S, Del Vecchio GC, Dufour C, Ramenghi U, Bacigalupo A, Locasciulli A; Bone Marrow Failure Study Group of the AIEOP (Italian Association of Paediatric Haematology Oncology). Cyclosporin A response and dependence in children with acquired aplastic anaemia: a multicentre retrospective study with long-term observation follow-up. *Br J Haematol* 2008; 140:197-205.
- Saunthararajah Y, Nakamura R, Nam JM, Robyn J, Loberiza F, Maciejewski JP, Simonis T, Molldrem J, Young NS, Barrett AJ. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; 100:1570-1574.
- Seabright M. Rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; i, 971-972.
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lübbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, Haase D. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30:820-829.
- Scheinberg P, Nunez O, Young NS. Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and cyclosporine for patients with relapsed or refractory severe aplastic anemia. *Br J Haematol* 2006; 133:622-627.
- Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Biancotto A, Wu CO, Young NS. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 2011; 365:430-438.
- Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood* 2012; 120:1185-1196.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3:1101-1108.
- Schultz JC, Shahidi NT. Detection of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow plasma and peripheral blood plasma from patients with aplastic anemia. *Am J Hematol* 1994; 45:32-38.
- Scott B, Ramakrishnan A, Fosdal M, Storer B, Becker P, Petersdorf S, Deeg HJ. Anti-thymocyte Globulin plus Etanercept as Therapy for Myelodysplastic Syndromes (MDS): a Phase II Study. *Br J Haematol* 2010a; 149:706-710.
- Scott BL, Ramakrishnan A, Storer B, Becker PS, Petersdorf S, Estey EH, Deeg HJ. Prolonged responses in patients with MDS and CMML treated with azacitidine and etanercept. *Br J Haematol* 2010b; 148:944-947.
- Scott JL, Cartwright GE, Wintrobe MM. Acquired aplastic anemia: an analysis of thirty-nine cases and review of the pertinent literature. *Medicine (Baltimore)* 1959; 38:119-172.

- Selleri C, Maciejewski JP, Sato T, Young NS. Interferon-g constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. *Blood* 1996; 87:4149-4157.
- Serio B, Selleri C, Maciejewski JP. Impact of immunogenetic polymorphisms in bone marrow failure syndromes. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11:544-552.
- Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (Eds). *ISCN (2013) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. S. Karger, Basel 2013.
- Shan NN, Hu Y, Liu X, Wang X, Yuan D, Li Y. Imbalanced expression of T-bet and T cell immunoglobulin mucin-3 in patients with aplastic anaemia. *J Clin Immunol* 2013; 33:809-816.
- Shi J, Ge M, Lu S, Li X, Shao Y, Huang J, Huang Z, Zhang J, Nie N, Zheng Y. Intrinsic impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in acquired aplastic anemia. *Blood* 2012; 120:1624-1632.
- Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* 2010; 24:101-122.
- Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 1990; 248:1380-1388.
- Shipounova IN, Petrova TV, Svinareva DA, Momotuk KS, Mikhailova EA, Drize NI. Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia. *Clin Transl Sci* 2009; 2:67-74.
- Sloand E, Maciejewski JP, Tisdale J, Follman D, Young NS. Intracellular Interferon-g (IFN-g) in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood* 2002a; 100:3129-3135.
- Sloand E, Kim S, Fuhrer M, Risitano AM, Nakamura R, Maciejewski JP, Barrett AJ, Young NS. Fas-mediated apoptosis is important in regulating cell replication and death in trisomy 8 hematopoietic cells but not in cells with other cytogenetic abnormalities. *Blood* 2002b; 100:4427-4432.
- Smith MT. Overview of benzene-induced aplastic anaemia. *Eur J Haematol Suppl.* 1996; 60:107-110.
- Söderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1176:55-69.
- Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Millà F, Ribera JM, Bureo E, Marquez ML, Arranz E, Florensa L. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90:1168-1178.
- Solomou EE, Keyvanfar K, Young NS. T-bet, a Th1 transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia. *Blood* 2006; 107:3983-3991.
- Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, Malide D, Keyvanfar K, Visconte V, Kajigaya S, Barrett AJ, Young NS. Deficient CD4+ CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in acquired aplastic anemia. *Blood* 2007; 110:1603-1606.
- Song EY, Park S, Lee DS, Cho HI, Park MH. Association of human leukocyte antigen-DRB1 alleles with disease susceptibility and severity of aplastic anemia in Korean patients. *Hum Immunol* 2008; 69:354-359.
- Stasi R, Brunetti M, Bussa S, Conforti M, Martin LS, La Presa M, Bianchi M, Parma A, Pagano A. Serum levels of tumour necrosis factor- α predict response to

- recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Haematol* 1997; 19:197-201.
- Steensma DP, Gibbons RJ, Higgs DR. Acquired alpha-thalassemia in association with myelodysplastic syndrome and other hematologic malignancies. *Blood* 2005; 105:443-452.
- Stifter G; Heiss S, Gastl G, Tzankov A, Stauder R. Over-expression of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow biopsies from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis. *Eur J Haematol* 2005; 75:485-491.
- Stirewalt DL, Mhyre AJ, Marcondes M, Pogossova-Agadjanyan E, Abbasi N, Radich JP, Deeg HJ. Tumour necrosis factor-induced gene expression in human marrow stroma: clues to the pathophysiology of MDS? *Br J Haematol* 2008; 140:444-453.
- Stone RM. How I treat patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2009; 113:6296-6303.
- Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006; 107:1308-1314.
- Sugimori C, Yamazaki H, Feng X, Mochizuki K, Kondo Y, Takami A, Chuhjo T, Kimura A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S. Roles of DRB1 *1501 and DRB1 *1502 in the pathogenesis of aplastic anemia. *Exp Hematol* 2007; 35:13-20.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL (Eds). 2008 WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008 4th ed. Lyon, France: IARC Press.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002; 295:338-342.
- Tehranchi R, Fadeel B, Schmidt-Mende J, Forsblom A, Emanuelsson E, Jadersten M, Christensson B, Hast R, Howe R, Samuelsson J, Zhivotovsky B, Hellstrom-Lindberg E. Antiapoptotic Role of Growth Factors in the Myelodysplastic Syndromes: Concordance Between In vitro and In vivo Observations. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6291-6299.
- Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361:1872-1885.
- Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223:87-113.
- Thompson WP, Richter MN, Edsall KS. An Analysis of So-Called Aplastic Anemia. *Am J Med Sci* 1934; 187:77-88.
- Tsimberidou AM, Estey E, Wen S, Pierce S, Kantarjian H, Albitar M, Kurzrock R. The Prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed Acute Myeloid Leukemia and High-risk Myelodysplastic Syndromes. *Cancer* 2008; 113:1605-1613.
- Tsuda H, Yamasaki H. Type I and Type II T-Cell Profiles in Aplastic Anemia and Refractory Anemia. *Am J Hematol* 2000; 64:271-274.
- Uruahy MA, de Souza KS, Oliveira YM, Loureiro MB, da Silva HP, Freire-Neto FP, Bezerra JF, Luchessi AD, Doi SQ, Hirata RD, Almeida MD, Arrais RF, Hirata MH, de Rezende AA. Association of polymorphisms in IL6 gene promoter region with type 1 diabetes and increased albumin-to-creatinine ratio. *Diabetes Metab Res Rev* 2014 Nov 10. [Epub ahead of print]

- Valent P, Horny HP, Bennett J, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, Haferlach T, Haase D, Kolb HJ, Krieger O, Loken M, van de Loosdrecht A, Ogatam K, Orfao A, Pfeilstöcker M, Rüter B, Sperr W, Stauder R, Wells D. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007; 31:727-376.
- Vardiman JW. Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 199-204.
- Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-951.
- Verhoef GE, De Schouwer P, Ceuppens JL, Van Damme J, Goossens W, Boogaerts MA. Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1992; 6:1268-1272.
- Vozarova B, Fernández-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; 112:409-413.
- Waldron-Lynch F, Adams C, Amos C, Zhu DK, McDermott MF, Shanahan F, Molloy MG, O'Gara F. Tumour necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families. *Genes Immun* 2001; 2:82-87.
- Wanachiwanawin W, Siripanyaphinyo U, Piyawattanasakul N, Kinoshita T. A cohort study of the nature of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and PIG-A mutations in patients with aplastic anemia. *Eur J Haematol* 2006; 76:502-509.
- Wang Y, Su MA, Wan YY. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity* 2011; 35:337-348.
- Wang SY, Yang XJ, Yang SS, Wang W, Tian YY, Cao FL, Zhou J. Association analysis of cytokine polymorphisms and plasma level in Northern Chinese Han patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125:1576-1580.
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1:353.
- Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS, de Vries N, van de Putte LB, Emery P, Duff GW. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994; 24:191-195.
- Wintrobe MM. The therapeutic millennium and its price: A view from the haemopoietic system. *J R Coll Physicians Lond* 1969; 3:99.
- Wu C, Wang S, Wang F, Chen Q, Peng S, Zhang Y, Qian J, Jin J, Xu H. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol* 2009; 158:199-204.
- Yang C, Zhang X. Incidence survey of aplastic anemia in China. *Chin Med Sci J* 1991; 6:203-207.
- Yang L, Dybedal I, Bryder D, Nilsson L, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. IFN-gamma negatively modulates self-renewal of repopulating human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005; 174:752-757.

- Yang Z, Liang Y, Qin B, Zhong R. A meta-analysis of the association of IL-6 -174 G/C and -572 G/C polymorphisms with systemic lupus erythematosus risk. *Rheumatol Int* 2014; 34:199-205.
- Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 2011; 96:771-774.
- Young NS. Aplastic anaemia. *Lancet* 1995; 346:228-232.
- Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997; 336:1365-1372.
- Young NS. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000; 37:3-14.
- Young N. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: current issues in pathophysiology and treatment. *Curr Hematol Rep* 2005; 4:103-109.
- Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006; 108:2509-2519.
- Zeng W, Chen G, Kajigaya S, Nunez O, Charrow A, Billings EM, Young NS. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. *Blood* 2004; 103:325-332.
- Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, Yachie A, Takami A, Kondo Y, Sugimori N, Yamazaki H, Miura Y, Shiobara S, Matsuda T. Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 1999; 93:3008-3016.
- Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004; 172:5213-5221.
- Zhou L, Nguyen AN, Sohal D, Ying Ma J, Pahanish P, Gundabolu K, Hayman J, Chubak A, Mo Y, Bhagat TD, Das B, Kapoun AM, Navas TA, Parmar S, Kambhampati S, Pellagatti A, Braunchweig I, Zhang Y, Wickrema A, Medicherla S, Boulwood J, Plataniias LC, Higgins LS, List AF, Bitzer M, Verma A. Inhibition of the TGF-beta receptor I kinase promotes hematopoiesis in MDS. *Blood* 2008; 112:3434-3443.
- Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009; 30:646-655.
- Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A, Sallusto F. Pathogen-induced human T(H)17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* 2012; 484:514-518.
- Zoumbos NC, Gascon P, Djeu JY, Trost SR, Young NS. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med* 1985; 312:257-265.