

La presencia del alelo -308 A del TNF α se asocia con anemia y plaquetopenia en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos

Belli C.B.^{1#}, Bestach Y.^{1#}, Flores M.G.², Sieza Y.³, Gelemur M.³, Venturini C.⁴, Negri Aranguren P.⁴, Watman N.⁵, Bengió R.⁶, Larripa I.¹

¹Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET) / Academia Nacional de Medicina (ANM), ²HIGA "Dr C Durand" Buenos Aires, ³HIGA "San Martín", La Plata, ⁴Instituto de Hematología y Hemoterapia, Paraná, ⁵HIGA "Ramos Mejía", Buenos Aires, ⁶"Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina" República Argentina, #Declaración de autorías: CBB y YB contribuyeron de igual manera en el desarrollo del presente trabajo y ambos deben ser considerados como primeros autores.

Correspondencia: Carolina B Belli
Laboratorio de Genética Hematológica, IMEX-CONICET/ANM.
Pacheco de Melo 3081. CP 1425
Ciudad de Buenos Aires. Argentina
Teléfono: 54-11-4805-8803
Fax: 54-11-4803-9475
E-mail: cbelli@hematologia.anm.edu.ar

Fecha de recepción: 23/03/2012
Fecha de aprobación: 30/03/2012

HEMATOLOGIA, Vol. 16 N° 3: 147-153
Septiembre-Diciembre, 2012



ARTÍCULO
ORIGINAL

RESUMEN

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de alteraciones hematológicas caracterizados, en parte, por la presencia de citopenias periféricas. El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) es una citoquina proinflamatoria con un rol predominante en la patofisiología de los SMD: niveles circulantes en plasma incrementados y una mayor expresión en células de médula ósea asociada con aumento en la tasa de apoptosis. El bloqueo del TNF α estimula la formación de colonias hematopoyéticas *in vitro* y mejora las citopenias periféricas *in vivo*. Objetivo: Analizar la presencia del polimorfismo de nucleótido simple (SNP) -308G/A del TNF α en pacientes con SMD *de novo* debido a que la presencia del alelo A se asocia con su mayor producción.

Se estudiaron 107 pacientes (53 AR, 11 AS, 27 AREB, 2 AREBt y 14 LMMC), con una mediana de edad: 66 (14-86) años, relación de sexos M/F=1,2 (59/48), mediana de supervivencia: 39,5 (1-170) meses. El SNP se analizó mediante amplificación por PCR y digestión con la enzima NcoI. Las frecuencias genotípicas halladas fueron: 0,74 G/G y 0,26 A/A+A/G en los pacientes vs 0,86 y 0,14 en los controles (n=94), respectivamente ($p=0,0356$; *odds ratio*-OR: 2,208). Los pacientes que portaban el alelo A presentaron un menor nivel de hemoglobina (8,7 vs 9,9 g/dL, $p=0,0240$), menor recuento de plaquetas (95000 vs 135000 / μ L, $p=0,0359$) y menor edad (61 vs 68 años, $p=0,0131$) al diagnóstico. Además, se observó que estos pacientes presentaron un riesgo 4 veces aumentado de requerir transfusiones (78%

vs 47%, $p=0,0070$, OR: 3,912). No se observaron diferencias estadísticas con otros parámetros clínicos analizados. Estos resultados fueron similares a los observados al excluir los pacientes con LMMC.

El genotipo constitutivo asociado con alta expresión se encuentra 2 veces aumentado en los pacientes con SMD. La presencia del alelo -308 A se asoció con menor edad, mayor grado de anemia y trombocitopenia al diagnóstico. Estos resultados avalarían la hipótesis de que el TNF α podría actuar como un modificador de la severidad de la enfermedad. Estos pacientes se verían favorecidos, potencialmente, con terapias que bloqueen o modulen el TNF α .

Palabras claves: Síndromes Mielodisplásicos, TNF α , anemia, trombocitopenia.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndromes (MDS) constitute a heterogeneous group of clonal hematological diseases characterized by refractory cytopenia(s) as a result of an ineffective hematopoiesis. MDS patients show increased levels of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) which is a multifunctional proinflammatory cytokine. The aim of this work is to examine the presence of -308G/A TNF α variants and to analyze whether it is associated with clinical parameters in a cohort of 107 Argentinean *de novo* MDS patients. The A/A+A/G genotype at TNF α -308 was overrepresented 2-fold in our population ($p=0.0356$,

odds ratio-OR: 2.208). The presence of the high expressing -308A allele was associated with lower hemoglobin level (8.7 vs 9.9 g/dL; $p=0.0240$), reduced platelet counts (95000 vs 135000 μL ; $p=0.0359$) and younger age (61 vs 68 years; $p=0.0131$) at diagnosis. Also, these patients showed 4-fold higher risk of transfusion requirement (78% vs 47%, $p=0.0070$) during the follow up. In conclusion, the presence of an inherited -308A TNF α , which increases its transcription level, was associated with MDS phenotype in our cohort of Argentine MDS patients. And, an overexpression of TNF α may promote an underlying proinflammatory state that cooperates with intrinsic defects within MDS progenitors to increase the severity of certain phenotypic features of the disease.

Key words: Myelodysplastic Syndromes, TNF α , anemia, thrombocytopenia

INTRODUCCIÓN

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades hematológicas clonales, caracterizado por la presencia de citopenias refractarias en el contexto de una médula ósea (MO) normo o hiperclonal y un riesgo variable de progresión a Leucemia Mieloide Aguda (LMA)¹⁻³. Los SMD se caracterizan por la expansión clonal de células troncales hematopoyéticas anormales dentro de un microambiente medular asociado con la sobreproducción de múltiples citoquinas proinflamatorias⁴⁻⁶.

Las citoquinas juegan un rol importante en la regulación de la hematopoyesis, en donde el balance entre la acción de factores estimulantes y mielosupresores es fundamental para la óptima producción de los diferentes linajes hematopoyéticos^{4, 6-7}. Los pacientes con SMD presentan un incremento en el porcentaje de células T-electoras con un perfil citotóxico y una disminución de las células T-regulatorias asociadas con la supresión de la hematopoyesis⁸. Las células T citotóxicas activadas CD8+ se caracterizan por un aumento en la producción de citoquinas típicas de la respuesta inmune celular T-helper 1 (Th1), incluyendo especialmente al Factor de Necrosis Tumoral-alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha*: TNF α)⁸. Esta citoquina proinflamatoria posee un rol pleiotrópico en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes y neoplasias hematológicas, incluyendo los SMD. La sobreproducción de TNF α ha sido demostrada tanto en el microambiente medular como en el plasma de pacientes con SMD⁹⁻¹⁰. Altos niveles séricos de TNF α han sido inversamente correlacionados con los valores de hemoglobina, la respuesta al tratamiento con eritropoyetina (EPO) y la evolución clínica de los pacientes¹¹⁻¹⁴. Otros estudios muestran que el incremento de los niveles de esta citoquina en la MO se correlaciona con la tasa de apoptosis intramedular⁹, el grado de anemia y el pronóstico de los pacientes¹⁵.

Si bien estos estudios sugieren que células de la MO podrían interactuar con el clon celular mielodisplásico creando un microambiente adverso de citoquinas, el cual resultaría en una hematopoyesis inefectiva, los mecanismos moleculares involucrados aún son desconocidos.

El gen del TNF α contiene polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), algunos de los cuales son funcionales y están asociados con su nivel de expresión. Dentro de estos polimorfismos, el alelo A presente en la posición -308 de la región promotora, se asocia con un nivel de transcripción dos veces incrementado¹⁶. El genotipo -308 A/A¹⁷ y el alelo -308 A¹⁸ del TNF α fueron encontrados sobre-representados en pacientes con SMD. Este genotipo fue asociado con neutropenia¹⁹ y su presencia afecta la eficacia del trasplante de MO (TMO) en estos pacientes²⁰. Otros trabajos no pudieron confirmar estas asociaciones pudiendo deberse al número limitado de pacientes analizados²¹⁻²².

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia del SNP -308 G/A del TNF α y analizar si la presencia de la variante -308 A se asocia con parámetros clínicos en una cohorte de pacientes argentinos con SMD *de novo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 107 pacientes, de manera retrospectiva (marzo de 1987-marzo de 2011), provenientes de diferentes instituciones de la República Argentina. Sólo fueron incluidos pacientes con diagnóstico confirmado de SMD *de novo*, sin antecedentes documentados de radio- o quimioterapia. Los pacientes fueron categorizados de acuerdo a la clasificación Franco-Americano-Británica (FAB)¹ y también según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS)². La mayoría de los pacientes recibieron tratamiento de soporte, 22 pacientes recibieron dosis variables de quimioterapia en la fase leucémica de la enfermedad, 2 fueron sometidos a TMO; 7 recibieron agentes hipometilantes y 1 lenalidomida.

Análisis del SNP -308 G/A del TNF α

El ADN genómico de los pacientes y de los controles fue obtenido mediante el método de extracción con fenol-cloroformo y precipitación etanólica, a partir de muestras de sangre periférica (SP) y/o de MO. El SNP-308 G/A fue analizado mediante amplificación por PCR y posterior digestión con la enzima NcoI (RFLP: *Restriction Fragment Length*

Polymorphisms)²³. Las condiciones de amplificación fueron: 25 μ l de KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Tris-HCl pH 8.3 10 mM, dNTPs 100 mM, *Taq* DNA polimerasa 0.45 U (Promega, Argentina), 200 ng de ADN genómico, 0.4 mM de los oligonucleótidos A1 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' y A2 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'. El oligonucleótido A2 posee una modificación en su secuencia (incorporación de una citosina) la cual genera el sitio de reconocimiento de la enzima *Nco*I (Fermentas, TecnoLab, Argentina) en presencia de la variante -308G. Las condiciones de termociclado incluyeron 34 ciclos de 94° C, 45 s; 60° C, 45 s y 72° C, 60 s. Los productos de amplificación obtenidos fueron digeridos durante 16hs a 37° C y los digestos fueron, posteriormente, resueltos en un gel de poliacrilamida (29:1) no desnaturizante al 12% observables luego de la tinción con nitrato de plata.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas de nuestra cohorte de pacientes fueron comparadas con las obtenidas en nuestra población de controles (n=94). Y, además, con las frecuencias disponibles en la base de datos de SNP provenientes de una población multiétnica del Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Centre of Biotechnology Information SNP database*: <http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/snp>; código de identidad: rs1800629; n=1455, al 19 de julio de 2011). Las diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas fueron analizadas mediante el test Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Las medianas de las variables fueron comparadas utilizando el test de Mann-Whitney y la sobrevida fue analizada utilizando el método según Kaplan-Meier y el test de Log-Rank. El nivel de significancia estadística

fue determinado en 0,05. Hemorragias, infecciones y evolución a LMA fueron consideradas causa de muerte asociada a SMD. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico *GraphPad Prism* versión 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA).

RESULTADOS

Los casos de SMD fueron subdivididos según la clasificación FAB¹ en: 53 Anemia Refractaria (AR), 11 AR con Sideroblastos en Anillo (ARSA), 27 AR con Exceso de Blastos (AREB), 2 AREB en transformación (AREBt) y 14 Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC). Y, acorde a la OMS² en: 14 AR/ARSA/SMD inclassificables, 1 Síndrome 5q-, 42 Citopenia Refractaria (CR) con Displasia Multilínea (CRDM), 7 AREB-I, 21 AREB-II y 7 CR cuyos datos de displasia no se encontraban disponibles. La mediana de edad fue de 66 (14-86) años, con una relación de sexos de 1,2 (M/F: 59/48). Durante el seguimiento de la enfermedad (mediana: 26 meses, rango: 1-170 meses) 28 pacientes (26%) evolucionaron a LMA y 57 pacientes (53%) fallecieron.

Los resultados de las frecuencias genotípicas se encuentran resumidos en la Tabla I. Los genotipos A/A+A/G están duplicados en nuestra población de pacientes con SMD comparado con nuestra población control ($p=0,0356$; *odds ratio*-OR: 2,208) y también en comparación con la población multiétnica disponible en la base de datos del NCBI ($p=0,0363$; OR: 1,670). Las diferencias fueron más evidentes dentro del subtipo AR-FAB ($p=0,0295$, OR: 2,694) y del subtipo CRDM-OMS ($p=0,0548$; OR: 2,492). La frecuencia del alelo A también mostró diferencias estadísticamente significativas al ser comparadas con ambas poblaciones control ($p=0,0381$; OR: 2,026 y $p=0,0230$; OR: 1,635; respectivamente).

TABLA I.- Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -308G/A del TNF α .

	SMD (n=107)	Controles (n=94)	NCBI (n=1455)			
Genotipos						
	A/A+A/G	(2+26)= 28	(1+12)= 13	* $p=0,0356^a$ OR: 2,208 IC: 1,07-4,57	(9+244)=253	* $p=0,0363^b$ OR: 1,670 IC: 1.06-2.62
	G/G	79	81		1192	
Alelos						
	A	30	14	* $p=0,0381^a$ OR: 2,026 IC:1,04-3,95	262	* $p=0,0230^b$ OR: 1,635 IC: 1,09-2,46
	G	184	174		2628	

a: Test exacto de Fisher; b: Test de Chi cuadrado; OR: Odds ratio; IC: intervalo de confianza. NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica, base de datos de SNP.

La Tabla II muestra un resumen de los datos clínicos al diagnóstico: sexo, edad, nivel de hemoglobina, recuento de plaquetas y neutrófilos, porcentaje de blastos en la MO y requerimiento transfusional durante el seguimiento, de acuerdo a los genotipos obtenidos. La presencia del alelo -308A en el genotipo de pacientes con SMD, relacionado a una alta expresión del TNF α , se asoció con bajos niveles de hemoglobina (8,7 vs 9,9 g/dL; $p=0,0240$), menores recuento de plaquetas (95000 vs 135000/ μ L; $p=0,0359$) y menor edad (61 vs 68 años; $p=0,0131$) al diagnóstico. Estos pacientes mostraron un riesgo 2,6 y 3,4 veces mayor de presentar niveles de hemoglobina ≤ 9 g/dL (57% vs 34%, $p=0,0438$, OR= 2,568) o recuentos de plaquetas inferiores a 50000/ μ L (36% vs 14%; $p=0,0241$, OR= 3,434), respectivamente. Estas diferencias mostraron

mayor significación al excluir el subtipo morfológico LMMC (Tabla III). Los pacientes portadores del alelo -308A presentaron un riesgo incrementado de requerir transfusiones (78% vs 47%, $p=0,0070$, OR: 3,912) durante el transcurso de la enfermedad. Estos resultados sugieren que el alelo A asociado a una alta expresión del TNF α está vinculado con algunos hallazgos clínicos en los pacientes con SMD.

DISCUSIÓN

Como en la mayoría de las neoplasias, los SMD probablemente se desarrollarían a partir de una célula troncal hematopoyética primitiva genéticamente transformada, en donde los cambios genéticos y epigenéticos contribuirían a la diversidad fenotípica

TABLA II.- Características clínicas de los pacientes según el genotipo (n=107)

	A/A+A/G	G/G	
Edad (años)			
Media \pm desvío estándar	55,9 \pm 3,4	65,2 \pm 1,5	
Mediana	61	68	* $p=0,0131^a$
Sexo (Masculino/Femenino)	11/17	48/31	$p=0,0759^b$
Nivel de hemoglobina (g/dL)			
Media \pm desvío estándar	8,5 \pm 2,6	9,8 \pm 2,0	
Mediana	8,7	9,9	* $p=0,0240^a$
≤ 9	16 (57%)	27 (34%)	* $p=0,0438^b$
>9	12 (43%)	52 (66%)	
Recuento de plaquetas / μ L			
Media \pm desvío estándar	118300 \pm 20220	163200 \pm 12930	
Mediana	95000	135000	* $p=0,0359^a$
<50000	10 (36%)	11 (14%)	* $p=0,0241^b$
≥ 50000	18 (64%)	68 (86%)	
Recuento de neutrófilos / μ L			
Media \pm desvío estándar	2856 \pm 651	2416 \pm 319	
Mediana	1787	1792	$p=0,9041^a$
<1500	12 (43%)	34 (43%)	
≥ 1500	16 (57%)	45 (57%)	$p=1,0000^b$
Blastos en MO (%)			
<5	21 (75%)	51 (65%)	$p=0,3568^b$
≥ 5	7 (25%)	28 (35%)	
Requerimiento transfusional			
Sí	21 (78%)	6 (22%)	* $p=0,0070^b$
No	34 (47%)	38 (53%)	
Cariotipo			
Normal/-Y	13 (48%)	41/2 (58%)	$p=0,4979^b$
Anormal	14 (52%)	31 (42%)	
Sobrevida (mediana, meses)	32	40	$p=0,7380^c$
Evolución a LMA (25%, meses)	53	23	$p=0,2652^c$

^a: Test de Mann-Whitney; ^b: Test exacto de Fisher; ^c: Test según Kaplan-Meier y test de log-Rank; MO: médula ósea; LMA: Leucemia Mieloide Aguda.

TABLA III.- Características clínicas de los pacientes según el genotipo (n=93, excluyendo subtipo LMMC)

	A/A+A/G	G/G	
Edad (años)			
Media \pm desvío estándar	54,0 \pm 3,8	64,3 \pm 1,6	
Mediana	59	66	* <i>p</i> =0,0148 ^a
Sexo (Masculino/Femenino)	9/15	40/29	<i>p</i> =0,1002 ^b
Nivel de hemoglobina (g/dL)			
Media \pm desvío estándar	8,1 \pm 2,5	9,8 \pm 2,1	
Mediana	8,0	9,8	* <i>p</i> =0,0048 ^a
\leq 9	16 (67%)	24 (35%)	* <i>p</i> =0,0087 ^b
$>$ 9	8 (33%)	45 (65%)	
Recuento de plaquetas / μ L			
Media \pm desvío estándar	120500 \pm 23500	165000 \pm 13860	
Mediana	95000	145000	* <i>p</i> =0,0482 ^a
$<$ 50000	10 (42%)	10 (14%)	* <i>p</i> =0,0089 ^b
\geq 50000	14 (58%)	59 (86%)	
Recuento de neutrófilos / μ L			
Media \pm desvío estándar	2631 \pm 654	2143 \pm 207	
Mediana	1641	1770	<i>p</i> =0,8952 ^a
$<$ 1500	11 (46%)	31 (45%)	
\geq 1500	13 (54%)	38 (55%)	<i>p</i> =1,0000 ^b
Blastos en MO (%)			
$<$ 5	17 (71%)	47 (68%)	<i>p</i> =1,0000 ^b
\geq 5	7 (29%)	22 (32%)	
Requerimiento transfusional			
Sí	19 (74%)	30 (47%)	* <i>p</i> =0,0081 ^b
No	5 (26%)	34 (53%)	
Cariotipo			
Normal/-Y	12 (52%)	34/2 (55%)	<i>p</i> =0,8120 ^b
Anormal	11 (48%)	29 (45%)	
Sobrevida (mediana, meses)	32	59	<i>p</i> =0,5122 ^c
Evolución a LMA (25%, meses)	47	17	<i>p</i> =0,3262 ^c

^a: Test de Mann-Whitney; ^b: Test exacto de Fisher; ^c: Test según Kaplan-Meier y test de log-Rank; MO: médula ósea; LMA: Leucemia Mieloide Aguda.

existente en esta patología. La respuesta inmune influenciada por la producción de citoquinas y la inter-relación con el estroma medular de cada individuo también podrían contribuir con el fenotipo de la enfermedad, el cual se caracteriza, principalmente, por la presencia de citopenias refractarias^{3,5}.

El TNF α es una citoquina de acción pleiotrópica inmunomoduladora que juega un rol predominante en la patofisiología de los SMD. La apoptosis intramedular mediada por esta citoquina, sobre todo en los estadios tempranos del desarrollo, contribuye a la hematopoyesis inefectiva encontrada en los SMD^{6,24}. El TNF α puede actuar directamente sobre células diana o indirectamente por estimulación de células accesorias induciendo la producción de citoquinas^{10,24-25}.

Nuestros resultados demuestran una asociación entre el SNP-308 G/A y características clínicas de los pacientes con SMD. El genotipo constitutivo asociado con alta expresión se encuentra dos veces incrementado en nuestra cohorte de pacientes, respecto de la población control, siendo estas diferencias más evidentes dentro del subtipo AR-FAB. La presencia del alelo-308 A se asoció con menor edad, mayor grado de anemia y trombocitopenia al diagnóstico. Además, su hallazgo incrementaría cuatro veces la necesidad de requerir soporte transfusional durante el transcurso de la enfermedad. Estos resultados avalarían la hipótesis de que el TNF α podría actuar como un modificador de la severidad de la enfermedad.

La secreción de la citoquina mielosupresora TNF α 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 esta citoquina correlaciona con la apoptosis de células troncales CD34⁺⁷. El TNF α 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^{11, 25}.

La falla funcional de la hematopoyesis se encuentra directamente relacionada con la presencia de citopenias refractarias en los SMD. Su asociación con la disregulación en la producción de citoquinas es considerada como uno de los mecanismos de interés para el desarrollo de terapias inmunomoduladoras²⁵⁻²⁶. 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^{4, 27}. La neutralización de la actividad del TNF α 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 tratamiento²⁶⁻²⁹. El uso de terapias combinadas con Etanercept y globulina anti-timocítica (ATG) o azacitidina (AZA) en ensayos de fase II mostraron una respuesta global en el 70% de los pacientes³⁰⁻³¹. La detección del SNP-308 G/A del TNF α podría ser útil para futuros ensayos clínicos, particularmente aquellos que bloqueen o modulen la actividad de esta citoquina proinflamatoria.

Como conclusión, la presencia del alelo -308 A del TNF α , de alta producción de esta citoquina, está asociado con características clínicas en nuestra cohorte de 107 pacientes con SMD *de novo*. Coincidiendo con la sugerencia de Parnes y col.¹⁹, la sobreexpresión del TNF α podría promover un estado proinflamatorio basal, que cooperaría con defectos intrínsecos de los progenitores mielodisplásicos incrementando la severidad de las citopenias observadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra Liliana Rosetti, PhD por el asesoramiento técnico y a los profesionales de los Servicios de Hematología de las siguientes Instituciones por su colaboración en el aporte de datos clínicos: Instituto de Investigaciones Hematológicas;

Instituto de Hemoterapia y Hematología, Paraná; HIGA "Durand"; HIGA "Ramos Mejía"; HIGA "San Martín", La Plata.

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y de la Fundación "A. J. Roemmers"

BIBLIOGRAFÍA

- Bennett J, Catovsky D, Daniel M y col. Proposals for the classification of the myelodysplastic Syndromes. **Br J Haematol** 1982; 51:189-199.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms (Review). **Blood** 2002; 100:2292-2302.
- Tefferi A, Vardiman J. Myelodysplastic Syndromes. **N Engl J Med** 2009; 361: 1872-1885.
- Gersuk GM, Beckham C, Loken MR y col. A role for tumor necrosis factor- α , Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol** 1998; 103:176-188.
- Raza A, Mundle S, Shetty V y col. A paradigm shift in myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 1996; 10:1648-1652.
- Marcondes AM, Mhyre AJ, Stirewalt DL y col. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:2865-2870.
- Navas T, Zhou L, Estes M y col. 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.
- Chamuleau M, Westers T, van Dreunen L y col. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. **Haematologica** 2009; 94:496-506.
- Mundle SD, Reza S, Ali A y col. Correlation of tumor necrosis factor α (TNF α) with high caspase 3-like activity in myelodysplastic syndromes. **Cancer Lett** 1999; 140:201-207.
- Deeg HJ, Beckham C, Loken MR y col. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. **Leuk Lymphoma** 2000; 37:405-414.
- Musto P, Matera R, Minervini M, y col. Low serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-1 β in Myelodysplastic Syndromes responsive to recombinant erythropoietin haematologica 1994; 79:265-268
- Verhoef GE, De Schouwer P, Ceuppens JL y col. Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 1992; 6:1268-1272.
- Stasi R, Brunetti M, Bussa S y col. 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.
- Tsimberidou AM, Estey E, Wen S y col. The Prognostic Significance of Cytokine Levels in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia and High-risk Myelodysplastic Syndromes. **Cancer** 2008; 113:1605-1613.
- Stifter G, Heiss S, Gastl G y col. 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.

16. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immunol** 1997; 34:391-399.
17. Powers M, Nishino H, Luo Y y col. Polymorphisms in TGF β and TNF β are associated with the Myelodysplastic Syndrome Phenotype. **Arch Pathol Lab Med** 2007; 131:1789-1793.
18. Gowans D, O'Sullivan A, Rollinson S y col. 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.
19. Parnes A, Nikiforow S, Berliner N y col. 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.
20. Newell LF, Gooley T, Hansen JA y col. 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.
21. Balog A, Borbenyi Z, Gyulai Z y col. 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.
22. Kádár K, Demeter J, Andrikovics H y col. TNF-alpha promoter gene polymorphism in patients with myelodysplastic syndrome. **Acta Haematol** 2005; 113:262-264.
23. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI y col. 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.
24. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S y col. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon γ and tumor necrosis factor α and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. **Blood** 1995; 85:3183-3190.
25. Rusten L, Jacobsen SE. Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Directly Inhibits Human Erythropoiesis In Vitro: Role of p55 and p75 TNF Receptors. **Blood** 1995; 85:889-996.
26. Maciejewski JP, Risitano AM, Sloand E M y col. A pilot study of the recombinant soluble human tumour necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein in patients with myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol** 2002; 117:119-126.
27. Boula A, Voulgarelis M, Giannouli S y col. Effect of cA2 Anti-Tumor Necrosis Factor-A Antibody Therapy on Hematopoiesis of Patients with Myelodysplastic Syndromes. **Clin Cancer Res** 2006; 12:3099-3108.
28. 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.
29. Deeg HJ, Gotlib J, Beckham C y col. Soluble TNF receptor fusion protein (etanercept) for the treatment of myelodysplastic syndrome: A pilot study. **Leukemia** 2002; 16:162-164.
30. Scott B, Ramakrishnan A, Fosdal M y col. Anti-thymocyte Globulin plus Etanercept as Therapy for Myelodysplastic Syndromes (MDS): a Phase II Study. **Br J Haematol** 2010; 149: 706-710.
31. Scott BL, Ramakrishnan A, Storer B y col. Prolonged responses in patients with MDS and CMML treated with azacitidine and etanercept. **Br J Haematol** 2010; 148:944-947.