

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Expresión de genes involucrados en el estrés oxidativo e inflamación en neoplasias hematológicas

Haro, Cecilia<sup>1,2</sup>; Casas Silva, María Jimena<sup>3</sup>; Agüero Aguilera, Ana Carolina<sup>1</sup>; Terán, Magdalena María<sup>1</sup>; Ledesma Achem, Miryam Emilse<sup>1</sup>; Mónaco, María Eugenia<sup>4</sup>; Issé, Blanca Alicia<sup>1</sup>; Lazarte, Sandra Stella<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Bioquímica Aplicada, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán (UNT). San Miguel de Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología Farmacéutica y Alimentaria (INBIOFAL), CONICET, UNT. San Miguel de Tucumán, Argentina.

<sup>3</sup>Hospital Presidente Néstor Kirchner, Ministerio de Salud Pública. San Miguel de Tucumán, Argentina.

<sup>4</sup>Instituto de Biología Dr. Francisco Barbieri, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. San Miguel de Tucumán, Argentina.

Contacto: Lazarte, Sandra Stella, Instituto de Bioquímica Aplicada, Balcarce 747 (CP4000), San Miguel de Tucumán, slazarte@fbqf.unt.edu.ar.

## Resumen

**Introducción:** varios estudios han encontrado evidencia de estrés oxidativo (EOx) crónico en las neoplasias hematológicas (NH). Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente asociado al EOx e inflamación en estas patologías, actualmente no está claro. **Objetivos:** analizar la expresión génica de enzimas antioxidantes y citoquinas inflamatorias y relacionarla con la expresión del gen Nrf2 en sujetos con NH. **Materiales y Métodos:** se realizó un estudio descriptivo entre junio de 2017 y mayo de 2018. Se evaluó la expresión génica de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxirredoxina-2 (PRX-2), IL-6, TNF- $\alpha$  y Nrf2 por Retrotranscripción-PCR tiempo real en células mononucleares de sangre periférica. **Resultados:** se analizaron 33 pacientes con NH y 22 controles sanos. Las NH detectadas, en orden de frecuencia, fueron: leucemias agudas 70 %, neoplasias linfoproliferativas (NLP) 12 %, síndromes mielodisplásicos (SMD) 9 % y neoplasias mieloproliferativas (NMP) 9 %. El grupo NH mostró disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la expresión de los genes de las enzimas y TNF- $\alpha$  en los grupos SMD, NLP y NMP. La expresión del gen Nrf2 estuvo fuertemente asociada con la expresión del gen PRX-2 [ $R^2 = 0,73$ ]. **Conclusiones:** estos hallazgos reforzarían las bases de un potencial vínculo entre la disminución de los antioxidantes y el incremento de EOx en las NH, además de señalar a Nrf2 como posible gen regulador del sistema antioxidante.

**Palabras clave:** neoplasias hematológicas, estrés oxidativo, inflamación, expresión génica.

## Abstract

**Introduction:** Several studies have found evidence of chronic oxidative stress (OxS) in hematologic neoplasia (HN). However, the underlying molecular mechanism associated with OxS and inflammation in these pathologies is currently unclear. **Objectives:** To analyze the gene expression of antioxidant enzymes and pro-inflammatory cytokines, and relate it to the expression of the Nrf2 gene in subjects with HN. **Materials and Methods:** A descriptive study was conducted between June 2017 and May 2018. Thirty-three HN patients and 22 healthy controls were studied. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxiredoxin-2 (PRX-2), IL-6, TNF- $\alpha$  and Nrf2 gene expression was evaluated by real-time RT-PCR in peripheral mononuclear blood cells. **Results:** The HN identified, in frequency order, were: acute leukemia 70%, lymphoproliferative neoplasms (LPN) 12%, myelodysplastic syndromes (MDS) 9% and myeloproliferative neoplasms (MPN) 9%. HN patients showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the expression of enzyme genes and TNF- $\alpha$  in MDS, LPN and MPN. Nrf2 gene expression showed strong association with PRX-2 gene expression [ $R^2 = 0.73$ ]. **Conclusions:** These findings strengthen the basis of a potential link between detoxifying enzymes and increased OxS levels in HN, besides showing Nrf2 as a possible regulatory gene of the antioxidant system.

**Keywords:** Hematological neoplasms; oxidative stress; inflammation; gene expression.

## Introducción

Las neoplasias hematológicas comprenden un grupo heterogéneo de trastornos neoplásicos clonales que surgen del tejido hematopoyético, el cual genera las progenies mieloides [granulocitos, monocitos- macrófagos- células dendríticas mieloides, plaquetas y eritrocitos] y las células linfoides [linfocitos B, T, NK y células dendríticas plasmacitoides]. Representan un amplio espectro de enfermedades, desde leucemias crónicas lentamente progresivas hasta leucemias agudas y linfomas de alto grado, y se encuentran entre los cánceres humanos más rápidamente progresivos. Al igual que con otros cánceres, el diagnóstico y la clasificación de las neoplasias hematológicas se han basado tradicionalmente en la morfología celular. Por el contrario, la clasificación basada en la patogénesis molecular, probablemente, sea más informativa, proporcione una mejor estratificación pronóstica y oriente el tratamiento dirigido. Los avances en las tecnologías genómicas ahora lo hacen posible [1]. Durante décadas, la idea general de las terapias contra el cáncer fue erradicar un porcentaje tan alto como fuera posible de las células tumorales, aplicando la dosis máxima tolerada de un agente tóxico. Una de las observaciones inmediatas fue, sin embargo, que incluso una gran reducción del contenido de células cancerosas en el organismo del paciente puede ser transitoria y puede producirse una recurrencia posterior [2]. Por lo tanto, es importante el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir las neoplasias hematológicas, las cuales deberían basarse en el conocimiento de los distintos factores que participan en el complejo proceso de la leucemogénesis.

En muchos tipos de cáncer se ha encontrado evidencia de estrés oxidativo (EOx) crónico, incluyendo varias neoplasias hematopoyéticas como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemias mieloides que, a su vez, comprenden la leucemia mieloide crónica (LMC) y la leucemia mieloide aguda (LMA). Existen pruebas de que las especies reactivas de oxígeno (EROS) derivadas de tumor podrían promover la supervivencia celular, la migración y metástasis, la proliferación e incluso, la resistencia a las drogas, dependiendo del origen del cáncer. Por otro lado, la producción en exceso de EROS está vinculada a la inflamación no resuelta, debido a que, al reaccionar covalentemente con moléculas de muy diversa índole, dañan los tejidos y pueden llevar a la necrosis celular y tisular. Por ello, la resolución de la inflamación y la supervivencia dependen en gran medida de los mecanismos de remoción de las EROS [3]. Varios estudios han demostrado que el factor de transcripción Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) contribuye al proceso antiinflamatorio, regulando el reclutamiento de células inflamatorias y la expresión génica a través de elementos de respuesta antioxidante [4].

Las EROS desempeñan acciones tanto positivas como negativas en la proliferación y supervivencia de una célula. Esta doble naturaleza ha sido explotada por las células leucémicas para promover su crecimiento, supervivencia e inestabilidad genómica. Actualmente, está bien reconocido que las EROS y los radicales libres producidos por el metabolismo del oxígeno

son iniciadores y promotores importantes de la carcinogénesis y contribuyen a la progresión del tumor. Las EROS son generadas principalmente por la mitocondria, el retículo endoplásmico y la NADPH oxidasa unida a la membrana [5]. Las células normales regulan el contenido intracelular de EROS, balanceando la generación de EROS y los sistemas depuradores. Juntas, la producción de EROS y la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes constituyen el control redox primario de las células leucémicas [6]. Entre las principales enzimas antioxidantes, se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxirredoxina. La superóxido dismutasa fue una de las primeras enzimas antioxidantes caracterizadas y es capaz de dismutar dos aniones superóxido en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ). La catalasa, una enzima hemo que cataliza la reacción que convierte dos moléculas de  $H_2O_2$  en  $O_2$  y dos moléculas de agua ( $H_2O$ ), es responsable de la desintoxicación de diversos fenoles, alcoholes y peróxido de hidrógeno. Las peroxirredoxinas son una familia de seis isoenzimas capaces de reducir hidroperóxidos de alquilo y  $H_2O_2$  a su correspondiente alcohol o  $H_2O$  [7].

Estudios recientes han revelado que Nrf2 regula la expresión de enzimas desintoxicantes y los genes antioxidantes que protegen las células de varias lesiones, a través de sus efectos antiinflamatorios, influyendo así en el curso de la enfermedad [8]. Nrf2 es referido como el “regulador maestro” de la respuesta antioxidante, que modula la expresión de cientos de genes que, aparentemente, controlan procesos no relacionados, tales como la respuesta inmune e inflamatoria, la remodelación y la fibrosis de tejido, la carcinogénesis y la metástasis e incluso, la disfunción cognitiva y la conducta adictiva [9].

En el proceso inflamatorio que acompaña a las neoplasias hematológicas, intervienen varias citoquinas, entre las cuales se destacan TNF- $\alpha$  e IL-6. TNF (*tumor necrosis factor*) ha sido señalado como el principal regulador de la inflamación y un agente clave en la red de citoquinas. TNF (también conocido como TNF- $\alpha$ ) fue reconocido como una molécula de comunicación intercelular singularmente poderosa, con funciones cruciales y no redundantes en la inmunidad innata y adaptativa [10]. La IL-6 (interleuquina 6) es una citoquina pleiotrópica que participa de varias funciones biológicas, tales como la regulación del sistema inmune, los procesos regenerativos, el metabolismo, la homeostasis ósea, la protección cardiovascular y la función neural. Esta citoquina está implicada en la aparición y el desarrollo de varios estados de enfermedad, particularmente, de enfermedades inflamatorias autoinmunes y crónicas [11].

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

El propósito de este estudio fue analizar la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido

**Tabla I.** Frecuencia y distribución de las neoplasias hematológicas.

Grupo	Diagnóstico	Edad* [años]	Sexo femenino	Sexo masculino
LA n = 23	LMA	33 (18 - 67)	2	10
	LLA	38 (21 - 60)	2	8
	LA bifenotípica	41	0	1
SMD N = 3	SMD	19 (18 - 21)	1	2
	Linfoma	72 (59 - 84)	0	2
NLP n = 4	LLC	65	0	1
	GMSI	52	0	1
NMP n = 3	LMC	63 (61 - 65)	0	2
	SMD/NMP	23	0	1

► LA, leucemia aguda; LMA, leucemia mieloide aguda; LLA, leucemia linfocítica aguda; SMD, síndrome mielodisplásico; NLP, neoplasia linfoproliferativa; LLC, leucemia linfática crónica; GMSI, gammapatía monoclonal de significado incierto; NMP, neoplasia mieloproliferativa; LMC, leucemia mieloide crónica; \*mediana y rango.

dismutasa (SOD) y peroxirredoxina-2 (PRX-2) y de los genes de proteínas inflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y relacionarla con los niveles de expresión del gen Nrf2 en sujetos con neoplasias hematológicas en la provincia de Tucumán.

## Materiales y métodos

### Diseño, población y muestra

Se realizó un estudio exploratorio descriptivo entre junio de 2017 y mayo de 2018 en el Instituto de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Se incluyeron pacientes con diagnóstico de neoplasia hematológica, que fueron diagnosticados en los Servicios de Hemato-Oncología de 2 hospitales pertenecientes al sistema provincial de Salud de la provincia de Tucumán, Hospital Presidente Néstor Kirchner y Hospital Centro de Salud Zenón Santillán. Los individuos sanos fueron reclutados en el Instituto de Bioquímica Aplicada mediante invitación oral, y eran estudiantes o empleados de la UNT en su gran mayoría.

Los criterios de inclusión fueron mujeres y hombres con edad  $\geq 16$  años con diagnóstico de neoplasia hematológica que no estaban recibiendo tratamiento anti-neoplásico, debido a que la quimioterapia provoca formación de EROS. Los sujetos saludables debían ser  $\geq 18$  años y poseer un hemograma normal. Los criterios de exclusión fueron la presencia de diabetes, enfermedad coronaria, artritis reumatoidea, dislipemia, hipertensión, malignidades, hepatopatía crónica, o disfunción renal.

La muestra fue intencional de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión. La unidad de análisis fue cada paciente y sujeto sano que cumplió con los criterios de inclusión y que fue estudiado mediante una muestra de sangre obtenida con EDTA-K<sub>2</sub> para realizar el análisis molecular.

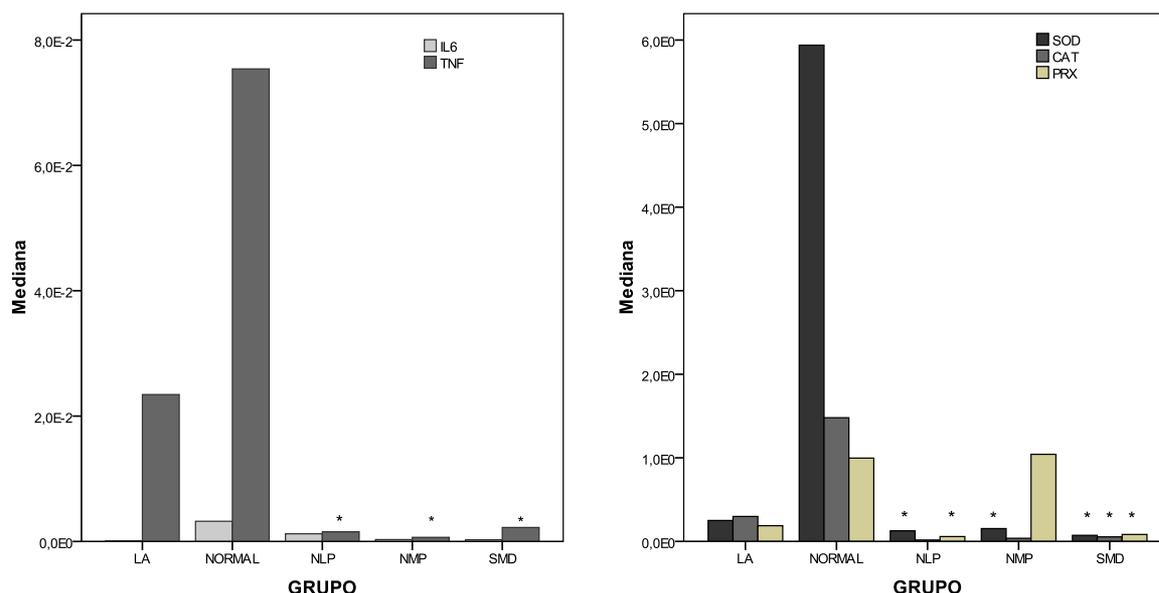
### Estudios hematológicos y del inmunofenotipo

El diagnóstico de NH se realizó en los Servicios de Hemato-Oncología de cada hospital. El hemograma automatizado se efectuó en contadores hematológicos (Sysmex KX-21N y Abbott Cell-Dyn Ruby). Los blastos fueron cuantificados mediante recuento manual en frotis teñidos con coloración May-Grünwald Giemsa. Las técnicas citológicas de mieloperoxidasa (MPO) y ácido periódico de Schiff (PAS) siguieron el protocolo de Swirsky y Bain [12]. El inmunofenotipo fue efectuado en citómetro de flujo de ocho colores BD FACSCAN-TO™ II (BD Biosciences) que posee 3 láseres. Los principales marcadores de linaje de las distintas series usados fueron:

- Linaje B: CD22, CD79a (c), Ig sup, C $\mu$  y CD19.
- Linaje T: CD3 m/c, TCR, CD2, CD7 y CD5.
- Linaje dendrítico: CD123, CD11c, HLA-DR.
- Linaje mieloide: MPO, CD13, CD33, CD65, CD117, CD15.
- Linaje monocitoide: CD14, CD64, CD33, HLA-DR, CD35, IREM
- Linaje megacarioblástico: CD41a, CD42b y CD61.
- Linaje eritroide: CD71, CD36, CD105

El diagnóstico y clasificación de las NH se realizó sobre la base de los criterios de clasificación de neoplasias linfoides y de neoplasias mieloides y leucemias agudas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016 [13,14]. Las mismas se categorizaron de la siguiente manera, para el estudio estadístico comparativo:

- Grupo leucemias agudas, LA (incluyó LMA y LLA)
- Grupo SMD
- Grupo neoplasias linfoproliferativas, NLP
- Grupo neoplasias mieloproliferativas, NMP [incluyó leucemia mieloide crónica (LMC) y SMD/NMP].

**Figura 1.** Expresión de los genes de enzimas antioxidantes y de proteínas inflamatorias en la población estudiada.

► LA, leucemia aguda; SMD, síndrome mielodisplásico; NLP, neoplasia linfoproliferativa; NMP, neoplasia mieloproliferativa; CAT, catalasa; SOD, superóxido dismutasa; PRX, peroxirredoxina-2; TNF, factor de necrosis tumoral alfa; IL-6, interleuquina-6; \*p < 0,05 con respecto al grupo control.

### Estudios moleculares

La expresión de los genes de CAT, SOD, PRX-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , y Nrf2 se analizó por Retrotranscripción-PCR tiempo real (RT-qPCR). Para la comparación relativa de los niveles de expresión del ARNm de estos genes, los datos obtenidos a partir de la PCR tiempo real se normalizaron con respecto a la expresión del gen de la gliceraldehído 6 -fosfato deshidrogenasa (GAPDH) [cuantificación relativa]. El punto final cuantitativo para la PCR en tiempo real es el ciclo umbral (Ct, del inglés *threshold cycle*). El Ct se define como el ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia aumenta significativamente con respecto a la fluorescencia basal.

Se obtuvo ARN de glóbulos blancos de sangre entera anticoagulada con EDTA-K<sub>2</sub>, empleándose Trizol para la extracción (protocolo de INVITROGEN). La PCR, las curvas de *melting* (disociación) y su análisis posterior se realizaron en el equipo COBAS z480 (Roche). Los amplicones fueron sometidos a un análisis de temperatura de *melting* para establecer la especificidad de los fragmentos amplificados y la identidad de los mismos. Los cebadores y condiciones de la PCR se tomaron de Franco *et al* [15] (CAT y PRDX-2), Rybicka *et al* [16] (SOD-2), Macari y Lowrey [17] (Nrf2), y Han *et al* [18] (IL-6 y TNF-alfa). La expresión génica se calculó con la siguiente fórmula:

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

### Consideraciones éticas

Se obtuvo un consentimiento informado y asentimiento (en el caso de los menores de edad) de todos los pacientes para el uso de los resultados obtenidos y se garantizó el anonimato y confidencialidad de los mismos. Ambos documentos, el con-

sentimiento y el asentimiento, fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán.

### Análisis de los resultados

El estudio estadístico se realizó mediante el Programa Estadístico SPSS 23.0 (Chicago, USA). Los parámetros hematológicos y los niveles de expresión génica se indicaron como mediana y rango, y se compararon mediante la prueba U de Mann Whitney. Las pruebas se realizaron con un nivel de significación de p < 0,05. La influencia de los niveles de expresión del gen de Nrf2 sobre los genes de las enzimas antioxidantes y de las proteínas inflamatorias, independiente del grupo (NH o control), fue evaluada por análisis de regresión simple.

### Resultados

Durante el período analizado se estudiaron 33 pacientes (28 hombres y 5 mujeres) con diagnóstico de neoplasia hematológica (NH) y 22 sujetos aparentemente sanos (9 hombres y 13 mujeres). La NH más frecuente fue la leucemia aguda [Tabla I]. Se detectaron 3 casos de LMA-M2, 3 de LMA-M3, 1 de LMA-M4, 1 LA bifenotípica y en 5 casos, no se pudo clasificar la LMA por falta de datos. Las LLA fueron todas a células B (LLA-B). La reacción de MPO fue positiva en el 92% (11/12) de las LMA, mientras que el PAS fue positivo en el 70% (7/10) de las LLA.

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

Los grupos LA, SMD y NMP presentaron valores similares de hemoglobina y recuento de plaquetas. Sin embargo, solo

**Tabla II.** Parámetros hematológicos y expresión de Nrf2 de la población analizada.

Grupo NH	Hemoglobina [g/l]	Leucocitos [x 10 <sup>9</sup> /l]	Plaquetas [x 10 <sup>9</sup> /l]	Blastos en SP [%]	Blastos en MO [%]	Nrf2
LA	82*† (49-100)	14,0 (1,5-118,0)	26*† (2-124)	38 (1-89)	52 (20-96)	0,25 (0,007-0,13x10 <sup>6</sup> )
SMD	80 (72-130)	4,6 (0,7-24,0)	26 (17-290)	22 (0-40)	2 (1-15)	0,075 (0,02-0,11)
NLP	107 (90-138)	11,5 (4,5 - 62,0)	136 (89-307)	0	0	0,10 (0,02-0,23)
NMP	85 (75-145)	67,0* (19,0 - 70,0)	34 (16-430)	5 (2-12)	0 (0-6)	0,079 (0,076x10 <sup>-4</sup> -1,12)
Grupo control	125 (107-161)	7,0 (4,6-9,7)	222 (161-442)	0	0	1,10 (1,3 x 10 <sup>-8</sup> -5,78)

► NH, neoplasia hematológica; LA, leucemia aguda; SMD, síndrome mielodisplásico; NLP, neoplasia linfoproliferativa; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SP, sangre periférica; MO, médula ósea; \*p < 0,05 con respecto al grupo control; †, p < 0,05 con respecto al grupo NLP.

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

El análisis citogenético detectó el gen de fusión BCR/ABL en 4 LLA-B [translocación t(9;22)], la delección [5] en LA bifotípica, t(15,17) en 2 LMA promielocíticas, la t(11;14) en un linfoma, la inversión del cromosoma 9 en una LLA y la delección [11] en una LMA. El análisis comparativo entre los grupos de pacientes con y sin alteración cromosómica no encontró diferencias significativas en el nivel de expresión de las enzimas antioxidantes y citoquinas inflamatorias ( $p > 0,05$ ).

Los sujetos con NH presentaron una disminución significativa de la expresión génica de PRX-2 ( $p = 0,014$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,018$ ) y SOD ( $p = 0,003$ ) con respecto al grupo control. El análisis comparativo entre los grupos NH mostró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la expresión de los genes de las 3 enzimas y de TNF- $\alpha$  en los SMD; de SOD, PRX-2 y TNF- $\alpha$  en NLP; y de SOD y TNF- $\alpha$  en NMP (Figura 1). La comparación entre el grupo LA y el grupo control no detectó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes y las citoquinas y cuando se compararon los sujetos con LMA y aquellos con LLA se obtuvieron resultados similares.

El nivel de expresión del gen de Nrf2 demostró un alto grado de asociación con los niveles de expresión del gen de la PRX-2 ( $R^2 = 0,73$ ), mientras que presentó una correlación baja, pero significativa ( $p < 0,05$ ), con la expresión del resto de los genes ( $R^2$  CAT = 0,26;  $R^2$  SOD = 0,29;  $R^2$  TNF- $\alpha$  = 0,26;  $R^2$  IL-6 = 0,25)

## Discusión

El EOx puede ser consecuencia de niveles disminuidos de antioxidantes o de las enzimas antioxidantes o de defectos en la maquinaria de expresión de los genes antioxidantes. Este estudio fue realizado para evaluar la expresión de los genes de enzimas antioxidantes y de citoquinas inflamatorias en pacientes con neoplasias hematológicas. Los genes que controlan la homeostasis redox son participantes importantes en la patogénesis de múltiples tipos de cáncer. La iniciación y progresión del cáncer se ha relacionado con el EOx, el cual provoca aumento de las mutaciones del ADN o induce daño en el ADN, inestabilidad del genoma y proliferación celular. Sin embargo, los niveles aumentados de EROS también pueden promover señales antitumorígenicas, lo que resulta en un aumento del EOx y la inducción de la muerte de las células cancerosas [19]. Para controlar el equilibrio entre la producción y la eliminación de EROS, existe una variedad de enzimas de reparación del ADN, aunque los antioxidantes son más específicos y eficientes para proteger las células de los radicales. Este sistema antioxidante incluye tanto antioxidantes endógenos y exógenos como enzimáticos y no enzimáticos. Las células leucémicas, frecuentemente, alteran la expresión y la actividad de una variedad de vías antioxidantes, entre ellas, las enzimas depuradoras SOD, CAT y PRX-2 [6]. Los reportes al respecto son discordantes, ya que algunos informan aumento de la expresión génica de las enzimas, mientras que otros la encuentran disminuida.

En el presente trabajo, no se observaron cambios en el nivel de expresión de los genes de CAT, SOD y PRX-2 en los individuos con LA respecto de los sujetos saludables. Por el contrario, el análisis proteómico de pacientes con LMA reveló un incremento significativo de CAT y PRX, con diferencias significativas entre LMA-M1 y LMA-M2 [20,21]. En concordancia, los sujetos con

LMA exhibieron un aumento de la expresión del gen CAT y PRX-2 con respecto a voluntarios sanos, pero cuando se comparó LMA-M1 con LMA-M2 hubo una parcial coincidencia, ya que solo se verificó incremento en el gen CAT [22]. Asimismo, los autores detectaron una correlación entre el alto nivel de expresión de CAT con una respuesta positiva al tratamiento de la LMA [22]. Por lo tanto, aparentemente, la expresión génica varía de acuerdo con el subtipo de LMA y las diferencias observadas en este trabajo serían consecuencia de la falta de homogeneidad del grupo analizado. En pacientes con LLA, las publicaciones son contradictorias con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes, ya que en alguna de ellas la encuentran aumentada, y en otras, disminuida [23-25]. Distintos autores han reportado que existe una alteración de la expresión génica del sistema antioxidante en los linfocitos B de las neoplasias linfoproliferativas crónicas, pero en las LLA, dicho comportamiento aún no está claro.

El estudio actual detectó una disminución significativa en la expresión génica de una o todas las enzimas antioxidantes en SMD, NLP y NMP. La disminución de la expresión de SOD, CAT y PRX-2 podría provocar la acumulación de anión superóxido y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células leucémicas. Aparentemente, en el caso de las enfermedades hematopoyéticas malignas, el sistema antioxidante deteriorado parecería ser la causa principal subyacente a la acumulación de EROS. En cultivos de fibroblastos, la disminución de la actividad de SOD-2 aumentó la producción de anión superóxido y favoreció la proliferación celular [26]. Probablemente, la baja expresión de SOD estaría relacionada a una proliferación celular aberrante en estas patologías. Oltra *et al* [27] detectaron una disminución de la actividad enzimática de SOD y CAT en los linfocitos B de sujetos con LLC. Resultados contradictorios sobre la expresión génica de las moléculas antioxidantes han sido reportados en dicha patología. Jitschin *et al* [28] informaron un aumento de la expresión de CAT y una disminución de SOD en LLC, mientras que Cavallini *et al* [29] han identificado una baja expresión génica de CAT como un posible mecanismo productor de hipersensibilidad redox en los linfocitos B de un subgrupo de individuos con LLC, pero la expresión de SOD no se vio alterada. Dicha hipersensibilidad redox estaría vinculada a una menor capacidad antioxidante y constituiría una característica intrínseca de la LLC con un curso clínico indolente [29]. Probablemente, el grupo NLP analizado tiene características comunes con ellos.

En las NMP Philadelphia negativas se ha reportado una sobreexpresión del gen de PRX-2, y una disminución de la expresión de los genes de defensa antioxidante CAT y SOD-2 [30], lo cual en parte coincide con los presentes hallazgos. Por otro lado, Kazama *et al* [31] han comunicado que la expresión de PRX-2 estuvo aumentada en los neutrófilos del SMD denominado *citopenia refractaria con displasia multilineaje* (CRDM) en comparación con controles sanos. La diferencia con este último podría deberse a que no se incluyó ningún caso de CRDM en este estudio.

Se ha informado que Nrf2 controla los genes de muchas enzimas citoprotectoras, incluidas SOD y CAT [32-34]. Ese efecto fue observado en nuestros resultados, aunque la asociación de-

tectada fue débil. Sin embargo, Glorieux *et al* [35] afirman que la relación CAT/Nrf2 está sujeta a controversia, debido a que en los promotores del gen CAT no se encontraron secuencias ARE (*antioxidant response element*), que son indispensables para la acción de Nrf2 [36]. Con respecto a SOD, estudios recientes han revelado una regulación del EOX a través del aumento de la actividad de SOD, mediante la vía de señalización de Nrf2 [37,38]. Por otro lado, la expresión del gen de Nrf2 demostró una fuerte asociación con la expresión del gen de la PRX-2. En un modelo murino de  $\beta$ -talasemia, Mate *et al* [39] han comunicado que los efectos de PRX-2 en respuesta al EOX están mediados por la activación de Nrf2. También PRX-1 y PRX-6, otros miembros de la familia de las peroxirredoxinas, han sido reportadas como proteínas inducibles por EOX y reguladas por Nrf2 [40].

El papel de la inflamación en el inicio y la progresión de muchos tumores sólidos está bien establecido [41], sin embargo, la comprensión de cómo la inflamación promueve la iniciación y la progresión de neoplasias hematológicas es un campo emergente. El análisis de la expresión de los genes de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  reveló una disminución significativa de este último en SMD, NLP y NMP y no detectó variaciones de IL-6 en ninguno de los grupos bajo estudio. Según algunos autores, una sobreproducción de TNF- $\alpha$  e IL-6 se observa con mayor frecuencia en pacientes con neoplasias mieloides, lo que sugiere que estas citoquinas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y/o manifestaciones de la malignidad hematológica [41,42]. En coincidencia con el trabajo actual, Farsani *et al* [43] no encontraron diferencia significativa en el nivel de expresión de IL-6 entre pacientes con LLA y voluntarios sanos, pero detectaron una disminución de la expresión de IL-6 en el grupo de pacientes que presentaron las translocaciones t(12;21), t(9;22), t(1;19) y t(4;11). Este último hecho no se verificó en el presente análisis, probablemente, debido al diferente espectro de alteraciones detectadas. En pacientes con LMA, se ha reportado que niveles elevados de IL-10 y disminuidos de IL-6 se correlacionaron con una mayor supervivencia del paciente [39]. Con respecto a TNF- $\alpha$ , Zhang *et al* [42] han reportado un incremento de su expresión génica en líneas celulares leucémicas y en pacientes con LLA y LLC. La inconsistencia con los resultados actuales indica que son necesarios más estudios para dilucidar la participación de las citoquinas en el proceso neoplásico hematológico.

El presente trabajo tiene limitaciones, como un tamaño de muestra relativamente pequeño y la falta de medida de la actividad enzimática de CAT, PRX-2 y SOD, así como del nivel sérico de las citoquinas. Asimismo, la heterogeneidad del grupo ensayado dificultó la interpretación de los resultados. Debido al pequeño número de participantes en los grupos SMD, NLP y NMP, los resultados obtenidos son apenas un indicio de lo que realmente ocurre en estas patologías y son necesarios más exámenes del perfil génico para confirmar nuestras observaciones.

En general, el papel de la activación de Nrf2 en el cáncer es paradójico y requiere una exploración más profunda. Si bien Nrf2 se considera uno de los elementos citoprotectores más importantes contra el EOX y se ha postulado como un gen

supresor tumoral, las células cancerígenas también podrían adoptar las propiedades protectoras de Nrf2 contra las agresiones oxidativas para generar un microambiente prosupervivencia que conduzca al desarrollo de tumores y a la resistencia a los medicamentos [45-47].

El estudio reveló una disminución de la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes y de TNF- $\alpha$  en algunas de las NH, y la expresión de Nrf2 se asoció a la de PRX-2, CAT y SOD. Los hallazgos proporcionan evidencia de que un sistema antioxidante deteriorado podría provocar la acumulación de radicales libres y generaría una anomalía en el metabolismo oxidativo de pacientes con NH. La regulación terapéutica de la expresión de Nrf2 podría ser una futura e importante herramienta en el control de la progresión de las hemopatías malignas. Futuros estudios deberían enfocarse en definir el comportamiento de estos genes en cada uno de los distintos subtipos de neoplasia hematológica, con el objeto de esclarecer el verdadero rol de las enzimas antioxidantes y proteínas inflamatorias en dichos procesos patológicos.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio Tucumán y a su Director, Bioquímico Especialista Guillermo Fabián Vechetti, por el préstamo de su equipamiento para la realización de las técnicas de biología molecular.

#### Declaración de conflicto de intereses

No hubo conflictos de intereses durante la realización del estudio.

#### Fuente de financiamiento

El presente trabajo de investigación fue realizado con el apoyo de la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la UNT, PIUNT D644/3, y por las Becas Salud Investiga "Dr. Abraham Sonis", categoría individual, otorgadas por el Ministerio de Salud de la Nación.

#### Referencias bibliográficas

- Jakobsen NA, Vyas P. From genomics to targeted treatment in haematological malignancies: a focus on acute myeloid leukaemia. *Clin Med [Lond]* 2018; 18(2): s47-s53.
- Zagozdzon R, Golab J. Cancer stem cells in haematological malignancies. *Contemp Oncol [Pozn]* 2015; 19 (1A): A1-6.
- Pavón Romero L, Jiménez Martínez MC, Garcés Álvarez ME. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. 1ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Health, México, 2016; pp: 106-10.
- Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 Signaling Pathway: Pivotal Roles in Inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2016; pii: S0925-4439(16)30286-1.
- Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood* 2011; 117 (22): 5816-26.
- Irwin ME, Rivera-Del Valle N, Chandra J. Redox control of leukemia: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18 (11): 1349-83.
- Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis CD, Marinari UM, et al. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 6235641.
- Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, et al. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290 (5): H1862-70.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutases: you've come a long way, baby. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20 (10): 1548-9.
- Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(5): 361-71.
- Schett G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology [Oxford]* 2018; 57(suppl\_2): ii43-ii50.
- Swirsky D, Bain BJ. Erythrocyte and leucocyte cytochemistry. En: Lewis M, Bain BJ, Bates I. *Dacie y Lewis. Hematología Práctica*. 10<sup>th</sup> ed. Madrid: Elsevier, 2008: 311-33.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127 (20): 2375-90.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391-405.
- Franco SS, De Falco L, Ghaffari S, Brugnara C, Sinclair DA, Matte' A, et al. Resveratrol accelerates erythroid maturation by activation of FoxO3 and ameliorates anemia in  $\beta$ -thalassemic mice. *Haematologica* 2014; 99(2): 267-75.
- Rybicka M, Stachowska E, Gutowska I, Parczewski M, Baszkiewicz M, Machalinski B, et al. Comparative effects of conjugated linoleic acid (CLA) and linoleic acid (LA) on the oxidation status in THP-1 macrophages. *J Agric Food Chem* 2011; 59 (8): 4095-10.
- Macari ER, Lowrey CH. Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. *Blood* 2011; 117(22): 5987-97.
- Han X, Han Y, Jiao H, Jie Y. 14-3-3 $\zeta$  regulates immune response through Stat3 signaling in oral squamous cell carcinoma. *Molecules and Cells* 2015; 38 (2): 112-21.
- Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 80: 50-64.
- López-Pedraza C, Villalba JM, Siendones E, Barbarroja N, Gómez-Díaz C, Rodríguez-Ariza A, et al. Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics* 2006; 6 Suppl 1: S293-9.
- Luczak M, Kazmierczak M, Handschuh L, Lewandowski K, Komarnicki M, Figlerowicz M. Comparative proteome analysis of acute myeloid leukemia with and without ma-

- turation. *J Proteomics* 2012; 75(18): 5734-48.
22. Handschuh L, Kazmierczak M, Milewski MC, Góralski M, Luczak M, Wojtaszewska M, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. *Int J Oncol* 2018; 52(3): 656-78.
  23. Ben Mahmoud L, Mdhaffar M, Ghozzi H, Ammar M, Hakim A, Atheymen R, et al. Oxidative Stress in Tunisian Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Involvement in Leukemic Relapse. *J Pediatr Hematol Oncol* 2017; 39(3): e124-30.
  24. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado PA, et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem* 2008; 41(7-8): 511-8.
  25. Naz A, Shamsi TS, Sattar A, Mahboob T. Oxidative stress and total antioxidant status in acute leukemia at diagnosis and post remission induction phase. *Pak J Pharm Sci* 2013; 26(6):1123-30.
  26. Sarsour EH, Venkataraman S, Kalen AL, Oberley LW, Goswami PC. Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth. *Aging Cell* 2008; 7(3): 405-17.
  27. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxodG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(11): 1286-92.
  28. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, Giessler A, Bricks J, Berger J, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 123(17): 2663-72.
  29. Cavallini C, Chignola R, Dando I, Perbellini O, Mimiola E, Lovato O, et al. Low catalase expression confers redox hypersensitivity and identifies an indolent clinical behavior in CLL. *Blood* 2018; 131(17): 1942-54.
  30. Hasselbalch HC, Thomassen M, Riley CH, Kjær L, Larsen TS, Jensen MK, et al. Whole blood transcriptional profiling reveals deregulation of oxidative and antioxidative defense genes in myelofibrosis and related neoplasms. Potential implications of downregulation of Nrf2 for genomic instability and disease progression. *PLoS One* 2014; 9(11): e112786.
  31. Kazama H, Teramura M, Kurihara S, Yoshinaga K, Kato T, Motoji T. Peroxiredoxin 2 expression is increased in neutrophils of patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia. *Br J Haematol* 2014; 166(5): 720-8.
  32. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 1998; 17(24): 3145-56.
  33. Yama K, Sato K, Murao Y, Tatsunami R, Tampo Y. Epalrestat Upregulates Heme Oxygenase-1, Superoxide Dismutase, and Catalase in Cells of the Nervous System. *Biol Pharm Bull* 2016; 39(9): 1523-30.
  34. Zhu H, Jia Z, Zhang L, Yamamoto M, Misra HP, Trush MA, et al. Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233(4): 463-74.
  35. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med* 2015; 87: 84-97.
  36. Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863(2): 585-97.
  37. Li H, Shi Y, Wang X, Li P, Zhang S, Wu T, et al. Piceatannol alleviates inflammation and oxidative stress via modulation of the Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathways in diabetic cardiomyopathy. *Chem Biol Interact* 2019: 108754.
  38. Zhang M, Teng CH, Wu FF, Ge LY, Xiao J, Zhang HY, et al. Edaravone attenuates traumatic brain injury through anti-inflammatory and anti-oxidative modulation. *Exp Ther Med* 2019; 18(1): 467-74.
  39. Matte A, De Falco L, Iolascon A, Mohandas N, An X, Siciliano A, et al. The interplay between peroxiredoxin-2 and nuclear factor-erythroid 2 is important in limiting oxidative mediated dysfunction in  $\alpha$ -thalassemic erythropoiesis. *Antioxid Redox Signal* 2015; 23(16): 1284-97.
  40. Park MH, Jo M, Kim YR, Lee CK, Hong JT. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* 2016; 163: 1-23.
  41. Craver BM, El Alaoui K, Scherber RM, Fleischman AG. The critical role of inflammation in the pathogenesis and progression of myeloid malignancies. *Cancers (Basel)* 2018; 10(4).
  42. Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, Gayoso I, Arcos MJ, Bañas H, et al. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine* 2013; 61(3): 885-91.
  43. Farsani MA, Kamel M, Mehrpouri M, Heris RS. The expression of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and interleukin 6 (IL6) in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Pathol Oncol Res* 2018; 3: 555-59.
  44. Zhang S, Zhang K, Yin J, Wu X. Overlapped differentially expressed genes between acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia revealed potential key genes and pathways involved in leukemia. *J Cell Biochem* 2019; 120(9): 15980-88.
  45. Rushworth SA, Macewan DJ. The role of Nrf2 and cytoprotection in regulating chemotherapy resistance of human leukemia cells. *Cancers (Basel)*. 2011; 3(2): 1605-21.
  46. Menegon S, Columbano A, Giordano S. The dual roles of Nrf2 in cancer. *Trends Mol Med*. 2016; 22(7): 578-93.
  47. Wu S, Lu H, Bai Y. Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Med*. 2019; 8(5): 2252-67.