



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

***“Concentraciones de HMGB1 en Plasma de
Pacientes con Síndrome Mielodisplásico: Estudio
Exploratorio”***

TESIS

Para optar por el grado de
Maestría en Ciencias Médicas

Presenta

Elia Apodaca Chávez

Tutor Principal

Dr. Sergio Iván Valdés Ferrer

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Ciudad de México, Octubre 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

1. Resumen ejecutivo.....	3
2. Marco teórico.....	6
• HMG y subtipos	
• HMGB1	
**Generalidades	
**Estructura de HMGB1	
**Funciones de sus cuatro localizaciones (nuclear, citoplasmática, membrana y extracelular)	
**Mecanismos de liberación (activo y pasivo)	
**Receptores en los que actúa	
• HMGB1 y cáncer	
• Síndrome mielodisplásico	
**Definición y Epidemiología	
**Clasificación de la OMS	
**Fisiopatología	
1) Genética en SMD	
2) Función inmune en SMD	
**Riesgo (generalidades)	
• HMGB1 y SMD	
3. Resumen del marco teórico.....	27
4. Planteamiento del problema.....	28
5. Justificación.....	28
6. Pregunta de investigación.....	28
7. Hipótesis.....	28
8. Objetivos.....	29
9. Material y métodos.....	29
10. Definición de variables.....	31
11. Tamaño de la muestra.....	32
12. Análisis estadístico.....	32
13. Resultados.....	33
14. Discusión y conclusiones.....	37
15. Bibliografía.....	41

Resumen

Título:

Concentraciones de HMGB1 en Plasma de Pacientes con Síndrome Mielodisplásico: Estudio Exploratorio

Marco teórico.

HMGB1 (acrónimo en inglés de *High-mobility group box 1*) es una de las principales HMGs (acrónimo en inglés de *High-mobility groups*), proteínas no histonas encargadas de la regulación de diversos procesos en el ADN; como formación de nucleosomas y permitir la función de múltiples factores de transcripción (p53 y p73). Es liberada por macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK) al medio extracelular, donde se comporta como uno de los principales DAMPs (del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*), participando activamente en el proceso inflamatorio crónico. Su expresión en los tejidos y la ubicación celular depende del tipo de tejido y del estímulo. Se sabe que se encuentra en grandes cantidades en el timo y bazo, es mayor en células mieloides que en linfoides, y está relacionada con su proceso de diferenciación. Su incremento en cáncer y disminución con la edad hace pensar que tiene un papel crítico en el desarrollo del mismo.

El síndrome mielodisplásico (SMD) es una enfermedad heterogénea caracterizada por la presencia de mutaciones y activación crónica del sistema inmune innato; no se sabe cuál de estos dos fenómenos ocurre primero y si la activación del sistema inmune innato provoca las mutaciones adquiridas con el tiempo.

Existen solamente dos estudios que describen la relación de HMGB1 en SMD; en el primero encontraron concentraciones de HMGB1 elevadas en el plasma de médula ósea de pacientes con SMD, sugiriendo que es el responsable del daño en la eferocitosis y de perpetuar el proceso inflamatorio por acción sobre los receptores tipo Toll (TLR)-4 de los macrófagos. En el segundo demostraron que HMGB1 se encuentra en las células progenitora de SMD CD34⁺ (HSC-SMD), y que su inhibición restaura la expresión de los TLRs, de su vía de señalización (NF- κ B); provocando reducción de la expansión de las UFC.

De aquí surgen la inquietud por saber si las concentraciones de HMGB1 se encuentran incrementadas en el plasma de sangre periférica de pacientes con SMD en comparación con otras fallas medulares (como son anemia aplásica (AA) y hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN); entidades que comparten características fisiopatológicas con SMD) y controles sanos. Así como evaluar si existen diferencias en las concentraciones de las citocinas (IL-1 β , IL-6, IL8 y TNF- α) que se producen cuando HMGB1 tiene efecto sobre los TLR.

Podemos plantearnos que en SMD al estar incrementada la apoptosis, los niveles de HMGB1 extracelular incrementan y este juega dos papeles, por un lado, sale de la célula disminuyendo los mecanismos de reparación, y por el otro, funciona como DAMPs incrementando la inflamación, lo que puede favorecer la expansión clonal.

Planteamiento del problema.

En los últimos años se ha progresado en el conocimiento de la biología del SMD; sin embargo, es poco lo que se sabe acerca del papel de HMGB1. Una de las áreas más estudiada en la patogénesis de SMD son las mutaciones que caracterizan a esta enfermedad. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la

activación crónica del sistema inmune innato juega un papel relevante; una de las moléculas que está relacionada con este proceso de inflamación crónica es HMGB1. Existe solo un estudio donde se ha considerado que HMGB1 se encuentra involucrada en la fisiopatología de SMD.

Justificación.

El síndrome mielodisplásico es una enfermedad que incrementa con la edad, la incidencia reportada en EE.UU. fue de 3-4/100 000 habitantes año, en mayores de 60 años tiene una incidencia de 7-35/100 000 habitantes año. Los pacientes con SMD tienen una supervivencia menor que la población de la misma edad sin SMD, menor calidad de vida y progresión a leucemia mieloide aguda. En la actualidad existen pocas opciones de tratamiento, ninguna de estas curativas.

Pregunta de investigación

¿Cuáles serán las concentraciones plasmáticas de HMGB1 en pacientes con SMD en comparación con AA, HPN y controles sin enfermedad hematológica?

Hipótesis

Nula. Las concentraciones plasmáticas de HMGB1 no estarán incrementados en pacientes con SMD con respecto a AA, HPN y controles sin enfermedad hematológica.

Alternativa. Las concentraciones plasmáticas de HMGB1 estarán incrementados en pacientes con SMD en comparación con AA, HPN y controles sin patología hematológica.

Objetivo primario. Determinar si las concentraciones plasmáticas de HMGB1 estarán incrementados en pacientes con SMD al compararlos con pacientes con AA, HPN y controles sin patología hematológica.

Material y métodos.

Incluimos pacientes mayores de 18 años de edad con el diagnóstico de SMD; en el grupo control pacientes con diagnóstico de AA, HPN y controles sin enfermedad hematológica ajustados por edad y género (± 5 años). Excluimos condiciones médicas que pudieran incrementar HMGB1 como: epilepsia, infección aguda o crónica, enfermedad reumática, falla cardíaca congestiva, infarto agudo miocárdico, insuficiencia renal crónica, enfermedad hepática y cáncer activo. Posterior a la firma del consentimiento informado, centrifugamos las muestras para separar el plasma en alícuotas y se congelaron hasta -80°C . Las concentraciones de HMGB1 se midieron por ELISA y las de las citocinas (IL-1 β , IL-6, IL8 y TNF- α) por multiplex (por duplicado).

Resultados.

Entre junio 2018 y septiembre 2019 fueron recolectadas: 66 muestras de pacientes con SMD, 27 de AA, 17 de HPN y 65 de controles sanos (sin enfermedad hematológica). Nosotros comparamos las concentraciones entre los diferentes grupos y observamos un incremento significativo en SMD ($p=0.0001$). Reportamos una correlación positiva entre las concentraciones de HMGB1 con IL-1 β ($r=0.43$, $p=0.0002$) e IL-8 ($r=0.57$, $p=0.0001$). Por grupo de riesgo de SMD las concentraciones de HMGB1 fueron mayores en el grupo de riesgo bajo y muy bajo comparado con intermedio/alto y muy alto ($p=0.046$). Encontramos concentraciones mayores de HMGB1 cuando comparamos SMD hipocelular vs AA ($p=0.006$).

Discusión y conclusiones.

Nuestras observaciones sugieren que HMGB1 esta incrementada en pacientes con SMD cuando se compara con personas sin enfermedad hematológica y otras fallas medulares. HMGB1 fue mayor en el grupo de riesgo bajo y muy bajo, lo que sugiere que la inflamación crónica se encuentra involucrada en la patogénesis de SMD. La observación de que las concentraciones de HMGB1 son mayores en SMD hipocelular vs AA sugiere que podría ser una herramienta diagnóstica.

Marco teórico

HMGs

Introducción

La complejidad genética, las variaciones fisiológicas y los factores ambientales provocan inestabilidad cromosómica, muerte celular no programada, diferenciación inadecuada y alteraciones en el metabolismo, todos ellos procesos centrales de la patogénesis en la enfermedad humana¹. El entendimiento de las bases moleculares de los procesos de la enfermedad es importante, debido a que permite el desarrollo de nuevos biomarcadores diagnósticos, y por lo tanto identificar nuevos blancos terapéuticos.

En 1973 fueron descubiertas un grupo de proteínas nucleares no histonas con alta movilidad en la electroforesis, llamadas HMG (acrónimo en inglés de *High-mobility group*). Existen tres tipos de familias: HMGB, HMGA, HMGN; de estas, HMGB1 es la más abundante y estudiada. HMGB1 censa y coordina la respuesta celular al estrés, es chaperona del ADN y protectora de la apoptosis; pero fuera de la célula es un prototipo de *alarmina* o **DAMP** (Damage Associated Molecular Pattern, por sus siglas en inglés). Estos DAMPs, en conjunto con las citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas, orquestan la respuesta inflamatoria e inmune¹.

El ADN tiene interacción con tres clases de proteínas que mantiene la estructura y la función cromosómica; las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), con carga predominantemente positiva, lo que permite su unión a la carga negativa del ADN, dando origen a la unidad fundamental del cromosoma, conocido como nucleosoma formado por 8 histonas y 147 pares de bases². La segunda clase de proteínas del cromosoma son menos abundantes y específicas de tejido; dentro de estas se encuentran las proteínas encargadas de la regulación del ADN y la tercera clase de proteínas del cromosoma son las HMG; relacionadas con procesos de desarrollo, diferenciación, edad y cáncer³.

Descubrimiento de las proteínas HMG

Ernest Johns, Graham Goodwin y Clive Sanders fueron los primeros en aislar, de la cromatina del timo de becerro, unas pequeñas proteínas que se movían con alta velocidad en el gel de poliacrilamida, de ahí que reciban el nombre de "High-mobility group"⁴. A través de múltiples estudios, se ha descubierto que las proteínas HMG de diversas especies deben de contar con las siguientes características:

- 1) Extraíble de la cromatina con NaCl 0.35M.
- 2) Solubles en ácido perclórico.
- 3) Pesar <30 kDa.
- 4) Movilidad rápida en gel de poliacrilamida.
- 5) Alta sensibilidad de sufrir modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, acetilación y poli-ADN-ribosilación.
- 6) Su expresión depende del tejido y del momento del desarrollo.

En general las proteínas HMG sirven como un factor de transcripción que regula la estabilidad genómica por interacción con nucleótidos, histonas, factores de transcripción y otras proteínas nucleares³.

Desde 2001, esta familia de proteínas se divide en tres grupos funcionales y estructurales principales. Algunas modificaciones en la secuencia hacen que los diferentes miembros tengan una función celular distinta (estos últimos llamados motivos funcionales):

- 1) HMGB: HMGB1, HMGB2 y el motivo funcional es el HMG-box.
- 2) HMGN: HMGN1, HMGN2 y el motivo funcional es el llamado dominio unido a nucleosoma NBD.
- 3) HMGA: HMGA1, HMGA2 y el motivo funcional es el llamado dominio unido al ADN en áreas ricas en AT, ATH (AT-hook).

HMG tiene la habilidad de reconocer estructuras del ADN independientemente de su secuencia a través de los motivos funcionales⁵.

Debido a que la molécula de interés en este estudio es HMGB1, nos enfocaremos en las características de dicha proteína.

HMGBs

Son proteínas altamente conservadas y tiene cuatro miembros (HMGB1, HMGB2, HMGB3 y HMGB4); de la HMGB1-4 contienen dos sitios de unión al ADN, llamados HMG-boxes A y B; de la HMGB1-3 tienen un extremo C-terminal ácido, HMGB4 carece de él. Cada HMG-box se une de forma no específica al ADN provocando cambios en su estructura. El extremo C-terminal se une a otras proteínas nucleares, regulando la afinidad de varias estructuras del ADN¹.

HMGB1

Generalidades

HMGB1, también conocida como anfoterina o HMG1, fue identificada inicialmente como una proteína asociada a la cromatina con un alto contenido de aminoácidos ácidos y básicos. Es una proteína nuclear presente en la mayoría de las células eucariontes (excepto en células anucleadas), cuya función es estabilizar la formación de los nucleosomas y ser intermediario de factores de transcripción de una gran variedad de genes. Es secretada por macrófagos, células dendríticas y células *natural killer* (NK) en respuesta al daño celular o proceso inflamatorio, por esto último es uno de los principales prototipos de los DAMPs⁶.

HMGB1 es una proteína con capacidad de movimiento de un organelo hacia el citoplasma en 1-2 segundos; esto le permite estar en el citosol, mitocondrias, lisosomas, membrana celular y espacio extracelular; su localización celular y los cambios de movimiento dependen del tipo de célula, tejido y señales de estrés. HMGB1 es variablemente expresada en los tejidos y los mayores niveles se han encontrado en el bazo y timo, su expresión es mayor en células mieloides que linfoides, y correlaciona con los estados de diferenciación de estas células⁷.

La expresión incrementada de HMGB1 en cáncer y una disminución en edad avanzada, sugiere un papel crítico en el desarrollo del cáncer⁸. HMGB1 es esencial para la vida, en estudios donde se ha eliminado

por completo de los ratones, estos mueren al poco tiempo del nacimiento, debido a la disminución de los receptores de glucocorticoide y la inhabilidad para usar el glucógeno en el hígado. Se ha demostrado que eliminar HMGB1 del páncreas, hígado y macrófagos de ratones, los hace más sensibles a pancreatitis, daño hepático por isquemia y sepsis, respectivamente¹.

El umbral de los requerimientos de HMGB1 en varios procesos biológicos es diferente y depende del tipo celular. En el núcleo, HMGB1 se asocia con actividades del ADN como replicación, reparación, recombinación, transcripción y estabilidad genómica. Además de su función nuclear, tiene un papel significativo en varios procesos extracelulares como: inflamación, inmunidad, crecimiento, proliferación y muerte celular. En su función extracelular, es un DAMP; alertando a la respuesta inmune, generando un incremento de células de la respuesta inflamatoria, células musculares lisas, mesangioblastos y células progenitoras; además suprime la actividad de los linfocitos T, células dendríticas y células endoteliales. Las células con actividad inmune (macrófagos, monocitos y células dendríticas) liberan HMGB1 como regulación positiva, permitiendo la actividad de HMGB1 sobre múltiples receptores. Además, HMGB1 persiste incrementada por largo tiempo en situaciones de estrés (como infecciones agudas o crónicas). Tiene de forma extracelular actividad sobre el crecimiento celular, antibacterianas y actividad mitótica. Su mecanismo de acción sobre los receptores, depende del estado de *redox* de su estructura. Más allá de su papel nuclear y extracelular, HMGB1 en el citoplasma se une a otras proteínas favoreciendo la autofagia^{1 9}.

Estructura de HMGB1

HMGB1 contienen dominios HMG box, estos últimos son los que se unen al ADN, y se caracterizan por tres alfa-hélices arregladas en una configuración en forma de L. HMGB1 es codificada en el locus 13q12-13. En su estructura primaria tiene 215 residuos de aminoácidos constituidos por tres dominios: dos dominios: box A (9-79aa) y B (89-162aa), y un extremo C-terminal formado por residuos de ácido glutámico y aspártico (186-215aa). Tiene en los dominios dos sitios de señales de localización nuclear [NLS1 (28-44aa) y NLS2 (179-185aa)]; los cambios de estos sitios son los que determinan su localización. De los residuos 150-183aa se une al receptor de productos glucosilados avanzados (*RAGE*, por sus siglas en inglés), del 89-108aa al TLR4 y del 7-74aa se une un dominio de p53, los dos para inflamación y el último transcripción genética (**figura 1**)¹.

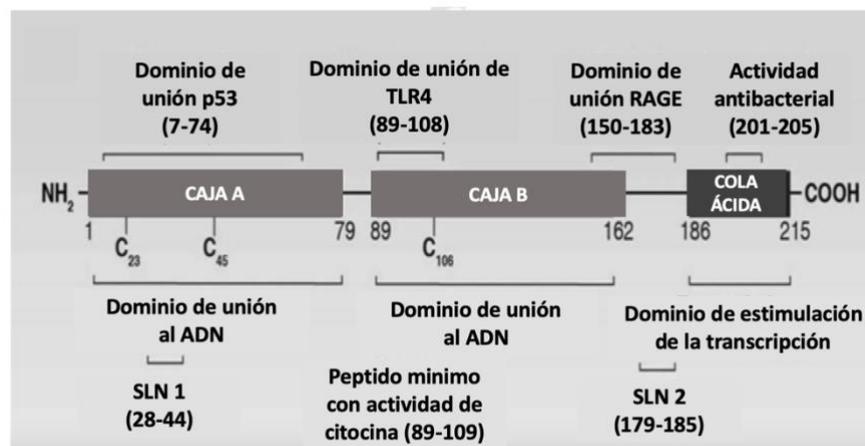


Figura 1. Estructura primaria de HMGB1. SLN, señales de localización nuclear.

El dominio A muestra una actividad anti-inflamatoria y el dominio B pro-inflamatoria. La capacidad pro-inflamatoria de este último dominio aumenta cuando se une a la cola ácida del extremo C-terminal. Los residuos 201-205 son los responsables de la actividad antibacteriana. El extremo C-terminal regula la unión de los dominios con el ADN por interacción intramolecular con los residuos de cisteína del extremo N-terminal, así como la interacción con las histonas 1 y 3 (H1 y H3). Al remover el residuo C-terminal disminuye la afinidad por el ADN y la proteína se libera de la célula; además la sobreexpresión de HMGB1 con la carencia del extremo C-terminal inhibe la expresión de varios genes (figura 1)¹.

La estructura secundaria tiene una forma de "L", constituida por tres alfa-hélices (I,II,III) y dos asas (I y II); el dominio A tiene un alto contenido en alfa hélices, está cargado positivamente y se encuentra entre las hélices I/II; el dominio B está definido por un número conservado de residuos aromáticos (fenilalanina, triptofano, lisina y tirosina), localizados en la unión de los dos brazos helicoidales. Los residuos básicos (lisina y arginina) son principalmente distribuidos en la superficie cóncava entre los dos brazos de las hélices, indicando que ahí es donde envuelven al ADN, sin considerar alguna secuencia específica; el modelo actual de la unión de HMGB1 al ADN sugiere que HMGB1 ayuda al remodelado de la cromatina de forma transitoria (figura 2)¹⁰.

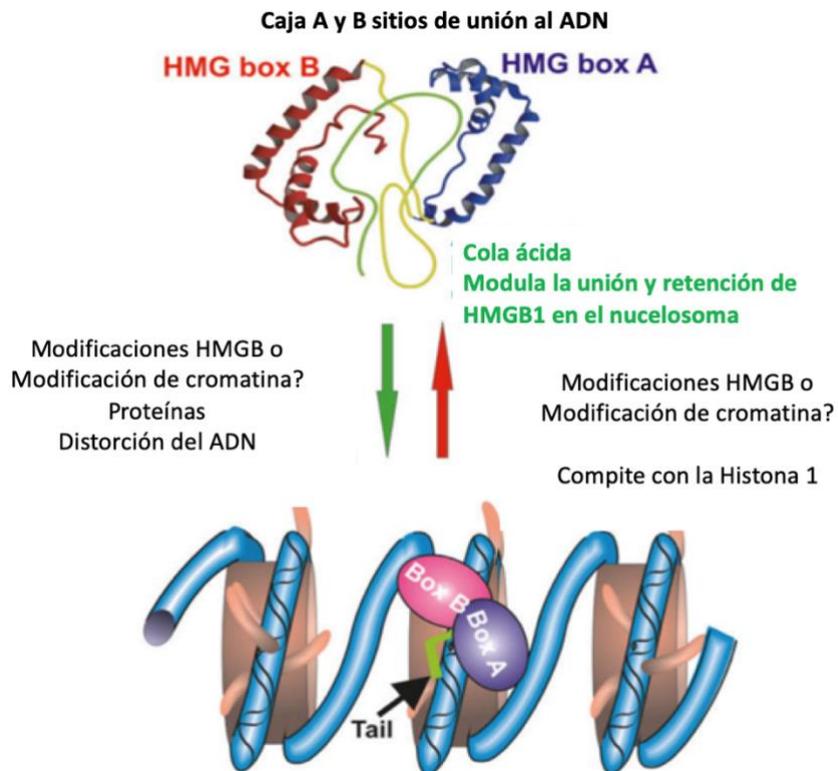


Figura 2. Estructura secundaria de HMGB1 y su interacción con la cromatina. Los factores que se muestran a la izquierda son los que favorecen la interacción de HMGB1 con la cromatina y los de la derecha la disociación de HMGB1 con la cromatina.

En la estructura terciaria las alfa hélices se compactan mediante interacciones de puentes de hidrógenos, interacciones hidrofóbicas y puentes de disulfuro. La unión de los dominios de HMGB1 con el extremo C-terminal es lo que mantiene la estructura terciaria. Tiene tres cisteínas en las posiciones 23, 45 y 106; entre la cisteína 23 y 45 se forma un puente de disulfuro por un proceso de oxidación, pero cuando HMGB1 pasa al citoplasma se pierde tal unión debido a la presencia de un ambiente reductor; cuando se sustituye una cisteína por serina en el sitio C106, permite que HMGB1 se trasloque del núcleo al citoplasma; por lo anterior tenemos dos formas de HMGB1: la oxidada y la reducida que interactúan con diferentes receptores y tienen una actividad diferente sobre el ADN; los cambios *redox* en el ambiente celular regulan su estructura, localización y función¹¹.

Función de HMGB1

****HMGB1 nuclear**

HMGB1 nuclear regula una serie de eventos en el ADN:

- 1) Estabilidad y deslizamiento del nucleosoma. HMGB1 se une a las histonas (H1 y H5), y a los sitios del ADN donde se une las histonas para protegerlo de la unión con las mismas; estos efectos de oposición permiten la estabilización y el deslizamiento del nucleosoma; por ejemplo, H1 disminuye la movilidad del nucleosoma, pero HMGB1 relaja al nucleosoma y hace que algunos sitios sean más accesibles; la interacción entre HMGB1-H1 facilita que se formen complejos ADN-proteínas, reacciones con el ADN y silenciamiento de genes (TNF- α)¹.
- 2) Número de nucleosomas y cromatización. Conforme avanza la edad el número de nucleosomas disminuye y el daño en el ADN incrementa, por eso la reprogramación del ADN con la edad y la integridad genética son blancos que permiten la iniciación del cáncer. Celona et al, demostraron que las células que carecen de HMGB1 contienen menos del 20-30% de histonas, nucleosomas y un mayor número de transcritos de ARN de genes inflamatorios como quimiocinas¹².
- 3) Unión al ADN. HMGB1 se une al ADN con una estructura específica, pero no con una secuencia específica. La habilidad de regular la actividad del ADN es mediada por sus dominios-box A, B y su extremo C-terminal. La unión de HMGB1 al ADN es regulada por las modificaciones post-traduccionales (fosforilación, acetilación y oxidación) o cationes (Mg⁺, Ca⁺⁺). Induce también cambios estructurales en el ADN, siendo uno de los más conocidos ADN modificado por cisplatino. El cisplatino induce la muerte celular al unirse al ADN (posición N7 de guaninas) inhibiendo su replicación y transcripción. HMGB1 se une con el ADN dañado por platinos; el dominio box A tiene mayor afinidad y este proceso puede ser regulado por el estado *redox*; por ejemplo, la reducción del dominio box A incrementa su afinidad 10 veces. HMGB1 inhibe la reparación del ADN dañado por platinos. La influencia del HMGB1 sobre la sensibilidad a platinos depende del tipo celular; por ejemplo, en cáncer de mama y ovario, las hormonas inducen a HMGB1 y estimulan a que éste favorezca la actividad antitumoral del cisplatino¹³.

- 4) Flexión del ADN. HMGB1 provoca cambios en la conformación del ADN; como ejemplo, puede aumentar la flexibilidad del mismo, haciendo que este forme un asa, con lo cual controla el inicio de la transcripción. También HMGB1 controla la estabilidad de los microsátélites del ADN¹⁴.
- 5) Recombinación VDJ. Proceso que nos permite tener la diversidad en los receptores de los linfocitos T y B. Es iniciada por activación de dos genes RAG-1 y RAG-2 (ambos con actividad nucleasa), los cuales reconocen secuencias de reconocimiento específicas (RSSs), que son cortadas por las nucleasas. La hebra que se corta forma una horquilla y los extremos rotos se unen con diversas proteínas involucradas en la respuesta al daño del ADN. HMGB1 juega un papel esencial en la recombinación VDJ porque forma complejos con RAG-RSS-HMG que incrementan la actividad de RAG-1 y RAG-2. Por eso se sabe que existe una interconexión con el desarrollo del repertorio inmune⁹.
- 6) Transcripción genética. HMGB1 es capaz de cambiar las vías de la transcripción y la expresión de varios genes por diferentes mecanismos: a) mantiene la dinámica y el número de nucleosomas; b) aumenta la interacción con la ARN polimerasa; y, c) actúa como un activador, potenciador, represor o silenciador de múltiples factores de transcripción. Dentro de los factores de transcripción se encuentran: receptores nucleares de esteroides, Hox, Sox, Oct, p53, p73, RB, NF-kB y receptor de estrógenos¹.
- 7) Replicación de ADN. En estudios con hígado de ratones se observó que HMGB1 altera la actividad de la ADN polimerasa, esto depende de las modificaciones post-traduccionales de HMGB1; la forma fosforilada disminuye la capacidad de polimerización y la acetilada incrementa la actividad^{1 9}.
- 8) Reparación del ADN. La tasa de reparación del ADN depende de varios factores, entre ellos los niveles de HMGB1 que juega un doble papel en el proceso de reparación y muerte celular. Con la muerte celular, los niveles de HMGB1 extracelular incrementan (por translocación del núcleo al citoplasma), provocando que disminuya su eficacia en la reparación del ADN. Las formas en las que participa en la reparación son:
 - **Reparación mediante la escisión de bases.**
 - **Reparación mediante escisión de un nucleótido.** Es un mecanismo de reparación importante cuando el ADN es dañado por efecto de los rayos UV y daño oxidativo. HMGB1 mediante la unión con ADN o con complejos de proteínas (XPC-RAD23B, XPA y RPA) encargadas de la escisión de nucleótidos, permite que se realice la reparación. En estudios con líneas celulares HMGB1^{-/-} se observa una disminución en la capacidad de reparación del ADN¹⁵.
 - **Reparación de la ruptura de doble cadena de ADN.** Existen dos formas de reparación de la ruptura de doble cadena: la unión terminal no homóloga y la recombinante homóloga; la primera se realiza por el reconocimiento y la unión de un heterodímero Ku70/Ku80, la cual recluta y sostiene a la ADN cinasa (DNA-PKs) al final de la cadena dañada para promover el proceso de reparación. In vitro, HMGB1 recombinante puede

activar a la DNA-PKs en ausencia de Ku y funciona como un componente regulador de la unión de la DNA-PKs al ADN incrementando la reacción de ligamiento de las cadenas de ADN¹⁶.

**HMGB1 en el citosol

HMGB1 se localiza en el citoplasma con una relación de 1:30 con respecto a HMGB1 nuclear. Se conoce que la HMGB1 nuclear trasloca hacia el citoplasma, lisosomas y mitocondrias cuando la célula es sometida a factores de estrés como citocinas, quimiocinas, hipoxia, H₂O₂ y oncogenes. Su función en el citosol es poco conocida; en 2010 Tang et al, reportaron que es un regulador positivo de la autofagia⁹. Lee et al, encontraron en células de cáncer de colon, hepático y gástrico sobreexpresión citoplasmática de HMGB1 que se localiza formando complejos con otras moléculas (p.ej., anexina A2, miosina, Rab10) encargadas de vías de secreción de proteínas no convencionales¹³.

**HMGB1 en la membrana

Se ha encontrado en la superficie de plaquetas activadas, células en diferenciación, maduración eritroide, así como en adhesión e inmunidad innata. Durante la diferenciación de la eritroleucemia murina, HMGB1 se libera y se acumula en la membrana celular sin cambios en su estructura¹⁷. HMGB1 está presente en el contacto del eritroblasto con el macrófago, lo cual permite la proliferación y maduración del eritrocito mediada por el macrófago¹⁸.

**HMGB1 extracelular

HMGB1 se secreta de forma activa por las células inmunes y se libera de forma pasiva por muerte celular. Una vez liberada, la HMGB1 extracelular tiene múltiples acciones como participar en inflamación, inmunidad, migración, invasión, proliferación, diferenciación y regeneración de tejidos. La forma nativa de HMGB1 de las células eucariontes, tiene la misma actividad biológica que la HMGB1 recombinante, que se obtiene de las células procariontes¹.

Algunos de los mecanismos con los que se relaciona son los siguientes:

- a) Muerte celular. En varios reportes se ha documentado que a grandes dosis induce apoptosis.
- b) Senescencia celular. Durante la senescencia, HMGB1 trasloca del núcleo al espacio extracelular; una vez liberada, HMGB1 en su forma oxidada se une al TLR4, induciendo la producción de IL-6 que promueve la inflamación asociada con la edad¹⁹. La interacción de HMGB1 y p53 inicia la senescencia, p53 es requerido para la traslocación de HMGB1¹⁹.
- c) Respuesta inmune. HMGB1 interacciona de diversas formas con el sistema inmune adaptativo e innato. Cuando existe un proceso de inflamación, los macrófagos liberan HMGB1; el resultado es que prolonga el proceso inflamatorio mediante su efecto sobre TLR2, TLR4 o RAGE en los macrófagos²⁰. Además, HMGB1 tiene la habilidad de inhibir la eferocitosis mediada por los macrófagos, disminuyendo el aclaramiento de las células muertas e incrementando la liberación de los DAMPs²¹.

Las células supresoras derivadas mieloides (MDSCs, por sus siglas en inglés) son un grupo heterogéneo de células de origen mieloides que incluyen: progenitoras mieloides, macrófagos inmaduros, granulocitos inmaduros y células dendríticas inmaduras en diferentes estadios; se sabe que tienen la habilidad de suprimir las actividades citotóxicas de las células NK, y de la respuesta adaptativa mediada por linfocitos CD4+ y CD8+ durante el cáncer y la inflamación²². HMGB1 promueve la migración de estas células al microambiente tumoral en cáncer de colon, contribuyendo así a las metástasis; en melanoma se ha observado activación de la vía HMGB1-RAGE que provoca producción de IL-17 y IL-23, permitiendo un mayor número de MDSCs, contribuyendo al crecimiento tumoral. Además, la pérdida de RAGE en ratones retrasa la formación de neoplasia vía K-RAS y limita la acumulación de las MDSC. Estos hallazgos sugieren que HMGB1-RAGE promueve el crecimiento tumoral y limita la respuesta inmune anti-tumoral²². En su forma extracelular HMGB1 puede funcionar de tres formas: como citocina, quimioquina o mediador pro-angiogénesis; esto depende del estado de oxido-reducción de las cisteínas de HMGB1. En su forma tiol-HMGB1 tiene actividad quimio-atrayente; en su forma disulfuro, induce la producción de citocinas; finalmente, en su forma oxidada, no tiene actividad inmune (**Figura 3**)²³.

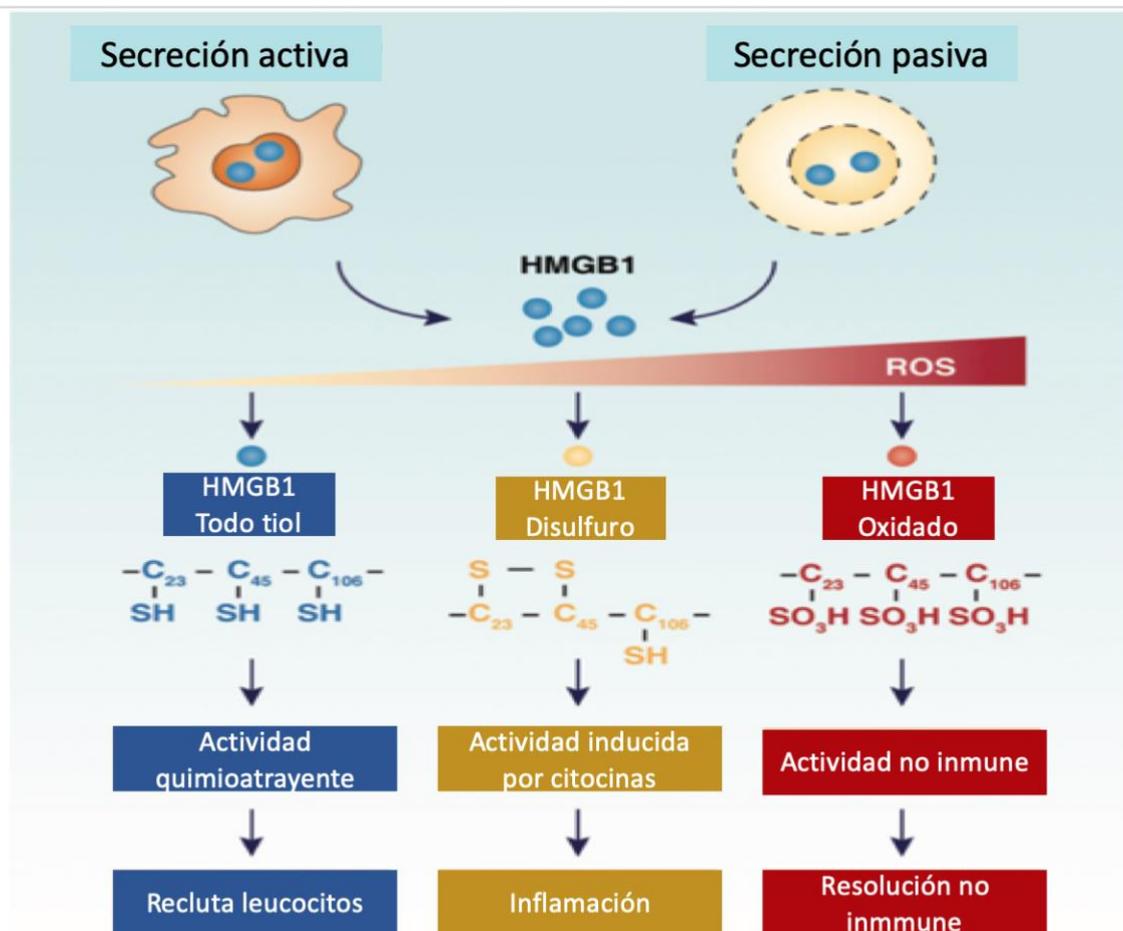


Figura 3. Control Redox de actividad HMGB1. HMGB1 es transportado extracelularmente por células inflamatorias y células necróticas. La actividad extracelular depende de su estado redox. La forma todo-tiol promueve la producción de citocinas que participan en la respuesta inflamatoria. Los radicales de oxígeno (ROS) producidos por los leucocitos inducen la oxidación de HMGB1, el cual ayuda a resolver la inflamación.

Liberación de HMGB1

Liberación activa

En respuesta a productos microbianos, CpG-ADN, micobacterias o estímulos endógenos (p.ej., TNF- α , INF- γ , INF- β), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico, o ADN, las células inmunes (macrófagos, monocitos, neutrófilos, células dendríticas, células NK), fibroblastos y células epiteliales liberan de forma activa HMGB1 hacia el espacio extracelular. HMGB1 no es secretada de la forma clásica debido a que carece de péptido- señal. Por lo anterior, existen varios mecanismos reportados:

- 1) **Modificaciones post-transcripcionales.** Se ha descrito que la acetilación de HMGB1 puede favorecer la traslocación hacia el citoplasma y la secreción activa de los monocitos. El proceso de acetilación es mediado por JAK/STATA1. Para que HMGB1 pase del núcleo al citoplasma requiere procesos de acetilación, fosforilación o ribosilación; la proteína C cinasa es la encargada del proceso de fosforilación de HMGB1. Estos hallazgos sugieren que las diferentes modificaciones post-transcripcionales determinan la localización de HMGB1. Sin embargo, se desconoce si estas modificaciones son competitivas, cooperativas o se regulan de forma independiente¹.
- 2) **Exportación nuclear mediada por CRM1.** CRM1 es un miembro de la superfamilia importin- β de receptores de transporte nuclear, reconoce y exporta proteínas ricas en leucina, también transporta ARN y está relacionada en la duplicación del centrómero y el ensamble de los microtúbulos durante la mitosis. CRM1 inhibe significativamente la traslocación de HMGB1 del núcleo al citoplasma, pero en respuesta al estrés oxidativo, Hsp72 citoplasmática pasa hacia el núcleo, donde interacciona con HMGB1 y permite su liberación hacia el citoplasma y medio extracelular⁹. En macrófagos cuando se someten a tratamiento con LPS o TNF- α se genera una sobre-expresión de Hsp27 que inhibe la interacción entre CRM1 y HMGB1, permitiendo la liberación de este último⁹. La expresión de CRM1 se encuentra baja en varios tipos de cánceres; no está claro si el cambio de expresión de CRM1 causa la traslocación de HMGB1 y su liberación en células neoplásicas⁹.
- 3) **Vías de señalización de los radicales libres (ROS).** Los radicales libres son responsables de la secreción pasiva o activa de HMGB1 por las células inmunes y no inmunes. H₂O₂ activa vías de señalización como MAPK y NF- κ B, mediante las cuales promueve la liberación de HMGB1 en los monocitos y los macrófagos^{1 9}.

La Hemo oxigenasa-1 (HO-1) es una enzima citoprotectora que juega un papel crítico en la defensa contra agentes oxidativos, su incremento inhibe la liberación de HMGB1 en respuesta al estímulo inflamatorio⁶. El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide (Nrf2) es un factor de transcripción maestro que regula el balance *redox* y la respuesta al estrés, por control en la expresión de elementos de respuesta de genes con actividad antioxidante. La pérdida de Nrf2 disminuye la expresión de HO-1 e incrementa la liberación de HMGB1⁶.

- 4) **Vías de señalización mediadas por calcio.** La señalización mediada por calcio está involucrada en el paso de HMGB1 del núcleo al citoplasma y su liberación durante un proceso infeccioso o inflamatorio. Este proceso depende de la proteína cinasa de calcio/calmodulina I y IV (CaMK) que

- fosforila a HMGB1 y permite su liberación. En modelos de animales con sepsis bloquear los CaMK I y IV disminuye la liberación de HMGB1 y los protege del daño por sepsis^{1 6} .
- 5) **Vías de señalización de óxido nítrico (NO).** Por efecto de citocinas, los macrófagos activan a la sintetasa inducible de óxido nítrico incrementado los niveles de NO, promoviendo la liberación de HMGB1²³.
 - 6) **Mecanismos dependientes del TNF- α .** El INF- γ y el LPS estimulan la liberación de TNF- α y HMGB1 por los macrófagos. Interesantemente, la producción de HMGB1 por INF- γ y LPS, depende de la producción de TNF- α . Chen et al, observaron en macrófagos TNF^{-/-} que, al estimularlos con INF- γ y LPS, la liberación de HMGB1 era inhibida, sugiriendo que la liberación de HMGB1 es dependiente de la producción de TNF- α ²⁴.
 - 7) **Mecanismo dependiente de Notch.** En macrófagos, se ha observado que la expresión de Jagged-1 (uno de los cinco ligandos de los cuatro receptores de Notch) incrementa con la presencia de LPS; al emplear un inhibidor de Notch, se inhibe la liberación de HMGB1 por el macrófago inducida por LPS. Estos datos sugieren que Notch es otro mecanismo de regulación en los macrófagos de la liberación de HMGB1¹.
 - 8) **Mecanismo dependiente de Factor Nuclear- κ B (NF- κ B).** La activación de NF- κ B tiene un papel central en la inflamación e inmunidad porque tiene la habilidad de inducir la producción y liberación de múltiples citocinas y quimiocinas inflamatorias. La inhibición de la vía de NF- κ B disminuye la liberación de HMGB1 de las células inmunes activadas¹.
 - 9) **Mecanismo dependiente de STAT.** STATs (del inglés *signal transducer and activator of transcription proteins*) son una familia de seis factores de transcripción (STAT del 1-6). STAT1 y STAT2 tiene un papel fundamental en el sistema del interferón. La unión de factores de crecimiento o de citocinas sobre la superficie celular resulta en la activación de cinasas Janus (JAK1 y JAK2), que inducen fosforilación de STAT, dimerización, translocación nuclear y transcripción de genes mediados por STAT. La activación mediada por JAK de STAT1 y STAT3 es requerida para la expresión, modificación y liberación de HMGB1 mediada por factores como LPS e INF. Se ha demostrado que al inhibir JAK/STAT se previene la liberación de HMGB1 y se protege contra sepsis o daño por reperfusión²⁵.
 - 10) **Mecanismo dependiente del inflamosoma.** La inhibición del inflamosoma en ratones disminuye la liberación de HMGB1 y los protege del daño por sepsis. El NLRP3 (componente del inflamosoma) regula la liberación de HMGB1¹.
 - 11) **Mecanismo dependiente de p53.** HMGB1 y p53 forman un complejo que regula la reparación del ADN y mantiene un balance en la supervivencia de las células²⁶. La pérdida de HMGB1 incrementa la traslocación citoplasmática de p53, mientras que la pérdida de p53 incrementa la translocación citoplasmática de HGMB1 en células con cáncer de colon, lo que sugiere que el complejo HMGB1/p53 afecta la localización de ambas proteínas (**Figura 4**)²⁶.

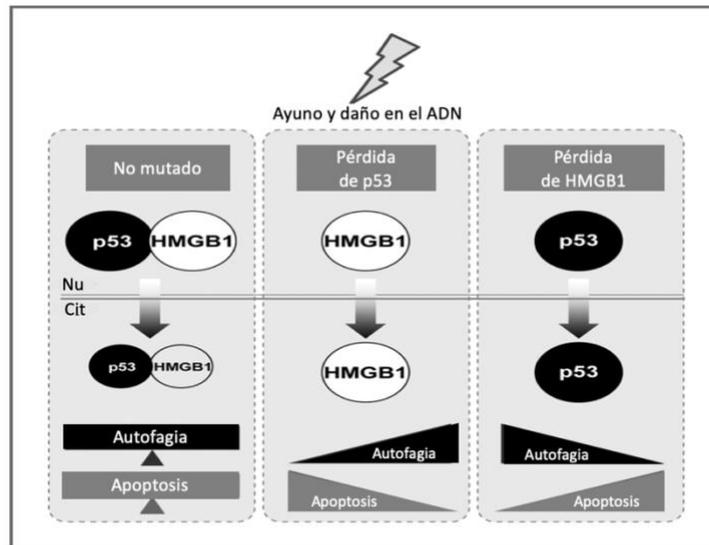


Figura 4. Relación entre HMGB1 y p53 en la regulación de la apoptosis y autofagia. Las señales de estrés (como el daño del ADN) promueven la interacción de p53 y HMGB1 en el núcleo (Nu) y en el citoplasma (Cit). Los niveles del complejo p53/HMGB1 regulan el balance entre la autofagia y la apoptosis en las células. La pérdida de p53 incrementa HMGB1 y la autofagia en el citosol y disminuye la apoptosis. En contraste, la pérdida de HMGB1 incrementa p53 y la apoptosis en el citosol y disminuye la autofagia.

- 12) **Mecanismo dependiente de PPAR.** Los receptores activadores de la proliferación del peroxisoma son miembros de una familia de receptores hormonales nucleares y funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión genética. Son tres (PPAR- α , PPAR- β/δ y PPAR- γ), juegan un papel fundamental en la diferenciación, desarrollo, metabolismo, inflamación celular y formación de tumores¹. Estudios recientes indican que PPAR es un regulador negativo de la liberación HMGB1 en los macrófagos activos. El tratamiento con rosiglitazona (ligando de PPAR- γ) protege contra sepsis y disminuye la liberación de HMGB1 in vivo e in vitro¹.

Liberación pasiva

HMGB1 puede ser liberado de forma pasiva por muerte celular (necrosis, apoptosis, muerte celular lisosomal y muerte celular por autofagia). Múltiples vías regulan la liberación pasiva:

- 1) **Mecanismo dependiente de catepsina.**
- 2) **Mecanismo dependiente de enzimas antioxidante** (superóxido dismutasa, glutatión reductasa).
- 3) **Mecanismo dependiente de ADNasa (desoxirribonucleasa).** El ADN en apoptosis es degradado como nucleosoma por una ADN-endonucleasa (ADNasa- γ); en necrosis es degradado de forma aleatorizada por una ADNasa extracelular o en los lisosomas. La liberación de HMGB1 en células en apoptosis es disparada por ADNasa- γ , la cual si se inhibe puede limitar la liberación de HMGB1 en células en apoptosis¹.
- 4) **Mecanismo dependiente de caspasas.** Las caspasas son proteasas de cisteína y ácido aspártico intracelulares que median la apoptosis y la piroptosis. Las caspasas 3/7 inducen un complejo mitocondrial con la proteína p75NDUFS1, lo cual incrementa la producción de ROS, liberando

subsecuentemente HMGB1 durante la apoptosis¹. Un estudio reciente sugiere que la caspasa 1 es capaz de actuar sobre diversos sitios de HMGB1 (aa67, aa158 y aa169), permitiendo que se libere HMGB1 en diversas longitudes; uno de los fragmentos llamado fragmento box-A (de 23-50 residuos) se une al RAGE y puede rescatar la tolerancia inmune inducida por la apoptosis¹. Estos datos sugieren que la caspasa 1 regula la liberación y el procesamiento de HMGB1 en inflamación e infección.

Receptores sobre los que actúa HMGB1

****TLRs (receptores Toll-like)**

Los TLRs son un tipo de receptor transmembrana que contienen dominios extracelulares ricos en regiones repetidas de leucina (RRL) y un dominio receptor Toll/IL-1 citoplasmático (TIR). Estos receptores reconocen varias señales de daño como PAMPs y DAMPs, para activar la respuesta inmune innata en defensa de daño o infección. Existen dos señales tras su activación:

- 1) Dependiente de MyD88 requerido para la producción de citocinas inflamatorias.
- 2) Independiente de MyD88 requerido para la producción de INF-1 y maduración de células dendríticas.

HMGB1 puede actuar sobre TLR2, TLR4 y TLR9 activando las vías de NF-kB y IRF, que producen citocinas (IL-1 β , IL-6, IL8 y TNF- α) y quimiocinas durante la inflamación y la respuesta inmune. La mejor estudiada es la unión HMGB1-TLR4, donde se requiere la porción C23-C45 y el C106 de HMGB1 para unirse a TLR4 y provocar su activación²⁷. La supresión *in vivo* o *in vitro* de TLR4 provoca disminución del daño provocado en los tejidos por HMGB1, la adhesión y migración celular, angiogénesis, la inflamación y la respuesta inmune²⁷.

HMGB1 y Cáncer

La sobre-expresión de HMGB1 en cáncer no solo se debe a la liberación de factores intracelulares por células tumorales debido a la radioterapia o quimioterapia; es un importante componente del microambiente tumoral. Es un regulador crítico de la supervivencia celular y en algunos estudios se ha observado que contribuye con la carcinogénesis. HMGB1 interacciona y aumenta las actividades de numerosos factores de transcripción relacionados con el desarrollo del cáncer como son p53, la proteína del retinoblastoma (RB) y miembros de la familia del NF-kB¹:

*****HMGB1 y p53**

p53 regula la progresión del ciclo celular y funciona como un supresor de tumor. HMGB1 provee una estructura óptima en el ADN para su unión con p53¹.

*****HMGB1 y RB**

La proteína RB es una proteína supresora de tumor, que disfunciona en varios tipos de cáncer. HMGB1 se asocia con RB por interacción con diversos dominios de la proteína como son LXCXE. HMGB1 incrementa la habilidad de RB para reprimir la transcripción de E2F y ciclina-A¹.

*****HMGB1 y NF-kB**

La familia de factores de transcripción del NF-kb son activadas en respuesta a señales de crecimiento celular, apoptosis, diferenciación y son elementos críticos en la regulación del cáncer. HMGB1 se une a tres miembros de esta familia: NF-kB, subunidad p50 de NF-kB y dominio Rel¹.

Síndrome mielodisplásico

Definición y Epidemiología

El síndrome mielodisplásico (SMD) es una neoplasia mielóide heterogénea caracterizada por citopenias persistentes y riesgo de transformación a leucemia aguda. La incidencia reportada en EE.UU. es de 3-4/100 000 habitantes/año, que incrementa con la edad; en mayores de 60 años tiene una incidencia de 7-35/100 000 habitantes año, sin diferencias entre hispanos y no hispanos²⁸.

Clasificación de la OMS 2016

La OMS 2016 clasifica a los SMD en 6 grupos de acuerdo con: número de líneas celulares con displasia, número de blastos, número de citopenias, presencia de sideroblastos en anillo y alteraciones en el cariotipo, como se muestra en la (tabla 1)²⁹.

Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2016

Enfermedad	Sangre (número de citopenias)	Médula ósea
Displasia unilínea (DUL)	1-2 ¹ Sin o <1 % blastos ²	Displasia unilínea Blastos <5 % ² Sideroblastos en anillo <15 % o <5% ³
Displasia Multilínea (DML)	1-3 ¹ Sin o <1 % blastos ²	Displasia de dos o tres líneas Blastos <5 % ² Sideroblastos en anillo <15 % o <5% ²
Sideroblastos en anillo (SA): 1) SA-DUL 2) SA-DML	1-2 ¹ 1-3 ¹ Ambos: Sin o <1 % blastos ²	Displasia unilínea Displasia de dos o tres líneas Ambos: Sideroblastos en anillo ≥15 % o ≥5% ³ Blastos <5 % ²
SMD asociado con delección aislada del cromosoma 5q; del(5q)	1-2 ¹ Cuenta plaquetaria normal o aumentada Sin o <1 % blastos ²	Displasia de dos o tres líneas Blastos <5 % ² Sin sideroblastos en anillo del(5q) aislada o con 1 anomalía adicional, excepto pérdida del cromosoma 7 o del(7q)
SMD con exceso de blastos (EB): 1) EB tipo 1 2) EB tipo 2	Blastos <5% ² Blastos 5-9% ² Ambos: 1-3 ¹	Blastos <10% ² Blastos 10-19% o cuerpos de Auer Ambos: Displasia única o múltiple Sin sideroblastos en anillo
SMD inclasificable (SMD-U): 1) Blastos ≤1% ² 2) DU + pancitopenia 3) Basado en anomalías citogenéticas	1-3 ¹ Blastos ≤1 % ² 3 ¹ Blastos ≤1 % ² 1-3 ¹ Blastos ≤1 % ²	Displasia única o múltiple Blastos <5% ² Displasia única Blastos <5% ² Sin displasia Blastos <5% ² Anomalías definitorias de SMD

¹Las citopenias se definen: Hb <10gr/dl, plaquetas 100 000 y NT <1800. Pueden presentarse con anemia o trombocitopenia leve; monocitos <1x10⁹. ² Sin cuerpo de Auer. ³ Si la mutación SF3B1 es positiva

Fisiopatología

**Genética en SMD

Son neoplasias mieloides donde existe una función inadecuada en la hematopoyesis, caracterizada por alteraciones citogenéticas recurrentes y mutaciones genéticas que provocan variaciones y diferentes tipos de SMD³⁰. Las mutaciones somáticas se han identificado a nivel del empalme (*splicing*) del ARN, traducción de señales, transcripción y regulación epigenética, explican del 78-89% (mediana de 3 mutaciones por paciente). Se desconoce qué las provoca, porque no todos los pacientes tienen el antecedente de radioterapia o quimioterapia³⁰.

Una de las mutaciones más frecuente (20-28%) está en el gen del factor 3b de la subunidad 1 (SF3B1); dos terceras partes de estas mutaciones son por un cambio de una adenina por guanina (K700E), aunque existen otras mutaciones por mal censado; todas se encuentran de forma heterocigota y la mayoría entre los exones 12-15³¹. Esta mutación se encuentra en un 65-81% de los casos de SMD con sideroblastos en anillo. El resto de los SMD la tienen en menos del 10%³⁰. La relación de la maquinaria del *splicing* puede afectar la hematopoyesis, pero no se sabe porque son seleccionadas para evolución clonal. Desde el punto de vista funcional se encontró una correlación negativa con un gen llamado ABCB7, involucrado en el metabolismo del hierro³⁰. La mutación de SF3B1 se asocia con mejor supervivencia global (SG), menos citopenias y mejor supervivencia libre de leucemia³⁰.

Las mutaciones de la regulación epigenética pueden presentarse junto con mutaciones del *spliceosoma* o solas. La metilación del ADN, la acetilación de histonas, transcripción, traducción y la cohesión de la cromatina hermana se han establecido como mecanismos que juegan un papel en la patogénesis de SMD³⁰. A pesar del uso de hipometilantes con inhibidores de las desacetilasas de histonas no se ha observado ningún beneficio hasta el momento²⁸. Uno de los grandes descubrimientos fue encontrar que la pérdida bialélica de la función del gen TET2 provoca hipermetilación de CpG, observando que la respuesta mejoraba con el uso de inhibidores de la metiltransferasa³². La DNMT3A, es la metiltransferasa de ADN que se encarga de la metilación de las zonas de CpG; se detectan 8% de las mutaciones en esta enzima y se asocian con SG inferior y mayor progresión a leucemia mieloide aguda³².

IDH1 e IDH2 son enzimas que se encuentran en el citosol y en la mitocondria, se encargan de catalizar la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato, un mediador crucial en el proceso de respiración de la célula y de metilación del ADN. Se encuentran en el 5% de los pacientes con SMD, y las mutaciones de IDH2 son 4 veces más frecuente que las mutaciones de IDH1, el impacto en el pronóstico es controvertido. ASX1 regula sitios de metilación específico de las histonas, se encuentra mutado en el 11-14% de los SMD, y determina un mal pronóstico³⁰.

Las mutaciones de RUNX1 son detectadas hasta en el 5-6% y ETV6 en el 3-4%, ambas son predictores independientes de mal pronóstico³⁰. Las mutaciones en Tp53 se reportan en un 8-13%, y confieren un

pronóstico independiente y progresión a leucemia mieloide aguda; se han relacionado con un mayor número de blastos, enfermedad de alto riesgo por IPSS (sistema de puntaje pronóstico internacional de SMD) y un mayor número de alteraciones citogenéticas³⁰.

Otra de las mutaciones menos comunes son los factores relacionados con el crecimiento celular y el proceso de diferenciación, como la vía del RAS y la de fosfatidilinositol³⁰.

En la fisiopatología del SMD están involucrados múltiples mecanismos que determinan el diagnóstico, tratamiento y pronóstico. Existen dos tipos de alteraciones: la primera son las mutaciones en la célula progenitora hematopoyética (HSC-SMD) que provocan hematopoyesis clonal (como ya mencionamos arriba), y la segunda es la hematopoyesis ineficaz coordinada por citocinas liberadas por células del estroma, macrófagos y HSC-SMD (INF- δ , FNT- α , FAS-L, FTG- β , IL-1 β y sintasa de óxido nítrico) encargadas de producir un aumento en la apoptosis en etapas más tempranas de la enfermedad³³. Estas citocinas activan a TLRs provocando una mayor liberación de citocinas pro-apoptóticas. Se desconoce que provoca la liberación de citocinas y si la estimulación crónica de las HSC-SMD favorece el deterioro de las citopenias y progresión a leucemia aguda.

Debido a que HMGB1 está relacionada con la activación crónica del sistema inmune innato, hablaremos sobre el papel de este sistema en la fisiopatología de SMD:

*****Disregulación de la respuesta inmune innata en SMD.***

El SMD es una enfermedad de las células madre hematopoyéticas (HSC) caracterizada por mutaciones somáticas, displasia mieloide y hematopoyesis inefectiva. La enfermedad inflamatoria crónica se asocia con activación del sistema inmune innato que frecuentemente precede al SMD. Ésto hace pensar que la activación crónica del sistema inmune innato juega un papel en la fisiopatología de SMD. Cuando los TLRs se activan de forma crónica, la hematopoyesis normal es dañada y la inflamación crónica altera el microambiente de la médula ósea³⁴.

La sobre-expresión de genes relacionados con inmunidad se ha reportado en el 50% de los pacientes con SMD³⁵. En SMD, la célula madre progenitora tiene mutaciones en los TLR o se encuentran sobre-expresados en comparación con población sana³⁶. Existe hiperactividad de TLR, MyD88 o IRAKs (quinasas) y se ha demostrado que inhibir TLR2 o MyD88 restaura la función de la HSC-SMD. Se ha reportado expresión aberrante de TRAF6, una ligasa de ubiquitina que media varios procesos de señalización de los receptores de la inmunidad innata. El ARNm de TRAF6 está sobre-expresado en el 40% de las CD34+ en SMD en comparación con gente sana. Diversos reguladores de la respuesta inmune innata están ausentes en la célula progenitora hematopoyética de SMD, como son miR-145, miR146a y TIFAB³⁴.

*****Evidencia funcional de la disregulación de la inmunidad innata en SMD.***

a) Del(5q) como paradigma de la activación de la inmunidad innata en SMD.

En el síndrome del(5q) existe evidencia de activación del sistema inmune innato; la supresión del miR-146a incrementa los niveles de ARNm TRAF6 resultando en una sobre-expresión y activación de TRAF6 en HSC-SMD (miR146a reside en 5q33.3 y esta suprimido en el 80% de todos los SMD con del(5q)). La baja expresión de miR146a ocurre en >25% de los pacientes con SMD independiente de su cariotipo. En ratones, la ausencia de miR146a en HSC resulta en expansión mieloide, después falla de la médula ósea, SMD y eventualmente leucemia³³. Los cambios en la expresión de los genes de 5q también se asocian a actividad de la inmunidad innata; DIAPH1, codifica para mDia1, localizado en 5q31.3, en ratones deficientes o co-suprimidos en miR146a exhiben granulocitopenia dependiente de la edad y displasia mieloide a través del incremento de la señal de TLR4³³. La ausencia de mDia y miR146a resulta en anemia y eritropoyesis inefectiva mediada por niveles elevados de TNF- α e IL-6³³.

b) Señal de TRAF6 es un eje subyacente de hematopoyesis aberrante en SMD.

En SMD no del(5q) existe una expresión de TRAF6 anómala. La sobre-expresión de TRAF6 en HSC es suficiente para inducir defectos en los ratones asociados a diferenciación mieloide. TRAF6 ubiquitina a una proteína unida al ARN (hnRNPA1); como consecuencia, la ubiquitinización de hnRNPA1 induce un *splicing* aberrante de Arhgap1, un regulador negativo de Cdc42 quien provoca defectos en la HSC³⁴. De acuerdo con los estudios genéticos, las dosis de TRAF6 contribuyen con la hiperactividad de la activación de los TLR en SMD. Las consecuencias moleculares de la activación de TRAF6 sobre la HSC en SMD no han sido evaluadas aún.

c) Inflamosoma en SMD.

Los inflamosomas son una familia de receptores Nod-like (NLRs), que permiten la muerte celular mediada por inflamación conocida como piroptosis. De toda la familia, NLRP3 está implicado en la piroptosis en SMD³⁴. NLRP3 es activado por diversos DAMPs como S100A8 y S100A9. S100A9 y ROS generan activación de NLRP3 mediante piroptosis. Además, la activación por DAMPs de los inflamosomas es asociada con mutaciones comunes en SMD como U2AF1, SRSF2, SF3B1, ASXL1 y TET2³⁰. Es importante resaltar que la inhibición del inflamosoma restaura la hematopoyesis, y protege del desarrollo de enfermedad cardiovascular en ratones deficientes de TET-2³⁷. TRAF6 participa en el cebado de lo TLR con el inflamosoma en los macrófagos de la médula ósea, lo que sugiere la activación de los TLR por TRAF6 está vinculada con la activación de los inflamosomas en SMD³⁷.

d) Receptores inmunes activados en SMD.

La activación sostenida de TLR4 correlaciona con el daño del ADN mediado por ROS, sugiriendo que la señalización crónica de TLR4 puede resultar en una acumulación de genotoxicidad y contribuir a la transformación maligna³⁸.

TLR2 está implicado ampliamente en SMD. Su activación permite la proliferación de HSC en ratones e incrementa la apoptosis y daña la diferenciación eritroide en CD34⁺ de humanos. La mutación somática de TLR2 se asocia con incremento de la inmunidad innata en SMD.

****Señales de inmunidad innata y hematopoyesis clonal.**

La evidencia muestra que la inmunidad innata favorece la selección positiva de la hematopoyesis clonal. La hematopoyesis sesgada-mieloide es observada en las enfermedades inmunes que frecuentemente hacen SMD como artritis reumatoide, como resultado de la señalización de TLR4 sobre HSC²⁵. Pero no todas las expansiones clonales progresan a neoplasia mioelode. Se describen dos mecanismos independientes por los cuales se puede desarrollar SMD³⁴:

- 1) La activación persistente del sistema inmune innato causa expansión clonal de HSCs e incrementa el riesgo de mutaciones adquiridas que contribuyen al SMD. La HSC acumula mutaciones con la edad en individuos sanos, dando una ventaja clonal y permitiendo la hematopoyesis clonal de potencial incierto (CHIP). Algunos individuos con CHIP nunca desarrollan malignidad hematopoyética, pero ellos tienen riesgo de enfermedad aterosclerótica y SMD. Las mutaciones más comunes de CHIP son DNMT3A, TET2 y ASXL1. Las toxinas bacterianas y ROS resultan de la activación crónica del sistema inmune innato, siendo reconocidas como inductoras de mutaciones genómicas en las HSC. A pesar de la evidencia de que la activación crónica del sistema inmune innato causa inestabilidad genómica, la adquisición de mutaciones de CHIP gracias a estresores inflamatorios no ha sido reportada³⁴.
- 2) Las mutaciones somáticas ocurren en HSC por mecanismos independientes del sistema inmune y la expansión de la HSC permite alterar el sistema inmune innato y desarrollar SMD. Las mutaciones DNMT3A, TET2 y ASXL1 alteran la señalización del sistema inmune innato a través de varios mecanismos. TET2 inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias e interferones de las células inmunes; por ejemplo, cuando TET2 está inactivo o mutado incrementa la señalización inmune. En apoyo a estas observaciones, se reporta que la mutación de TET2 en los macrófagos se asocia a niveles elevados de IL-1 β -NLRP3. Los ratones deficientes en DNMT3A presentan incremento de INF- α/β . La mutación de ASXL1 carece de evidencia clara de su papel en la activación del sistema inmune innato³⁴.

****Mecanismos extrínsecos asociados con la señalización del sistema inmune innato en SMD.**

La hematopoyesis inefectiva y la dominancia clonal no están limitadas a mecanismos intrínsecos de la clona de SMD. Evidencia reciente ha revelado que existen cambios en el microambiente relacionados con la edad y la enfermedad que contribuyen con la hematopoyesis inefectiva en SMD:

- 1) **Células inmunes.** Las células supresoras derivadas mioeloides (MDSC) secretan citocinas que reducen la proliferación de los linfocitos T efectores. Las MDSC se encuentran incrementadas en la médula ósea de SMD y la magnitud de MDSC en la médula de pacientes con SMD es un indicador de mal pronóstico³³. Las MDSCs no comparten mutaciones con la clona de SMD, son activadas por unión de CD33 con S100A9, un DAMP abundantemente expresado por MDSC. En modelos murinos donde las MDSC expresan S100A9, desarrollan enfermedad parecida a SMD que coincide con la activación de

las MDSC. En contraste, bloquear S100A9 restaura la hematopoyesis normal³⁴. Se desconoce como MDSC afecta a la HSC y contribuye con su selección clonal.

El papel de los granulocitos, macrófagos y células dendríticas es menos claro en SMD. La contribución del sistema inmune adaptativo, específicamente de la supervivencia de las células T, en la médula ósea de SMD no ha sido claramente documentada. En SMD de riesgo bajo, hay una disminución de los linfocitos Treg, mientras que el SMD de riesgo alto se encuentran incrementados. El cambio de la supervivencia inmune correlaciona con los cambios en las citocinas, de un estado pro-inflamatorio en pacientes de riesgo bajo hacia un estado anti-inflamatorio en riesgo alto y LMA³⁴.

- 2) **Citocinas.** La expresión elevada de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se encuentra presente en SMD. La fuente de estos factores en SMD se ha demostrado en varias poblaciones. MDSC secretan citocinas inhibitoras inmunes en respuesta a S100A9. El perfil de citocinas de SMD es difícil debido a lo heterogéneo de la enfermedad: TNF- α , TGF- β , INF- γ , IL-6, IL-8, IL-1 β y GM-CSF se encuentran comúnmente incrementados, y en algunos casos la expresión correlaciona con los resultados de la enfermedad³⁷.
- 3) **Vías del sistema inmune innato en SMD.** El papel del sistema inmune innato en la HSC-SMD y en el microambiente ha derivado en el diseño de inhibidores de las diversas vías (IL1R/TLR-IRAK-TRAF6, S100A9-CD33-TLR4), la mayoría aún en estudio. En pacientes con SMD de riesgo bajo un estudio con inhibidor de TLR2 mostró respuestas globales del 50%. Resultados semejantes se han observado también con inhibidores de TLR4 o el bloqueo de HMGB1 (aunque, actualmente se están corriendo estudios). Una manera de apoyar la importancia del sistema inmune innato en la fisiopatología de SMD, es mediante el tratamiento con lenalidomida del SMD del(5q), un inmunomodulador que exhibe múltiples efectos en el sistema inmune. Las terapias dirigidas contra el sistema inmune no eliminan la clona, pero atenúan la activación del sistema inmune innato y por lo tanto disminuyen la expansión clona³⁷.

Pronóstico en SMD

Existen algunas escalas para conocer el pronóstico en los pacientes con SMD. La más empleada es el IPSS-R (*por sus siglas en ingles*, International Prognostic Scoring System Revised) que toma en cuenta: cariotipo (dividido en muy bueno, bueno, intermedio, pobre y muy pobre dependiendo de las alteraciones citogenéticas encontradas), porcentaje de blastos, hemoglobina, plaquetas y cuenta total de neutrófilos. Mediante la suma de puntajes (**tabla 2**) se obtienen 5 grupos con diferentes supervivencias: muy bajo 8.8 años (7.9-9.9), bajo 5.3 años (5.1-5.7), intermedio 3 años (2.7-3.3), alto 1.6 años (1.5-1.7) y muy alto 0.8 años (0.7-0.8)²⁹.

Tabla 2. Escala pronóstica Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R).

Variables	0 puntos	0.5 puntos	1 puntos	1.5 puntos	2 puntos	3 puntos	4 puntos
Citogenética	Muy bueno		Bueno		Intermedio	Malo	Muy malo
% Blastos (MO)	≤ 2		> 2 < 5		5-10	> 10	
Hb g/dl	≥ 10		8 < 10	< 8			
Plt 10⁹/l	≥ 100	50-100	< 50				
NA 10⁹/l	≥ 0.8	< 0.8					
Categorías de riesgo: muy bajo ≤1.5, bajo >1.5<3, intermedio >3-4.5, alto >4.5-6 y muy alto >6							

Citogenética: pronóstico muy bueno: -Y, del(11q); pronóstico bueno: normal, del(5q), del(12p), del(20q), del(5q) + 1 anomalía; pronóstico intermedio: del(7q), +8, +19, i(17q), otras anomalías no incluidas en los otros grupos; pronóstico malo: -7, inv3/t(3q)/del(3q), 7/del(7q) + anomalía, 3 anomalías; pronóstico muy malo: cariotipo complejo (≥ 3 anomalías). MO = médula ósea. Hb = hemoglobina. Plt = plaquetas, NA = neutrófilos absolutos.

Debido a que el grupo de riesgo bajo no se diseña de forma apropiada, García Manero y colaboradores, crearon otro modelo pronóstico solo para el grupo de riesgo bajo (LRPSS) definido por una herramienta pronóstica anterior al IPSS-R llamada IPSS. En ésta incluyeron a los pacientes con IPSS de riesgo bajo e intermedio 1 y determinaron tres categorías de riesgo: categoría 1 (0-2) con mediana de supervivencia de 80.3 meses (IC 95%, 68-NA); categoría 2 (3-4puntos) con mediana de supervivencia de 26.6 meses (IC 95%, 22-32) y categoría 3 (5-7) con mediana de supervivencia de 14.2 meses (IC 95%, 3-14)³⁹.

HMGB1 en SMD

Velegraki et al, en 2013 estudiaron 27 pacientes con nuevo diagnóstico de SMD y evaluaron la expresión y el grado de activación de los receptores TLR en los monocitos de la médula ósea, buscando potenciales ligandos endógenos. Además, debido a que la homeostasis depende de la eficacia del aclaramiento de las células en apoptosis por parte de los macrófagos de los tejidos, investigaron si existen fallas en el mecanismo de fagocitosis de los macrófagos (eferocitosis), contribuyendo así al proceso inflamatorio a través de la inducción de los TLR. Como resultados encontraron lo siguiente⁴⁰:

***Mayor expresión de TLR4⁺/CD14⁺ en monocitos de la médula ósea de pacientes con SMD vs sanos (p<0.0001) y mayor intensidad (p=0.0002). No encontraron diferencia en la expresión de TLR4 con la gravedad de la enfermedad, riesgo bajo/I-1 (n=23) vs. riesgo alto/I-24 (n=) (6.28% vs. 5.05%). En la población de células no hematopoyéticas (CD45⁻) también mostraron mayor expresión de los TLR4, pero no mayor que la de los pacientes con SMD. Por lo anterior demostraron que existe una mayor expresión en los macrófagos y en el microambiente de la médula de los pacientes con SMD en comparación con sanos.

***Demostraron actividad de la activación de los TLR4 detectando genes involucrados con la activación de TLR4 (cuatro con SMD y un sano); reportaron que la expresión de los genes relacionados con TLR4 era cuatro veces mayor en pacientes con SMD en comparación con controles. Dentro de los genes relacionados se encuentran: NF-κβ, JUN N-terminal cinasa (JNK)/p38, JAK/STAT, factor regulador del INF (IRF) y vías mediadas por citocinas. Además, los genes relacionados con la diferenciación mieloides dependientes o no de MyD88

fueron encontrados sobre-expresados en pacientes con SMD, esto hace pensar que existe una relación de la activación del TLR4-MyD88-NF- κ B.

***Encontraron producción de citocinas por el estímulo de TLR4 de los monocitos de la médula ósea, mediante estudios cruzados: al colocar plasma de los SMD, incrementaban los niveles de IL-1 β , IL-6, TNF- α en comparación con una muestra sin plasma ($p=0.0156$, $p=0.0156$ y $p=0.0156$, respectivamente); al poner inhibidores de TLR4 los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α disminuían significativamente (9.33pg/ml, 136.31pg/ml y 6.92pg/ml, respectivamente) comparado sin inhibidor (26.42pg/ml, 503.86pg/ml y 57.43pg/ml, respectivamente; $p=0.0156$, $p=0.0156$ y $p=0.0156$, respectivamente). En los cultivos de los monocitos de pacientes sanos, el plasma de los SMD también provocaba incremento en los niveles de las citocinas con diferencias significativas, y al agregar el inhibidor disminuían los niveles de las citocinas de los cultivos de los monocitos sanos. Esto sugiere que en el plasma de la médula ósea existe algo que favorece que los monocitos mediante la activación del TLR4 incrementen la producción de citocinas.

***En base a la hipótesis de que HMGB1 tiene actividades extracelulares, como activación de TLR4-NF- κ B y JNK/p38; encontraron que las concentraciones de HMGB1 son mayores en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares de médula ósea de pacientes con SMD comparado con controles sanos ($n=27$, 3.02(2.94) ng/ml vs $n=25$, 0.96 (1.26) ng/ml; $p=0.0186$; respectivamente). Midieron HMGB1 en el plasma de médula ósea de 7 pacientes con SMD (327.04(48.51) ng/ml) comparado con 6 controles sanos (90.75(20.93) (p=0.0012).

***Demostraron que los niveles incrementados de HMGB1 dañan el proceso de fagocitosis de los macrófagos de la médula ósea; cultivaron macrófagos de la médula de pacientes con SMD ($n=5$) vs macrófagos de pacientes sanos ($n=5$) con células en apoptosis de la médula ósea y midieron el índice de fagocitosis/eferocitos, encontrando un índice menor en SMD (12.00 (2) % vs 36.70 (4.81) %, respectivamente; $p=0.0079$).

***Encontraron que la liberación de HMGB1 por los macrófagos de pacientes con SMD es dependiente de la carga de células en apoptosis y del tiempo de incubación ($p<0.001$). En los pacientes sanos solo se encontró diferencia con la mayor carga de células en apoptosis, lo que sugiere que la capacidad normal de fagocitosis de los macrófagos es alterada por la sobrecarga de células en apoptosis, resultando por el mismo efecto mayores concentraciones de HMGB1 (que se sabe que daña el mecanismo de eferocitosis). El empleo de inhibidores de TLR4 en los cultivos no tiene efecto sobre los niveles de HMGB1 (a diferencia de lo que se observa con las citocinas dependientes de TLR4); y se entiende debido a que los mecanismos de liberación de HMGB1 de los macrófagos son por otras vías.

***Reportaron que la presencia de células en apoptosis disminuyó la producción de unidades formadoras de colonias (UFC) en células CD34⁺ sanas en presencia de macrófagos de SMD vs. cultivos sin células en apoptosis (7.00 (2.45) UFC por 2×10^4 CD34⁺ vs 48 (14.20) UFC por 2×10^4 CD34⁺) ($p=0.0313$). Hicieron lo mismo con macrófagos de controles sanos y no encontraron diferencias, pero si los macrófagos normales se co-cultivaban

con una carga alta de células en apoptosis, se generaba un menor número de UFC. Esto indica que en macrófagos de SMD existe defecto, porque toleran poca carga de células en apoptosis; por otro lado, las cargas altas de células en apoptosis superan la capacidad de aclaramiento de los macrófagos sanos.

*** Emplearon cultivos de CD34⁺ sanas con macrófagos sanos, y los trataron con HMGB1 recombinante y encontraron que disminuye las UFC (46.0 (32.79) UFC por 2x10⁴ CD34⁺) vs. sin tratamiento (86.0 (48.10) por 2x10⁴ CD34⁺) (p=0.0313).

Kam et al, evaluaron si la modulación del sistema inmune innato vía HMGB1 podría reducir la viabilidad celular en SMD, observando lo siguiente¹⁰:

- 1) Sobre-expresión de HMGB1 en SMD: encontraron que la expresión del ARNm y el análisis de inmunofluorescencia de HMGB1 era de 2-3 veces mayor en SMD-L y SMD CD34⁺ que en células sanas de cordón o médula. Evaluaron los TLR y reportaron que TLR2, TLR4, TLR6 y TLR 9 son de 7 a 24 veces mayores en CD34⁺ de SMD. A diferencia de otros estudios documentaron la presencia de RAGE en CD34⁺ de SMD.
- 2) La inhibición de HMGB1 altera la expansión celular en SMD: Bloquearon con un ARNm en macrófagos y células dendríticas la producción de HMGB1 y por lo tanto la liberación de citocinas. Posteriormente pusieron las SMD-L también con bloqueo de HMGB1 encontrando una disminución en los niveles de HMGB1 del 85% (ARNm) y 25% (expresión proteica). La expansión de las UFC se redujo en un 40%. Esto indica que la presencia de HGMB1 es necesaria para la expansión y supervivencia de la HSC-SMD. Posteriormente emplearon sivelestat (un inhibidor de HMGB1) y a las 72 horas los niveles de HMGB1 disminuyeron un 50% en comparación con los controles.
- 3) Sivelestat + quimioterapia promueve la muerte in vitro de células SMD: demostraron disminución de las UFC de HSC-SMD al combinar azacitidina + sivelestat.
- 4) La inhibición de HMGB1 promueve la apoptosis en SMD: lo demostraron a través de tres vías de apoptosis: midiendo los niveles de anexina-V, caspasa 3 y apoptosis mediada por p53.
- 5) La inhibición de HMGB1 normaliza la expresión aberrante de TLR: reportaron que la expresión de los TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9 se normaliza. A su vez demostraron que la actividad de las kinasas ERK1/2 disminuía de 2-3 veces a las 12 horas de la aplicación del sivelestat.
- 6) Modula la respuesta vía NF-κB: encontraron disminución de la proteína IκB-α, además emplearon un perfil proteómico de la señalización de NF-κB.

Este estudio demuestra que HMGB1 se encuentra en las células madre de SMD CD34⁺, y que su inhibición restaura la expresión de los TLRs, de su vía de señalización (NF-κB); provocando reducción de la expansión de las UFC.

Sin embargo, se desconoce si existen niveles elevados de HMGB1 en el plasma de sangre periférica de pacientes con SMD con respecto a otras fallas medulares; el comparativo con otras fallas medulares como anemia aplásica y hemoglobinuria paroxística nocturna es debido a la sobre-posición que existe desde el punto

de vista fisiopatológico entre dichas entidades; encontrar HMGB1 elevada solo en SMD permitirá establecer que no se trata solo de un epifenómeno.

Resumen de marco teórico

El SMD es una enfermedad heterogénea. Desglosar los diversos mecanismos involucrados en su patogénesis permitirá definir fenotipos. Es una enfermedad que incrementa con la edad, se sabe que los pacientes con riesgo bajo mueren de enfermedades cardiovasculares o complicaciones por citopenias, mientras que los de riesgo alto fallecen de progresión a leucemia mieloide aguda.

Dentro de la fisiopatología de SMD uno de los pilares más relevante son las mutaciones en genes relacionados con diferentes procesos del ADN como: transcripción, *splicing* y metilación. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la importancia del sistema inmunológico, como causa o consecuencia (situación desconocida en la actualidad) en el origen o progresión de SMD. Estos diversos mecanismos han hecho que se describan diferentes fenotipos de SMD, que en un futuro podrán ser blancos de tratamiento; en una enfermedad que hasta el momento no es curativa.

Una de las moléculas poco estudiada en SMD es HMGB1, una proteína con múltiples funciones nucleares (formación de nucleosomas, transcripción genética, reparación del ADN) y extracelulares (activación de los TLRs). HMGB1 es liberada por las células en apoptosis por vías pasivas y por células inmunes por diferentes vías pasivas y activas; en SMD el incremento de apoptosis es claro, pero los mecanismos que desencadenan esta falla son desconocidos. En 2013, Velegraki et al, encontraron niveles elevados de HMGB1 en el plasma de médula ósea de pacientes con SMD con respecto a pacientes sanos, y demostraron que HMGB1 es el responsable de la falla en el aclaramiento de los macrófagos, lo que provoca mayor apoptosis y mayor número de citocinas, perpetuando el proceso inflamatorio en la médula ósea y otros tejidos. Kam et al, mediante estudios in-vitro demostraron la sobre-expresión de HMGB1 en líneas celulares de SMD y SMD CD34⁺, así como el efecto de HMGB1 sobre las CD34⁺ de pacientes con SMD a través de los TLR4 y que el bloqueo de HMGB1 reduce la expansión de las UFC hasta en un 40%.

Con base a los mecanismos de acción extra e intra celulares de HMGB1, así como los estudios que existen en enfermedades inmunes y en neoplasias sólidas, surge la siguiente pregunta: ¿las concentraciones de HMGB1 en plasma de sangre periférica estarán incrementados en pacientes con SMD en comparación con otras fallas medulares?

Planteamiento del problema

Las opciones de tratamiento para SMD son pocas y con respuestas poco duraderas. La única terapia curativa es el trasplante de médula ósea; sin embargo, el 86% de los pacientes son ≥ 60 años, y tiene más de una comorbilidad que impide buenos resultados con el trasplante.

En los últimos años se ha progresado en el conocimiento de la biología del SMD. En la actualidad se sabe que la activación crónica del sistema inmune innato juega un papel relevante; una de las moléculas que está relacionada con este proceso de inflamación crónica es HMGB1.

Existe dos estudios donde se ha considerado que HMGB1 se encuentra involucrada en la fisiopatología de SMD, pero se desconoce si las concentraciones se encuentran elevadas en el plasma de pacientes con SMD en comparación con otras fallas medulares o que solo se trate de un epifenómeno. Se desconoce si existen diferencias en las concentraciones de HMGB1 con respecto al riesgo y tipo de SMD. Responder estas interrogantes permitirá evaluar si HMGB1 es una molécula relevante en SMD, y de esta manera poder continuar explorando el papel de HMGB1 en SMD.

Justificación

Los pacientes con SMD tienen una supervivencia menor que la población de la misma edad sin SMD, menor calidad de vida y progresión a leucemia mieloide aguda. En la actualidad existen pocas opciones de tratamiento para SMD, por lo que es necesario investigar los mecanismos que favorecen su desarrollo, buscando la posibilidad de nuevos blancos terapéuticos.

Recientemente, HMGB1 se ha descrito como un modulador del sistema inmune innato en SMD, pero es necesario saber si existen niveles altos en el plasma de pacientes con SMD a diferencia de otras fallas medulares. Contestar a esta pregunta podrá permitir suponer que HMGB1 juega un papel en la fisiopatología de SMD y valorar en estudios posteriores si puede ser un biomarcador diagnóstico y blanco de tratamiento.

Pregunta de investigación

¿Cuáles serán las concentraciones de HMGB1 en el plasma de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) en comparación con pacientes con anemia aplásica (AA), hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y personas sanas?

Hipótesis

Nula

Las concentraciones plasmáticas de HMGB1 serán iguales en pacientes con SMD, AA, HPN y personas sanas.
SMD=AA=HPN=Sanos

Alterna

Las concentraciones plasmáticas de HMGB1 en pacientes con SMD serán mayores en comparación con pacientes con AA, HPN y personas sanas. SMD \neq AA \neq HPN \neq Sanos

Objetivos

General

Comparar las concentraciones plasmáticas de HMGB1 en pacientes con SMD, AA, HPN y personas sanas.

Específicos

Determinar las concentraciones plasmáticas de HMGB1 mediante ELISA en pacientes con SMD, AA, HPN y personas sanas.

Secundarios

- 1) Evaluar si las concentraciones plasmáticas de IL-1 β , IL-6, IL8 y TNF- α estarán incrementadas en pacientes con SMD en comparación con AA, HPN y controles sanos.
- 2) Evaluar si las concentraciones plasmáticas de HMGB1 se asocian con los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α .
- 3) Evaluar las concentraciones plasmáticas de HMGB1 de acuerdo a la clasificación de la OMS 2016, considerando los siguientes dos grupos: SMD-DU/SMD-DM/SMD-SA/-5q y SMD-EB/LMA-SMD.
- 4) Evaluar las concentraciones plasmáticas de HMGB1 en pacientes con SMD de acuerdo a la clasificación de riesgo por IPSS-R, considerando dos grupos de riesgo: muy bajo/bajo y intermedio/alto/muy alto.
- 5) Evaluar las concentraciones plasmáticas de HMGB1 en pacientes con SMD de riesgo muy bajo/bajo al separarlo por el modelo pronóstico LRPSS, divididos en dos grupos: 0-4 puntos y ≥ 5 puntos.
- 6) Evaluar las concentraciones plasmáticas de HMGB1 en pacientes con SMD hiper celular vs hipocelular.
- 7) Evaluar las concentraciones plasmáticas de HMGB1, IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α en pacientes con SMD vs pacientes con sepsis.

Material y Métodos

Diseño: comparativo, observacional y transversal.

Población de estudio:

Criterios de inclusión:

Caso:

**Pacientes ≥ 18 años de edad con el diagnóstico de SMD de acuerdo a los criterios de la OMS-2016.

Control:

**Pacientes con diagnóstico de AA de acuerdo con los criterios de la BJH 2015.

**Pacientes con diagnóstico de HPN de acuerdo a la citometría de flujo.

**Personas sin diagnóstico de falla medular (AA o HPN) ajustados por edad (+/-5 años) y género con los casos.

Se excluirán los controles con las siguientes enfermedades:

Epilepsia (solo si es dentro de los 4 días de la crisis epiléptica)

Infección aguda o crónica (dentro de los 21 días)

Enfermedades reumatológicas (LEG con SLEDAI ≥ 6)

Falla cardíaca congestiva (FEVI anormal o NYHA III/IV) o SICA

Insuficiencia renal crónica estadio 5

Enfermedad hepática aguda

Cáncer activo (≤ 5 años de vigilancia)

Criterios de exclusión

Pacientes que cumplan con los criterios diagnósticos de SMD más cualquiera de las siguientes patologías:

**Epilepsia (solo si es dentro de los 4 días de la crisis epiléptica)

**Infección aguda o crónica (dentro de los 21 días)

**Enfermedades reumatológicas (LEG con SLEDAI ≥ 6)

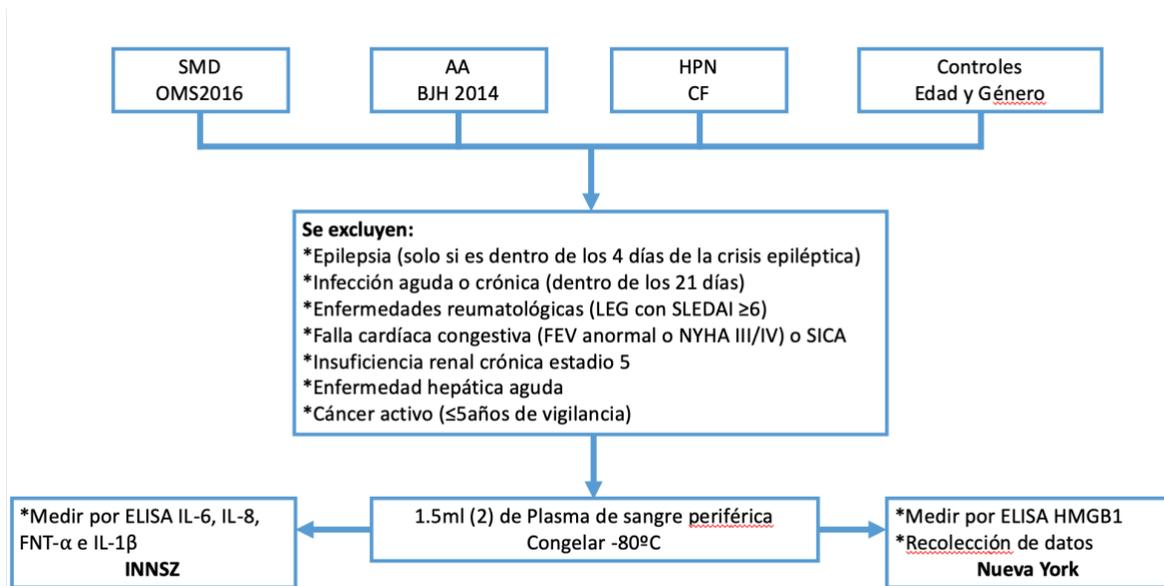
**Falla cardíaca congestiva (FEV anormal o NYHA III/IV) o SICA

**Insuficiencia renal crónica estadio 5

**Enfermedad hepática aguda

**Cáncer activo (≤ 5 años de vigilancia)

Flujograma



Procedimiento:

Medición de HMGB1 en el plasma de sangre periférica

- 1) Extracción de 5ml de sangre periférica en tubo con EDTA.
- 2) Centrifugación por 10 minutos a 3000rpm.
- 3) Separar dos alícuotas del plasma de 1.5ml cada una.
- 4) Congelar a -80°C.
- 5) Enviamos las muestras a Estados Unidos y las concentraciones de HMGB1 fueron procesadas por ELISA y las concentraciones de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α mediante ELISA multiplex (se empleo el meso-scale-discovery).

Definición de variables

Variables dependiente e independiente:

Independiente= Tipo de falla	Categórica	1=SMD 2=AA 3=HPN 4=Control
Dependiente= HMGB1	Cuantitativa	ng/ml

Variables para objetivos específicos:

Nombre	Definición	Tipo	Escala
Edad	Número de años que el paciente tiene al momento de la toma de la muestra.	Cuantitativa	Años
Género	Clasificación de individuos	Dicotómica	1=hombre 2=mujer
SMD	Neoplasia hematológica heterogénea	Dicotómica	0=no 1=si
Tipo de SMD	Clasificación de SMD de acuerdo a la OMS-2016	Categórica	1=SMD-SBA/-5q 2=SMD-CRDU/DM 3=SMD-EB/LMA-SMD
R-IPSS solo al momento del diagnóstico	Escala de riesgo para evaluar pronóstico y riesgo de transformación a leucemia (útil solo al momento del dx)	Categórica	1=Muy bajo/Bajo 3=Intermedio 4=Alto/Muy alto
LRPSS	Escala que subdivide al grupo de riesgo B e I-1 en subgrupos	Cuantitativa	1=0-2 2=3-4 3= \geq 5

Celularidad en biopsia de hueso	Valorar la celularidad por biopsia de hueso.	Dicotómica	0=hipocelular 1=hipercelular 2=Normocelular
Hemoglobina	Valor de Hb al momento del estudio	Cuantitativa	gr/dl
Plaquetas	Plaquetas al momento del estudio	Cuantitativa	Cel/mcl
Neutrófilos totales	NT al momento del estudio	Cuantitativa	
Tratamiento	Tratamiento al momento de la muestra	Dicotómica	0=no 1=si

Tamaño de la muestra

Muestras independientes.

Variable dependiente: HMGB1 (dimensional)

$$n_1 = (\sigma_1^2 + \sigma_2^2 k) \frac{(z_\alpha + z_\beta)^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Donde:

σ_1^2 =Varianza del grupo 1*

σ_2^2 = Varianza del grupo 2*

Z_α = 1,96 (si significancia es de 0.05)

Z_β = 0,84 (si poder es de 80%)

M1= Media del grupo 1

M2= Media del grupo 2

Único estudio: diferencia del 72%

Número de pacientes: 5 por grupo.

No es una **n** que podamos tomar en cuenta, porque el único antecedente de donde se obtuvo la media por grupo (SMD vs sanos) de las concentraciones de HMGB1 fueron en plasma de médula ósea. Además, no se incluyen pacientes con otras fallas medulares.

Lo ideal era realizar un estudio piloto para poder calcular el tamaño de muestra, sin embargo, por cuestiones de recursos no fue posible hacer esto antes de llevar a cabo el estudio.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas y nominales se describieron en términos de proporciones, las variables cuantitativas se describieron mediante mediana y cuartiles. Para la comparación entre grupos se utilizó la U de Mann-Whitney (para variables categóricas), por la distribución no normal.

Empleamos Kruskal Wallis (análisis post-hoc con método de Scheffé) para ver si existen diferencias en las concentraciones de HMGB1 y las citocinas que se liberan cuando estimula al TLRs (IL-1 β , IL-8, IL-6 Y TNF- α) entre SMD, AA, HPN y personas sanas.

Se consideraron valores de p significativos ≤ 0.05 . Los datos se analizaron con apoyo del programa STATA versión 14.

Resultados

Se reclutaron pacientes con SMD (n=66), AA (n=27), HPN (n=17) y controles ajustados por edad (+/- 5 años) y sexo sin patología hematológica (n=65).

Los controles con una mediana de edad de 69 años (IQR: 62-76 años), 58% mujeres (n=38) y 41.54% de hombre (n=27); con las siguientes enfermedades: hipertensión arterial sistémica (n=29, 44.62%), diabetes mellitus tipo 2 (n=16, 24.62%), hipotiroidismo (n=13, 20%), dislipidemia (n=16, 24.62%), insuficiencia cardíaca estable (n=6, 9.23%) y osteoporosis (n=7, 10.77%). Los controles con peso (mediana 65.5kg, RIQ: 50.5-77kg), talla (mediana 1.58m, RIQ: 1.51-1.66m), presión arterial sistémica sistólica (mediana 120mmHg, RIQ: 120-130mmHg) y diastólica (mediana 80mmHg, RIQ: 70-80mmHg) dentro la normalidad. Se realizaron estudios de laboratorio a los controles con los siguientes resultados: glucosa (mediana 96mg/dl, RIQ: 89-106mg/dl), hemoglobina (mediana 15g/dl, RIQ: 14.2-16.1 g/dl), neutrófilos totales (mediana 3111, RIQ: 2622-3960), plaquetas (mediana 228 000, RIQ: 202 000-268 000), creatinina (mediana 0.74mg/dl, RIQ: 0.65-0.94mg/dl), bilirrubinas totales (mediana 0.59mg/dl, RIQ: 0.49-0.76mg/dl), aspartato amino transferasa (mediana 19U/L, RIQ: 16-23U/L), alanina amino transferasa (mediana 16.7U/L, RIQ: 13-22U/L), triglicéridos (mediana 114mg/dl, RIQ: 96-166mg/dl) y colesterol total (mediana 166mg/dl, RIQ: 141-200mg/dl).

Los pacientes con SMD (n=66) tuvieron una mediana de edad de 67.87 años (RIQ: 61-76 años), 59.09% mujeres (n=39) y 40.91% hombres (n=27), por clasificación de la OMS 2016 el 92.42% quedo dentro de SMD-DU(displasia unilínaje)/DM(displasia multilínaje)/SA(sideroblastos en anillo) y del 5q (n=61) y el 7.57% fueron SMD-EB(exceso de blastos) (n=5), en cuanto al riesgo por IPSS-R el 59.09% son de riesgo muy bajo y bajo (n=39) y el 40.91% de riesgo intermedio/alto y muy alto (n=27); dentro del grupo de riesgo muy bajo, bajo e intermedio se calculó el LRPSS obteniendo un 80% de 0-4 puntos (n=48) y un 20% ≥ 5 puntos (n=12). El 21.21% (n=14) con la médula ósea hipocelular, 24.24% (n=16) normocelular y 54.54% (n=36) hipercelular. De todos los SMD el 56.06% (n=37) no se encontraban bajo tratamiento y un 13.64% (n=9) tenían alguna enfermedad reumatológica (**tabla 3**).

Tabla 3. Características de Pacientes con SMD	
	SMD n=66 Frecuencias n (%)
Edad mediana años (IQR)	67.87 (61-76)
Género	
*Mujeres	39 (59.09)
*Hombres	27 (40.91)
Tipo de SMD	
*SMD-DU/DM/SA/del5q	61 (92.42)
*SMD-EB	5 (7.57)
Riesgo R-IPSS	
*Muy bajo/Bajo	39 (59.09)
*Intermedio/Alto/Muy alto	27 (40.91)
Riesgo por LRIPSS (solo en el grupo de riesgo muy bajo, bajo e intermedio)	
*0-4	48 (80%)
*≥5	12 (20%)
Tratamiento	
*Si	29 (43.94)
*No	37 (56.06)
Enfermedad reumatológica	
*Si	9 (13.64)
*No	57 (86.36)

Tabla 3. Descripción de las características clínicas de los pacientes con SMD.

A través del análisis bivariado encontramos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de HMGB1, IL-1 β , IL-8 y TNF- α ($p=0.0001$, $p=0.0002$, $p=0.001$ y $p=0.0001$, respectivamente) entre los diferentes grupos. En el análisis post-hoc mediante el método de Scheffé se observó que HMGB1 es diferente con cada uno de los grupos (**tabla 4 y figura 5**), la IL-1 β e IL-8 no mostraron diferencia en el análisis post-hoc. El TNF- α tuvo concentraciones plasmáticas mayores (**tabla 4**) en el grupo de controles sanos vs el resto de las fallas medulares (Scheffé: $p=0.003$ SMD, $p=0.002$ AA, $p=0.009$ HPN), pero no hubo diferencias entre los grupos de falla medular mediante el análisis por Scheffé. Se encontró una correlación positiva entre HMGB1 e IL-1 β ($r=0.43$, $p=0.0002$); y HMGB1 e IL-8 ($r=0.57$, $p=0.0001$).

Tabla 4. Concentraciones de HMGB1 en Fallas medulares					
Mediana (RIQ)	SMD n=66	AA n=27	HPN n=17	Sanos n=65	p
HMGB1 ng/ml	4.93 (2.30-8.05)	2.57 (1.72-3.69)	1.66 (0.93-2.54)	1.92 (0.87-2.48)	0.0001
IL-1 β pg/ml	0.36 (0.27-0.51)	0.23 (0.19-0.34)	0.21 (0.15-0.29)	0.19 (0.16-0.36)	0.0002
IL-8 pg/ml	8.26 (3.70-13.98)	4.31 (2.19-9.31)	2.28 (1.44-6.84)	4.41 (2.21-8.16)	0.0010
IL-6 pg/ml	1.60 (0.98-3.04)	1.38 (1.15-1.99)	1.59 (0.71-4.65)	1.85 (1.11-3.96)	0.4008
TNF- α	3.94 (3.25-5.42)	3.52 (2.36-4.91)	2.86 (2.11-4.77)	6.53 (4.50-9.62)	0.0001

Kruskal Wallis, $p<0.05$

Scheffé HMGB1 (SMD vs AA, $p=0.002$), (SMD vs HPN, $p<0.001$), (SMD vs Sanos, $p<0.001$)

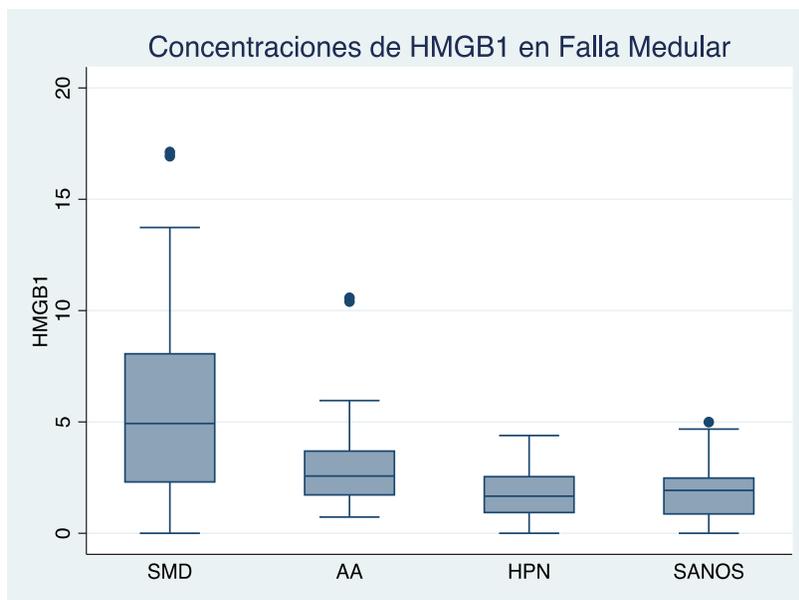


Figura 5. Concentraciones de HMGB1 en SMD, AA, HPN y sanos

Se realizó una comparación de las concentraciones plasmáticas de HMGB1, IL-1 β , IL-8, IL-6 y TNF- α entre SMD y un grupo de pacientes con proceso infeccioso (n=5), debido se conoce el importante papel que HMGB1 juega en sepsis; se reportaron los siguientes resultados: HMGB1 (mediana en SMD de 4.93ng/ml, RIQ: 2.30-8.05ng/ml vs mediana en sepsis de 6.79ng/ml, RIQ: 5.5-10.18ng/ml, p=0.2206); IL-1 β (mediana en SMD 0.36 pg/ml, RIQ: 0.27-0.51pg/ml vs mediana en sepsis de 0.40pg/ml, RIQ: 0.26-0.45pg/ml, p=0.8927); IL-8 (mediana en SMD de 8.26pg/ml, RIQ: 3.70-13.98pg/ml vs mediana en sepsis 22.24pg/ml, RIQ: 8.77-126.9pg/ml, p=0.0506); IL-6 (mediana en SMD 1.60pg/ml, RIQ: 0.98-3.04pg/ml vs mediana en sepsis 9.05pg/ml, RIQ: 5.22-9.97pg/ml, p=0.0328) y TNF- α (mediana en SMD 3.94pg/ml, RIQ: 3.25-5.42pg/ml vs mediana en sepsis 9.31pg/ml, RIQ: 8.54-11.26pg/ml, p=0.0118) (tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de HMGB1 en SMD vs Sepsis			
Mediana (RIQ)	SMD n=66	Infección n=5	p
HMGB1 ng/ml	4.93 (2.30-8.05)	6.79 (5.5-10.18)	0.2206
IL-1 β pg/ml	0.36 (0.27-0.51)	0.40 (0.26-0.45)	0.8927
IL-8 pg/ml	8.26 (3.70-13.98)	22.24 (8.77-126.9)	0.0506
IL-6 pg/ml	1.60 (0.98-3.04)	9.05 (5.22-9.97)	0.0328
TNF- α	3.94 (3.25-5.42)	9.31 (8.54-11.26)	0.0118

Mann-Whitney, p<0.05

En la **tabla 6** se pueden observar los resultados de las concentraciones de HMGB1 en el grupo de SMD de acuerdo a diferentes características, de las cuales destacan: los pacientes de riesgo muy bajo y bajo tuvieron concentraciones plasmáticas mayores de HMGB1 que el grupo de riesgo intermedio, alto y muy alto (mediana 6.19ng/ml, RIQ: 2.91-8.58ng/ml, vs mediana 3.08ng/ml, RIQ: 2.12-6.38ng/ml, p=0.046 respectivamente); el grupo de SMD sin tratamiento presentó concentraciones plasmáticas mayores de HMGB1 que el grupo con tratamiento (mediana 5.80ng/ml, IQR: 2.91-9.44ng/ml vs mediana 3.32ng/ml, RIQ:

2.12-6.38ng/ml, $p=0.044$ respectivamente) y no se encontraron diferencias si existía la presencia de enfermedad reumatológica ($p=0.851$).

Tabla 6. Concentraciones de HMGB1 en SMD		
	HMGB1 Mediana (RIQ)	p
Tipo de SMD OMS 2016 *SMD-DU/DM/SA/-5q *SMD-EB/LMA-SMD	5.33 (2.35-8.19) 3.04 (1.70-4.65)	0.073
Riesgo R-IPSS *Muy Bajo/Bajo *Intermedio/Alto/Muy alto	6.19 (2.91-8.58) 3.08 (2.12-6.38)	0.046
Riesgo por LRPSS *0-4 * ≥ 5	6.00 (2.61-8.51) 3.00 (2.12-5.85)	0.085
Celularidad **Hipercelular **Normocelular **Hipocelular	4.02 (2.07-8.35) 5.39 (3.14-8.94) 5.60 (2.79-7.32)	0.648
Tratamiento *Si *No	3.32 (2.12-6.38) 5.80 (2.91-9.44)	0.044
Enfermedad Reumatológica *Si *No	4.93 (2.48-8.58) 4.98 (2.30-7.81)	0.851

*Mann-Whitney, $p < 0.05$

**Kruskal-Wallis, $p < 0.05$

Al comparar las concentraciones plasmáticas de HMGB1 de los pacientes con SMD hipocelular contra pacientes con AA encontramos mayores concentraciones en SMD ($n=14$, mediana 5.60ng/ml, RIQ: 2.79-7.32ng/ml vs mediana 2.57ng/ml, RIQ: 1.72-3.69ng/ml, $p=0.006$, respectivamente) (**figura 6**).

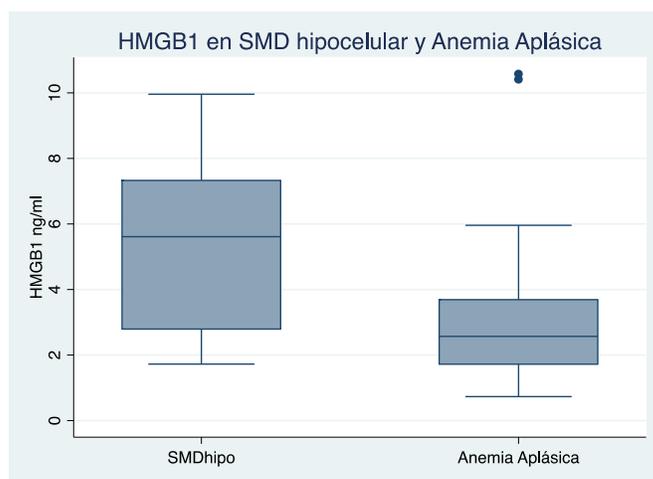


Figura 6. Concentraciones de HMGB1 en SMD hipocelular vs AA

Discusión y Conclusiones

El SMD se genera por mutaciones en la célula progenitora hematopoyética, la influencia del microambiente inflamatorio permite una ventaja en la supervivencia de la clona mutada sobre el resto del compartimento normal, provocando una hematopoyesis ineficaz manifestada por anemia, trombocitopenia y neutropenia, así como transformación a leucemia mieloide aguda a través del tiempo³¹. Cada vez es más relevante el papel del sistema inmune innato en la fisiopatología de SMD, uno de los receptores que forman parte de la inmunidad innata y que se encuentran alterados en las células de SMD son los TLR⁴¹. Los TLR (excepto el TLR3) permiten la activación de NF- κ B, activación de proteínas cinasas como proteína cinasa activada por mitógenos (MAPKs) e inducción de citocinas inflamatorias⁴². Los TLR están relacionados de forma directa con el desarrollo de la célula progenitora hematopoyética^{33 31}. Recientes investigaciones han identificado expresiones aberrantes en el proceso de señalización de los TLR en SMD que impactan de forma negativa en la función de la célula progenitora hematopoyética; algunos investigadores encontraron que las células CD34⁺ de pacientes con SMD sobre-expresan TLR2, TLR4 y MYD88 en comparación con controles sanos^{43 44}. Es razonable pensar que alteraciones en el funcionamiento de los TLR provocará disrupción en la hematopoyesis. La estimulación de células CD34⁺ de la médula ósea con agonistas de TLR2 (por ejemplo, IL-8) provoca eritropoyesis inefectiva y si se bloquea este efecto, la hematopoyesis se recupera⁴⁴.

Las moléculas que activan los TLR son los DAMPS y PAMPS; uno de los DAMPS poco estudiado en SMD y que podría estar relacionado con su fisiopatología es HMGB1. Kam et al, demostraron que la expresión HMGB1 a través del ARNm y del análisis de inmunofluorescencia era de 2-3 veces mayor en líneas celulares de SMD y las CD34⁺ de pacientes con SMD que en células de cordón umbilical o médulas sanas. Reportaron además que TLR2, TLR4, TLR6 y TLR 9 se expresan de 7 a 24 veces más en CD34⁺ de SMD. También bloquearon HMGB1 y al hacerlo disminuía la expansión de las unidades formadoras de colonia hasta en un 40% y se normalizaba la expresión aberrante de los TLR⁴¹.

Nosotros demostramos que ha diferencia de otras fallas medulares y controles sanos ajustados por edad y sexo, los pacientes con SMD tienen mayores concentraciones plasmáticas de HMGB1, esto nos permite establecer que no es un epifenómeno y debido a que es una molécula que se encuentra en concentraciones mayores en SMD que AA y HPN podría jugar un papel en su fisiopatología. En cuanto a los controles sin patología hematológica se sabe que ha mayor edad menores concentraciones de HMGB1 (Jóvenes 24.6 años \pm 2.72, 226.80ng/ml \pm 118; adultos 41 años \pm 3.81, 212.80ng/ml \pm 121.7 y adultos mayores 68.45años \pm 3.01, 175.40ng/ml \pm 54.37)⁸, por lo tanto, al encontrar HMGB1 incrementada en pacientes con SMD en comparación con un grupo de la misma edad, podemos suponer que HMGB1 participa en el proceso de desarrollo del SMD.

HMGB1 se podría convertir en un blanco terapéutico; actualmente se encuentran realizando un ensayo clínico de una molécula (CX-01) que inhibe a HMGB1 en combinación con azacitidina (NCT02995655)³⁷.

En nuestro estudio medimos algunas de las citocinas que se producen al estimular los TLR en los que actúa HMGB1; pero no se encontraron diferencias en el análisis post-hoc entre los grupos, esto se puede explicar por el tamaño de la muestra. En el análisis bivariado de los diferentes grupos, IL1- β e IL-8 tuvieron mayores concentraciones en SMD; además se encontró una correlación positiva de las concentraciones de HMGB1 con IL1- β e IL-8. Para la IL-6 no hubo diferencias, y el FNT- α fue mayor en el grupo de controles sin enfermedad hematológica. En la literatura existe información inconsistente en cuanto a los perfiles de citocinas que reflejan la disregulación inmune de pacientes con SMD; Shi X et al, realizaron un metanálisis en el 2019 donde incluyeron 11 estudios, fueron 511 pacientes con SMD y 186 controles sanos; mediante un análisis forest plots reportaron niveles elevados de TNF- α 1.48 (IC 95%: 0.60-2.36), IL-6 0.71 (IC 95%: 0.16-1.25) e IL-8 0.69 (IC 95%: 0.28-1.09) en pacientes con SMD⁴⁵. En nuestro estudio no encontramos diferencias en las concentraciones de IL-6, y las concentraciones de FNT- α fueron mayores en los controles sin patología hematológica; esto se puede explicar porque que este grupo se ajustó por edad para evitar sesgos en la medición de HMGB1 y el grupo de controles sin enfermedad hematológica presentó patologías relacionadas con síndrome metabólico como: hipertensión arterial sistémica (44.62%), diabetes mellitus (24.62%), dislipidemia (24.62%) e IMC con una mediana de 26.10m²/kg. Popko K, et al encontraron que las concentraciones de IL-6 y FNT- α son mayores en pacientes con obesidad (IMC>25m²/kg) y diabéticos tipo 2 comparados con controles sanos ($p < 0.001$)⁴⁶.

Por otro lado, los niveles de IL-8 e IL-1 β se encuentran elevados en los pacientes con SMD, realizamos como parte de nuestro estudio una comparación de los niveles de HMGB1, IL8, IL-1 β , IL-6 y TNF- α contra pacientes con sepsis, encontrando que no existen diferencias en las concentraciones de las primeras tres citocinas que fueron las que se reportamos mayores en el grupo de SMD con respecto al resto de los grupos. Consideramos este punto relevante debido a que en los últimos años se sabe la importancia que tiene HMGB1 en sepsis; se ha descrito como un marcador inflamatorio que se libera desde el inicio de la sepsis, persiste a lo largo del tiempo y se asocia con menor supervivencia^{1 47}.

En nuestro estudio en pacientes con SMD de riesgo bajo y muy bajo encontramos mayores concentraciones plasmáticas de HMGB1 al compararlos con riesgo intermedio, alto y muy alto, (no descrito en los dos estudios previos de SMD y HMGB1); lo cual apoya que el sistema inmune innato juega un papel en las fases iniciales de la enfermedad, favoreciendo la hematopoyesis ineficaz mediada principalmente por apoptosis y piroptosis. HMGB1 al igual que otros DAMPS activa los TLR permitiendo la producción de radicales libres, que activan al inflamosoma (NLRP3) que a su vez favorece la activación de la caspasa 1, involucrada con la muerte celular mediada por pyroptosis³¹. En SMD de riesgo bajo la principal causa de las citopenias es la muerte celular por apoptosis mediante la vía extrínseca que provoca hematopoyesis inefectiva; Valdés et al, demostraron en un estudio de ratones con anemia por sepsis que los niveles de HGMB1 estaban incrementados y que al momento de emplear un anticuerpo monoclonal para inhibir a HMGB1 los niveles de hemoglobina incrementaron⁴⁸. Además HMGB1 a nivel citoplasmático es una proteína que se encuentra involucrada en el proceso de

autofagia; en estudios de ratones donde se elimina parte de la maquinaria de la autofagia en el sistema hematopoyético se desarrolla anemia, linfopenia y mieloproliferación atípica; en otras palabras cuando dejas al sistema hematopoyético sin autofagia las células muestran daño mitocondrial y una mayor cantidad de radicales libres, lo que permite proliferación y apoptosis; situación que vemos en pacientes con SMD⁴⁹. Sin embargo, para demostrar que HMGB1 participa en la fisiopatología de SMD es necesario realizar estudios en animales o en cultivos celulares.

Otro punto relevante de nuestro estudio es que reportamos mayores concentraciones de HMGB1 en pacientes con SMD hipocelular en comparación con pacientes con anemia aplásica. El diagnóstico diferencial entre estas dos entidades es complejo debido a que se emplea para el SMD hipocelular el mismo punto de corte para definir hipocelularidad (<25%) que en los criterios de anemia aplásica; algunos autores consideran que un cariotipo normal es diagnóstico de anemia aplásica, pero esto es controversial, en algunos estudios se ha documentado que la presencia de determinadas anormalidades cromosómicas (por ejemplo, trisomía 8) son compatibles con anemia aplásica⁵⁰. Solo el 50% de los cariotipos son anormales en SMD, por lo tanto, un cariotipo normal no excluye el diagnóstico⁵⁰. La presencia de dismegacariopoyesis y disgranulopoyesis son altamente específicas de SMD hipocelular, sin embargo, es un dato subjetivo y que depende de la variabilidad intra-observadores⁵¹. Debido a que en este estudio reportamos que HMGB1 se encuentra en mayores concentraciones en SMD hipocelular que en anemia aplásica, podría estudiarse como una herramienta para apoyar el diagnóstico diferencial de ambas entidades.

Con respecto al papel que juega HMGB1 en la fisiopatología de SMD quedan muchas interrogantes por resolver incluyendo:

- 1) ¿En que receptor actúa HMGB1 sobre la célula progenitora hematopoyética de pacientes con SMD?
- 2) ¿Tendrá algún impacto HMGB1 en el pronóstico de pacientes con SMD?
- 3) ¿Puede favorecer HMGB1 el daño del ADN?

Como conclusión, nuestro estudio demuestra que la presencia de HGMB1 en SMD no es un epifenómeno, al encontrar concentraciones plasmáticas mayores que otro tipo de fallas medulares (AA y HPN) con las que comparte manifestaciones clínicas, citogenéticas y patológicas. Además, encontramos que HMGB1 es mayor en el paciente con SMD de riesgo bajo en comparación con el de riesgo alto; esto se puede explicar por el papel que el sistema inmune innato juega en los pacientes con SMD de riesgo bajo. Se desconoce si HMGB1 participa en la fisiopatología de SMD; pero se sabe que HMGB1 juega un papel importante en sepsis; nosotros no encontramos diferencias de las concentraciones de HGMB1 en SMD al compararlo con un grupo de pacientes con sepsis. Finalmente encontramos que HMGB1 es mayor en SMD

hipocelular en comparación con AA, podríamos valorar en estudios futuros si es una herramienta de diagnóstico diferencial.

Bibliografia

1. Kang R, Chen R, Zhang Q, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med* 2014;401–116.
2. Campos EI, Reinberg D. Histones: Annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 2009;43:559–599.
3. Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: Dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(5 SPEC. ISS.):496–506.
4. Goodwin GH, Johns EW. with Acids. 1973;219:215–219.
5. Bustin M. Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19(8):5237–5246.
6. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5(4):331–342.
7. Seyedin SM, Pehrson JR, Cole RD. HMG2-0 HII- HII-. 1981;78(10):5988–5992.
8. Fu GX, Chen AF, Zhong Y, Zhao J, Gu YJ. Decreased serum level of HMGB1 and MyD88 during human aging progress in healthy individuals. *Aging Clin Exp Res* 2016;28(2):175–180.
9. Tang D, Kang R, Livesey KM, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol* 2010;190(5):881–892.
10. Gerlitz G, Hock R, Ueda T, Bustin M. The dynamics of HMG protein–chromatin interactions in living cells This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB's 51st Annual Meeting – Epigenetics and Chromatin Dynamics, and has undergone the Journal's usual. *Biochem Cell Biol* 2009;87(1):127–137.
11. Hoppe G, Talcott KE, Bhattacharya SK, Crabb JW, Sears JE. Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp Cell Res* 2006;312(18):3526–3538.
12. Celona B, Weiner A, Di Felice F, et al. Substantial Histone reduction modulates Genomewide nucleosomal occupancy and global transcriptional output. *PLoS Biol*;9(6):.
13. Lee H, Shin N, Song M, et al. Analysis of nuclear high mobility group box 1 (HMGB1)-binding proteins in colon cancer cells: Clustering with proteins involved in secretion and extranuclear function. *J Proteome Res* 2010;9(9):4661–4670.
14. Takayanagi K, Mishima Y, Kominami R. Difference in HMG1-induced DNA bending among microsatellites. *DNA Res* 1997;4(3):241–247.
15. Lange SS, Mitchell DL, Vasquez KM. High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(30):10320–10325.
16. Downs JA. Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy. *Oncogene* 2007;26(56):7765–7772.
17. Passalacqua M, Zicca A, Sparatore B, Patrone M, Melloni E, Pontremoli S. Secretion and binding of HMGB1 protein to the external surface of the membrane are required for murine erythroleukemia

- cell differentiation. *FEBS Lett* 1997;400(3):275–279.
18. Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: A 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood* 1994;84(10):3494–3504.
 19. Davalos AR, Kawahara M, Malhotra GK, et al. p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol* 2013;201(4):613–629.
 20. He Q, You H, Li X, Liu T, Wang P, Wang B. HMGB1 Promotes the Synthesis of Pro-IL-1 β and Pro-IL-18.pdf. 2012;131365–1370.
 21. Friggeri A, Yang Y, Banerjee S, Park YJ, Liu G, Abraham E. HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the $\alpha\beta$ 3-integrin. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2010;299(6):1267–1276.
 22. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9(3):162–174.
 23. Yu Y, Tang D, Kang R. Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Front Physiol*;6(MAR):
 24. Chen G, Li J, Ochani M, et al. Bacterial endotoxin stimulates macrophages to release HMGB1 partly through CD14- and TNF-dependent mechanisms. *J Leukoc Biol* 2004;76(5):994–1001.
 25. Hui L, Yao Y, Wang S, et al. Inhibition of Janus kinase 2 and signal transduction and activator of transcription 3 protect against cecal ligation and puncture-induced multiple organ damage and mortality. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 2009;66(3):859–865.
 26. Livesey KM, Kang R, Vernon P, et al. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis. *Cancer Res* 2012;72(8):1996–2005.
 27. Conti L, Lanzardo S, Arigoni M, et al. The noninflammatory role of high mobility group box 1/toll-like receptor 2 axis in the self-renewal of mammary cancer stem cells. *FASEB J* 2013;27(12):4731–4744.
 28. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2018;93(1):129–147.
 29. Kurzrock R. Myelodysplastic syndrome overview. 2002. 18–25 p.
 30. Shallis RM, Ahmad R, Zeidan AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2018;101(3):260–271.
 31. Banerjee T, Calvi LM, Becker MW, Liesveld JL. Flaming and fanning: The Spectrum of inflammatory influences in myelodysplastic syndromes. *Blood Rev* 2019;3657–69.
 32. Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* 2014;124(17):2705–2712.
 33. Sallman DA, List A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Blood* 2019;133(10):1039–1048.
 34. Barreyro L, Chlon TM, Starczynowski DT. Chronic immune response dysregulation in MDS

- pathogenesis. *Blood* 2018;132(15):1553–1560.
35. Pellagatti A, Boultonwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2015;95(1):3–15.
 36. Hofmann WK, De Vos S, Komor M, Hoelzer D, Wachsmann W, Phillip Koeffler H. Characterization of gene expression of CD34 + cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* 2002;100(10):3553–3560.
 37. Sallman DA, Tanaka TN, List A, Bejar R. SOHO State of the Art Update and Next Questions: Biology and Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 2017;17(10):613–620.
 38. Walter D, Lier A, Geiselhart A, et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature* 2015;520(7548):549–552.
 39. Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2008;22(3):538–543.
 40. Velegraki M, Papakonstanti E, Mavroudi I, et al. Impaired clearance of apoptotic cells leads to HMGB1 release in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes and induces TLR4-mediated cytokine production. *Haematologica* 2013;98(8):1206–1215.
 41. Steven H.Swerdlow, Elias Campos NLH. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. 2017. 9980–9989 p.
 42. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Transl Res* 2013;161(1):1–14.
 43. Maratheftis CI, Andreacos E, Moutsopoulos HM, Voulgarelis M. Toll-like receptor-4 is up-regulated in hematopoietic progenitor cells and contributes to increased apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1154–1160.
 44. Dimicoli S, Wei Y, Bueso-Ramos C, et al. Overexpression of the Toll-Like Receptor (TLR) Signaling Adaptor MYD88, but Lack of Genetic Mutation, in Myelodysplastic Syndromes. *PLoS One*;8(8):.
 45. Shi X, Zheng Y, Xu L, Cao C, Dong B, Chen X. The inflammatory cytokine profile of myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(22):e15844.
 46. Popko1 K, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, et al. EUROPEAN JOUPROINFLAMMATORY CytOKINES IL-6 AND tNF- α AND THE DEVELOPMENT OF INFLAMMATION IN OBESE SUBJECTS K.RNAL OF MEDICAL RESEARCH. *Eur J Med Res* 2010;15(Suppl. II):120–122.
 47. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMGB-1 as a Late Mediator of Endotoxin. *Science (80-)* 1999;285(July):248–251.
 48. Valdés-Ferrer SI, Papoin J, Dancho ME, et al. HMGB1 mediates anemia of inflammation in murine sepsis survivors. *Mol Med* 2015;21(7):951–958.
 49. Xu T, Jiang L, Wang Z. The progression of hmgb1-induced autophagy in cancer biology. *Onco Targets*

Ther 2019;12365–377.

50. Toegang H, Toegang H. H 2019. 2019;452(215):1–45.
51. Bono E, McLornan D, Travaglino E, et al. Clinical, histopathological and molecular characterization of hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2019;33(10):2495–2505.