



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“ANÁLISIS INMUNOABSORBENTE UNIDO A
ENZIMA (ELISA) DE LA PROTEÍNA DE ESTRÉS
FISIOLÓGICO MICA EN EL SUERO DE PACIENTES
CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA Y MIELOIDE
HUMANA”**

T E S I S

Para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

Presenta:

Sergio Pacheco Marin

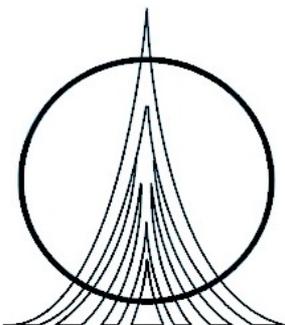
Director. Dr. Jorge Flavio Mendoza rincón

Asesora: Dra. Ma. Isabel Soto Cruz

México, D.F

28

AGOSTO, 2006



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

A mi padre Andres Pacheco Bautista

- por creer siempre en nosotros
- por tu espíritu de lucha
- por tus enseñanzas hacia la vida
- por verte siempre fuerte
- por el cariño que tienes hacia nosotros
- gracias muchas gracias.

A mi madre Teodora Marin Blanco

- por tu ímpetu hacia la vida
- por tus desvelos y correcciones
- por tu fuerza que nos proyectas
- por el cariño que siempre tienes para nosotros
- gracias muchas gracias

A mis hermanos

Andres Pacheco Marin

Rosario Pacheco Marin

- por que siempre estemos juntos
- por soportarme hasta hoy
- por todos los días que vivimos juntos
- gracias por su cariño y comprensión
- Gracias muchas gracias

A todos y todas mis tios

- por el cariño que muestran a mi familia
- por la amistad que me dan sin ninguna condición
- y porque sigamos realizando fiestas como hasta hoy
- Gracias ha todos

A mis abuelos

Juventina Bautista

Manuel Pacheco

- por el poder de vida que me hacen ver y sentir
- a mi abuela por su chocolate caliente cuando era niño
- por su cuidado cuando era niño, cuando mi papá trabajaba
- y por sus curaciones maravillosas
- Gracias muchas gracias

A mi esposa

Olivia Padilla Cadena

-por tu fuerza de formar una familia
-por tu estabilidad como persona
-y por el apoyo incondicional que me das.
TE AMO MUCHO GORDITA

A mis hijos

Uriel Pacheco Padilla
Ivonne Evelin Pacheco Padilla

-por darme una alegría más en la vida
-los quiero mucho a los dos, mis hijos
Gracias por sus graciosadas

AGRADECIMIENTOS

A mi universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de una formación académica a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

De manera muy especial al DR. Jorge Flavio Mendoza por su apoyo incondicional y consejos, así también por su confianza que tuvo hacia mí. También admiro su trayectoria académica. Gracias profesor. También esperando que se sigan cumpliendo sus proyectos de vida con su familia. Felicidades.

A mis sinodales

Porque todos ustedes me dieron clases en la carrera:

Profesora (o):

Martha-genética

Claudia-computación

Ma. Isabel- Bioquímica

Ruben-Imunología

Gracias por sus espíritu de enseñanza, los recordare siempre como los mejores profesores.

-A todos los profesores que me enseñaron durante la carrera. Muchas gracias

Y a todas las personas que de una u otra forma han participado en mi formación, gracias ha todos ellos.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS | 5 |
| 3.1 Definición de las leucemias agudas | 5 |
| 3.2 Etiología | 6 |
| 3.3 Clasificación | 6 |
| 3.3.1 Clasificación morfológica | 6 |
| 3.3.2 Clasificación inmunológica | 8 |
| 3.3.3 Clasificación citogenética | 8 |
| 3.4 Cuadro clínico | 8 |
| 3.5 Diagnóstico | 9 |
| 3.6 Tratamiento | 10 |
| 3.7 Aspectos inmunológicos | 10 |
| 3.7.1 Inmunidad innata | 10 |
| 3.7.1.1 Definición | 10 |
| 3.7.1.2 Mecanismos de la inmunidad innata | 11 |
| 3.7.1.3 Inmunidad adquirida o inmunidad específica | 11 |
| 3.8 Los genes MIC | 12 |
| 3.9 Características moleculares | 13 |
| 3.10 Polimorfismo de los genes MICA y MICB | 15 |
| 3.11 Tipos celulares donde se expresan | 16 |
| 3.12 Expresión de MICA Y MICB: Asociación con estrés fisiológico en células epiteliales | 18 |
| 3.13 NKG2D | 18 |
| 3.14 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) | 21 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 24 |
| 5. OBJETIVOS | 25 |
| 5.1 Objetivos generales | 25 |
| 5.2 Objetivos particulares | 25 |
| 6. HIPOTESIS | 26 |
| 7. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS | 27 |
| 8. MÉTODOS | 29 |
| 8.1 ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) | 29 |
| 8.2 Determinación de la proteína MICA en suero | 30 |
| 8.3 Método estadístico | 31 |
| 9. RESULTADOS | 32 |
| 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 39 |
| 11. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 12. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 48 |
| 13. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES | 50 |
| 14. REFERENCIAS | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Clasificación morfológica de las leucemias agudas | 7 |
| Tabla 2. Concentración de rhMICA | 32 |
| Tabla 3. Incubaciones | 33 |
| Tabla 4. Anticuerpo monoclonal primario | 33 |
| Tabla 5. Anticuerpo secundario | 34 |
| Tabla 6. Concentraciones de las proteínas MICA | 34 |
| Tabla 7. Resultados Leucemias Agudas Mieloblástica | 35 |
| Tabla 8. Resultados Leucemia Aguda Linfoblástica | 36 |
| Tabla 9. Pacientes control (sin diagnóstico de leucemia) | 37 |
| Tabla 10. Resultados de proteína MICA entre LAL y Px. control | 39 |
| Tabla 11. Resultados de proteína MICA entre LAM y Px. control | 41 |
| Tabla 12. Concentraciones de anticuerpo 1^{ro} y 2^{ro} | 46 |

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

| | |
|--|-----------|
| Diagrama 1. Mecanismos por los cuales actúa la inmunidad innata | 11 |
|--|-----------|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Estructura cristalográfica de MICA | 13 |
| Figura 2. Localización de los genes MIC en el cromosoma | 16 |
| Figura 3. Estructura cristalográfica del complejo formado entre NKG2D y MICA | 17 |
| Figura 4. Ubicación del gen que codifica para el receptor NKG2D | 19 |
| Figura 5. Evasión tumoral del sistema inmune | 21 |
| Figura 6. Técnica de ELISA | 23 |
| Figura 7. Representación grafica curva estándar | 38 |

TABLA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| a.a | Aminoácidos |
| ABTS | 3-3-5, 5 tetrametilbenzidina |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ARNm | ácido ribonucleico mensajero |
| ELISA | enzyme linked inmunosorbent assay |
| EP | Espondilitis Anquilosante |
| FAB | franco-estadounidense-británica |
| FESZ | Facultad de Estudios Superiores Zaragoza |
| HLA-B | Human Leukocyte Antigens-B |
| HLA-27 | Human Leukocyte Antigens-27 |
| HSP70 | Heat Shock Proteins-70 |
| I.I | Inmunidad Innata |
| IMSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| KDa | Kilodaltons |
| Kb | Kilobases |
| L-327 | Laboratorio-327 |
| LA | Leucemias agudas |
| LAL | Leucemias agudas linfoblásticas |
| LAM | Leucemias agudas mieloblásticas |
| MIC | MHC Class I Chain Related Genes |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| NK | Natural Killer |
| ng | Nanogramos |
| OPD | Ortofenilendiamina |
| Pg | Picogramos |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| Pb | Pares de bases |
| SSOP | plantillas moleculares específicas |
| rhMICA | proteína recombinante MICA |
| CD4+ | Designación del grupo (Cluster designation) 4+ |
| V. cholerae | Vibrio cholerae |
| WBC | Glóbulos blancos |

1. RESUMEN

Para el inicio de este trabajo de investigación primero nos dimos a la tarea de conseguir sueros de pacientes con leucemia, los sueros fueron proporcionados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) # 25. Usamos la técnica de ELISA (Análisis inmunoabsorbente ligado a enzima) para detectar la proteína de estrés fisiológico MICA en el suero de dichos pacientes. Para determinar la proteína MICA en el suero de pacientes con leucemias agudas linfoblásticas (LAL) y leucemias agudas mieloblásticas (LAM), primero se realizó la curva estándar y para encontrar la concentración más adecuada se realizaron varios ensayos con el objetivo de detectar los valores reportados en la literatura que oscilaban entre 5 hasta 2500 pg²³. Previamente, en trabajos realizados en el laboratorio de oncología se utilizaron concentraciones de proteína MICA (rhMICA) de 10 hasta 200ng/ml, estos valores se obtuvieron en ensayos con células de cáncer de cérvix⁴². Nosotros tomamos estos valores como punto de partida. Los datos más adecuados de la rhMICA que se emplearon para este trabajo fueron de 0.1ng hasta 100 ng (ver tabla 1 ensayo 3). Se procedió enseguida a determinar la proteína de estrés fisiológico MICA en el suero de pacientes con leucemia y después de varios ensayos se logro obtener la metodología y condiciones favorables para la medición en suero de la proteína MICA, obteniéndose valores de la proteína mencionada en los pacientes con leucemia. Cabe resaltar que en estudios previos se ha utilizado preferentemente la técnica de ELISA para determinar la presencia de la proteína de estrés fisiológico MICA. Sin embargo, al tratar de reproducir dichas condiciones, nos percatamos que no eran aceptables. Por ejemplo se utilizaron sustratos empleados comúnmente como OPD, MBTH y observamos que eran bastante inestables, así mismo usamos leche descremada como solución de bloqueo en lugar de albúmina bovina que es común en la técnica de ELISA, la leche descremada resulto ser muy estable. Con respecto a la concentración de los anticuerpos primario y secundario los valores fueron de 1:100 y 1:4000 respectivamente, ya por último se utilizó el sustrato ABTS por su estabilidad. Recomendamos usar la técnica de ELISA porque sigue siendo muy importante en la inmunología para la detección de anticuerpos o antígenos, así también brinda una confiabilidad y reproducibilidad aceptable, sin olvidar su bajo costo.

2. INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a una sobreproducción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar normalmente. La palabra leucemia significa “sangre blanca” y el término “aguda” se conserva por razones históricas ya que anteriormente las LA era la causa más frecuente de muerte por neoplasia. En la segunda mitad del siglo XX, se realizaron avances importantes en el tratamiento de las leucemias agudas, que cambiaron de modo notable el concepto que prevalecía de que la palabra leucemia era sinónimo de muerte a muy corto plazo. Un término más adecuado que el de leucemia “aguda” sería el de leucemia “de blastos”, dado que en estos trastornos el tipo predominante de célula maligna proliferante es una célula inmadura poco diferenciada conocida como “blasto”. La letalidad media anual de las LA es de 3 a 5 casos por cada 100,000 habitantes. La causa precisa de las LA se desconoce. El conocimiento de la biología de los genes MIC hace apenas unos años y la expresión de las proteínas MICA se demostró en células de origen epitelial o fibroblástico. Aunque su función biológica de la expresión de esta proteína no era del todo clara. Estudios posteriores revelaron que puede considerarse como proteína de estrés fisiológico y tener alguna función en la respuesta inmune en una gran variedad de enfermedades por ejemplo: artritis reumatoide, procesos de cáncer de cérvix y últimamente en leucemias. Por otro lado descubiertos a principios de la década de los 70 por su habilidad de lisar células tumorales *in vivo*, las células NK (Natural Killer por sus siglas en inglés) han sido motivo de diversas investigaciones ya que son un componente integral de la inmunidad innata (no específica). Esta inmunidad es la primera línea de defensa que actúa contra una infección, material extraño etc., que invade el organismo, depende del contacto previo con el agente infectante y se genera después del contacto con dicho agente y es específica para el mismo. Como se ha mencionado

anteriormente esta inmunidad antecede a la inmunidad adquirida, no requiere de una exposición previa con el patógeno para su activación, no tiene memoria inmunológica, un privilegio de la inmunidad adquirida, por lo que no se modifica a lo largo de la vida del individuo, la inmunidad innata mediada por linfocitos NK exhibe un exquisito grado de especificidad³⁸. Por otro lado, la inmunidad adquirida o inmunidad específica responde un tiempo después de la inmunidad innata con la producción de anticuerpos y células en un peculiar estado de activación de esta manera reaccionan en forma específica con el antígeno inductor de su producción y todo esto se lleva a cabo de buena manera y fundamentalmente al apropiado funcionamiento del sistema inmunológico³⁸. Las células NK expresan receptores activadores e inhibidores que regulan su citotoxicidad. NKG2D es un receptor activador que reconoce a la molécula de superficie MICA, entre otros. La proteína MICA tiene una expresión restringida y regulada por estrés o infección, y se induce en los linfocitos T activados. Diversas células tumorales también expresan la proteína MICA. La búsqueda de nuevas secuencias codificadoras en la región cercana al locus HLA-B para dilucidar la asociación entre el HLA-B27 con enfermedades reumatoides e inflamatorias condujo al descubrimiento de una nueva familia, los genes MIC (MHC Class I Chain Related Genes, por sus siglas en inglés), que consisten en siete miembros, MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MIF Y MICG^{4,16,17,31,43}. De los cuales sólo MICA y MICB codifican para transcritos de ARNm. Los primeros estudios que se realizaron demostraron que las proteínas MIC son marcadores de estrés fisiológico como se menciono anteriormente y que su expresión se ve aumentada en infecciones virales y bacterianas, además se encontró que la presencia de las proteínas MIC está regulada por la expresión de la proteína de choque térmico HSP70^{19, 53}. Una importante forma de detección de las proteínas MIC es por la técnica de ELISA, esta fue descrita casi al mismo tiempo, en 1971, por dos equipos de trabajo diferentes, el de Engvall y Perlmann en Suecia y el de Van Weemen y Schuurs en Holanda^{9, 38}. Con esta técnica se puede detectar la proteína MIC en suero de pacientes con leucemias y la detección de la misma podría ayudar para el pronóstico y diagnóstico clínico, ya que de comprobarse que estas malignidades estén presentes de manera general

en pacientes que sufren estas patologías podría tener alguna asociación con el curso de la enfermedad. Por otro lado, el entender las condiciones para mantener el balance activación/inhibición del sistema de los linfocitos NK ayudaría en la clínica ya que representa la posibilidad de controlar los mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata de diversos microorganismos, como los virus, bacterias y dirigir estrategias para eliminar tumores, así como también bloquear receptores que prevengan el rechazo de tejidos transplantados³⁹.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 DEFINICIÓN DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

Es importante como los avances en el mundo de las leucemias han crecido y como es que ahora y después de muchas investigaciones, los científicos han permitido aplicar ese conocimiento en el diagnóstico y tratamiento. Por otro lado, porque no pensar que el trabajo que ahora se realiza en esta tesis repercutirá en un futuro. Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a una sobreproducción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar normalmente. Un dato interesante es que las células malignas individuales tienen una maduración a menudo prolongada y la mayoría de dichas células incompetentes sobrevive más que las normales, sin cumplir con su misión ordinaria. La palabra leucemia significa “sangre blanca” y el término “aguda” se conserva por razones históricas ya que en la segunda mitad del siglo XX, se realizaron avances importantes en el tratamiento de las leucemias agudas, que cambiaron de modo notable el concepto que prevalecía de que la palabra leucemia era sinónimo de muerte a muy corto plazo. Estos avances lograron que en la actualidad se curen casi todos los niños y aproximadamente un tercio de los adultos con LA linfoblástica. En el caso de las LA mieloblásticas, los avances terapéuticos han sido menos notables y las cifras de curación para niños y adultos oscilan en torno a 25 y 15%, respectivamente. Un término más adecuado que el de leucemia “aguda” sería el de leucemia “de blastos”, dado que en estos trastornos el tipo predominante de célula maligna proliferante es una célula inmadura poco diferenciada conocida como “blasto”. Por otro lado la proliferación descontrolada de estas células en la médula ósea, el desplazamiento de los precursores medulares normales y la invasión del resto de los órganos de la economía son los mecanismos principalmente responsables de los efectos devastadores de la enfermedad. La letalidad media anual de las LA es de 3 a 5 casos por cada 100,000 habitantes²².

3.2 ETIOLOGIA

La causa precisa de las Leucemias Agudas se desconoce.

La proliferación clonal por medio de divisiones sucesivas a partir de una célula progenitora constituye el origen de las leucemias agudas, tanto linfoblásticas como mieloblásticas. Algunas causas posibles se citan a continuación:

- es posible que algunos derivados del benceno desempeñe algún papel en la leucemogénesis.
- la exposición a radiaciones ionizantes.
- agentes que dañan el ADN como los medicamentos alquilantes.
- algunos virus pueden generar leucemias entre ellos a los retrovirus como HTLV-I Y HTLV-II que tienen semejanza con el virus HIV-1, agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
- los padecimientos en los que hay inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Fanconi, pueden culminar en leucemia aguda, y la prevalencia de este tipo de leucemia es mayor en individuos con trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down) que en la población general^{22, 34}.

3.3 CLASIFICACIÓN

La mejor clasificación que puede efectuarse de una LA es la:

- morfológica
- inmunológica
- citogenética

3.3.1 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

En 1976, un grupo internacional de investigadores (franceses, estadounidenses y británicos) propuso los criterios para realizar la clasificación morfológica de las LA, que las dividía en nueve tipos:

- 3 de estirpe linfoide
- 6 de estirpe mieloide.

Algunos años más tarde y ante el cúmulo de información generada por el uso de inmunoreactivos para estudiar y clasificar a las células leucémicas, los mismos miembros del grupo FAB agregaron 2 variedades más de leucemia mieloblástica: M0 y M7, las que estrictamente no se pueden diagnosticar sólo con bases puramente morfológicas, ya que requieren estudios adicionales para poder definir las. La tabla 1 describe los 11 tipos de LA que en la actualidad reconoce el grupo FAB. Una observación importante que se debe tener en consideración cuando se emplea la morfología panóptica convencional como medio único para efectuar la clasificación de las leucemias agudas, es que se pueden cometer errores diagnósticos, y en consecuencia terapéuticos, aproximadamente en 20% de los casos de LA. Por eso es importante el empleo de tinciones histoquímicas, de la clasificación inmunológica de las leucemias, de la citogenética y de la biología molecular y, en algunos casos, de la microscopía electrónica, para establecer con certeza la naturaleza de las células malignas y, por tanto, efectuar un diagnóstico preciso y un tratamiento adecuado.

| Tabla 1 Clasificación morfológica de las leucemias agudas. |
|---|
| Leucemias agudas linfoblásticas (LAL) |
| LA-L1: linfoblástica "típica" |
| LA-L2: linfoblástica "atípica" |
| LA-L3: parecida al linfoma de Burkitt |
| Leucemias agudas mieloblásticas (LAM) |
| LA-M0: mieloblástica diferenciada mínimamente |
| LA-M1: mieloblástica inmadura |
| LA-M2: mieloblástica madura |
| LA-M3: promielocítica hipergranular |
| LA-M4: mielomonoblástica |
| LA-M5: monoblástica pura |
| LA-M6: eritroleucemia |
| LA-M7: megacarioblástica |

3.3.2 CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA

Los marcadores inmunológicos, que identifican a las células por medio de sus características antigénicas, han permitido el estudio de las células hematopoyéticas y ahora es posible:

- a) reconocer estirpes o tipos celulares que difícilmente pueden clasificarse mediante métodos morfológicos y citoquímicos convencionales.
- b) Establecer subgrupos inmunológicos en poblaciones celulares normales y en su contraparte leucémica.
- c) Y por último definir poblaciones celulares con propiedades biológicas específicas.

Por lo tanto, mediante los métodos inmunológicos es posible reconocer antígenos en la membrana o en el citoplasma de las células, algunos de los cuales son específicos para diferentes poblaciones celulares específicas²².

3.3.3 CLASIFICACIÓN CITOGENÉTICA

En muchos casos de LA se encuentran alteraciones cromosómicas: en las LAM ocurren en más de 50% de los enfermos. Se han encontrado algunas correlaciones entre las anomalías cromosómicas y el tipo de leucemia aguda. Actualmente, es probable que las derivaciones terapéuticas prácticas más importantes en la clasificación de las LAM dependan de su clasificación citogenética, hecha preferentemente por métodos de biología molecular. En las LAL una alteración cromosómica frecuente es el cromosoma Filadelfia. El cromosoma Filadelfia aparece en 2% de los enfermos de LAL infantil e incluso en 25% de los casos adultos; su presencia se ha asociado con pronóstico sombrío^{22, 34}.

3.4 CUADRO CLÍNICO

Los pacientes que sufren LA se presentan con síndromes hemorrágicos, anémico o infiltrativo, aisladamente o en combinación. La anemia se debe también a invasión tumoral de medula ósea y habitualmente es mas grave en la leucemia linfoblástica. De manera interesante, la anemia grave es un dato de buen pronóstico en leucemia linfoblástica infantil. El síndrome infiltrativo supone

crecimiento de ganglios, bazo o hígado; las leucemias con componente monoblástico infiltran las encías con mayor frecuencia que las leucemias linfoblásticas. La expansión de la cavidad medular por la proliferación celular monoclonal puede causar dolores óseos^{22, 34}.

Las LAL de linfocitos T con frecuencia generan crecimiento del timo, visible en telerradiografías del tórax. Sólo la mitad de los enfermos con leucemia aguda muestra incremento en leucocitos; una cuarta parte tiene cifra de leucocitos en rangos normales y otra cuarta parte presenta disminución de glóbulos blancos. Es importante resaltar que nunca debe descartarse el diagnóstico de LA sólo porque la cuenta de glóbulos blancos sea normal^{22, 34}.

3.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de LA se establece por los análisis de laboratorio. Casi siempre se encuentra cierto grado de anemia y de trombocitopenia. El recuento leucocitario puede estar disminuido, normal o aumentado. Inevitablemente, se encuentran células blásticas en la extensión de sangre periférica, a menos que el recuento leucocitario esté notablemente disminuido. Se acepta que se requiere que mas de 30% de las células nucleadas de la médula ósea sean blastos para establecer el diagnóstico certero de LA. Algunos autores han señalado que basta evaluar el 20% de blastos para diagnosticar LA. Los cuerpos o bastones de Aür en las células leucémicas de sangre periférica o de médula ósea es suficiente para establecer el diagnóstico inequívoco de LAM. Es importante tener en cuenta que cuando existen dudas o cuando la invasión por blastos de la sangre periférica no es tan grave, debe hacerse el estudio de la médula ósea. Sin embargo es importante tener en cuenta que existe la biología molecular, empleando reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esto permite establecer el diagnóstico de leucemias agudas como su variedad, y la utilidad en el seguimiento de los pacientes para identificar la enfermedad residual mínima una vez que se ha logrado la remisión hematológica del padecimiento^{22, 34}.

3.6 TRATAMIENTO

Los medicamentos para el individuo con leucemia aguda tienen diversos efectos: agentes alquilante, antimetabolitos, sustancias que se fijan al ADN, inhibidores de la mitosis, inhibidores de la topoisomerasa II y medicamentos misceláneos como corticosteroides, L-asparaginasa, interferones, etcétera. Desde el punto de vista pronóstico, en términos generales, puede decirse que, con los tratamientos antileucémicos modernos, alrededor de 90% de los pacientes con LAL, sobre todo los niños, logran la remisión completa de la enfermedad y que más de 60% de ellos lograrán sobrevivir más de 5 años después del diagnóstico, libres de enfermedad. En cambio y como se menciono anteriormente, en el caso de los pacientes con LAM, la probabilidad de lograr la remisión completa es de 60 a 70% y la de supervivencia a 5 años es de aproximadamente 20%^{22, 34}.

3.7 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

3.7.1 INMUNIDAD INNATA

3.7.1.1 DEFINICIÓN

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra la infección. La inmunidad innata inespecífica es aquella que actúa contra cualquier material extraño que invade al organismo. Depende del contacto previo con el agente infectante y se genera después del contacto con dicho agente y es específica para el mismo. No deja memoria y es filogenéticamente más antigua que la inmunidad adquirida.

3.7.1.2 MECANISMOS DE LA INMUNIDAD INNATA

Los mecanismos por los cuales actúa la inmunidad innata (I.I) son variados y muy heterogéneos, se ha hecho el intento de agruparlos en diversas categorías. (Ver diagrama 1)

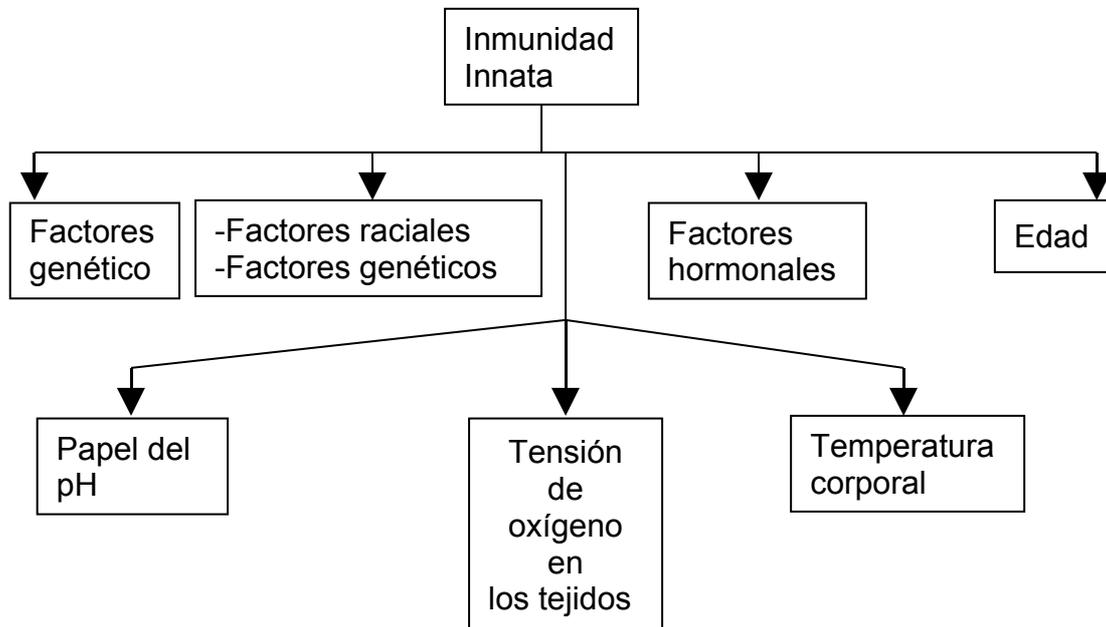


Diagrama 1. Mecanismos por los cuales actúa la inmunidad innata

3.7.1.3 INMUNIDAD ADQUIRIDA O INMUNIDAD ESPECÍFICA

Cuando un antígeno penetra (natural o artificialmente) al cuerpo de un animal inmunológicamente competente, este responde con producción de anticuerpos y de células en un peculiar estado de activación. Tanto los anticuerpos como las células reaccionan en forma específica con el antígeno inductor de su producción. La capacidad de un individuo para responder a la estimulación antigénica depende de varios factores, entre ellos y de manera fundamental, del funcionamiento apropiado de su aparato inmunológico. El aparato inmunológico está formado por una serie de órganos y sistemas que incluyen a los órganos linfoides y la circulación sanguínea y linfática.

3.8 LOS GENES MIC (MHC Class I Chain Related Genes)

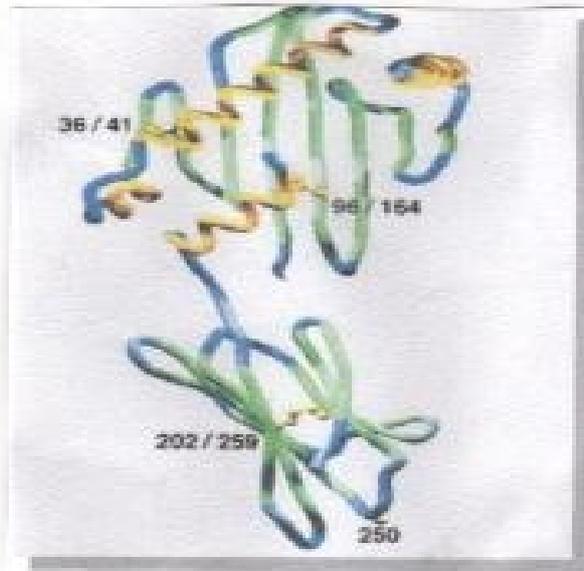


Figura 1. Estructura cristalográfica de MICA (Li P et al. 1999)

Resulta interesante el hecho de que los genes MIC se han conservados en la mayoría de los mamíferos excepto en los roedores¹³, lo cual sugiere que han seguido una misma línea evolutiva. Algunos estudios han comparado la secuencia de los genes MIC de humanos con primates y se ha encontrado una similitud que va del 86% al 97%⁴⁴. En contraste con el amplio conocimiento de los genes clásicos del MHC que han estado bajo intensa investigación, poco es lo que se conoce de los genes MIC. Recientemente se ha publicado su estructura⁷ y se han comenzado a hacer investigaciones en cuanto a la regulación de su expresión, su distribución en los tejidos y su variabilidad alélica^{4, 14, 36}.

3.9 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

Los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados y codifican para transcritos de 1382 y 2376 pares de bases (pb) respectivamente^{4, 14}. La molécula de MICA se codifica por un gene muy largo (si se compara con los 3.5 kb promedio del HLA) y poco común de 11722 pb que se encuentra localizado 46.5 kilobases (kb) centromérico del locus HLA-B; también MICB se codifica por un gene extenso de 12930 pb que está localizado a 83 kb centromérico de MICA¹⁸. La organización genómica de MICA y MICB es muy similar pero

diferente de otros genes de clase I². En ambos casos un extenso intrón de 6840 pb para MICA y 7352 pb para MICB separa los dos primeros exones. Adicionalmente aparece un sexto exón de 302 pb para MICA y de 1338 para MICB que codifica para la parte citoplasmática y para la secuencia 3' no traducida (3' UT). El exceso en la secuencia 3' UT es por lo tanto responsable de la diferencia de aproximadamente 1 kb de longitud entre los transcritos de MICA y MICB^{4, 19}. No existe prueba de alguna utilidad de estas singularidades. Como es de esperarse, el alto grado de similitud observado entre las regiones codificadoras de MICA y MICB se extiende a lo largo de ambos genes.

MICA codifica un transcrito de 1382 pb y MICB uno de 2376 pb, ambos con una marca abierta de lectura (open reading frame) de 1149 pb, que da origen a un polipéptido de 383 aa y con peso molecular de 43 kDa sin embargo el mensajero para MICB es un poco más largo debido a su región 3'UT. Ambos genes comparten una homología mayor al 90% en sus regiones codificadoras^{3, 4}.

Los genes MICA y MICB son similares en estructura, aunque si los comparamos con las moléculas del MHC de clase I sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios alfa 1 (α 1), alfa 2 (α 2) y alfa 3 (α 3)⁴.

A pesar de ello, se ha postulado que sus proteínas se pliegan de manera semejante a las moléculas MHC de clase I. La proteína madura contiene tres dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3) precedidos de un segmento transmembranal y una cola citoplasmática relativamente corta. Además, las moléculas de MICA y MICB no se asocian con la β 2-microglobulina para su expresión fisiológica en la superficie celular³³, sus niveles de RNAm no son afectados por interferón gama, que es un inductor clásico para las moléculas de clase I, son independientes de los transportadores TAP y muy probablemente no presenten antígenos⁷.

MICA y MICB son los miembros más divergentes de los genes humanos del MHC clase I identificados hasta el momento, y mediante análisis de "southern blot" se ha sugerido que MIC se conserva en la mayoría de las especies de mamíferos. La excepción más ubicua es el ratón en el que no se ha detectado la presencia de esta familia de genes en su genoma, aunque se cree que

posiblemente se encuentra su contraparte evolutiva que compensa su ausencia¹⁴.

El análisis filogenético de MICA sugiere que este gene divergió de los demás genes del MHC de clase I después de la aparición de los anfibios pero antes de la separación de mamíferos marsupiales y placentarios²⁹.

3.10 POLIMORFISMO DE LOS GENES MICA Y MICB

Los genes MICA y MICB han resultado ser altamente polimórficos^{2, 3, 14}. Al principio, mediante secuenciación de líneas celulares homocigotas, se identificaron 16 variantes alélicas para el gene MICA y 5 para el gene MICB^{3, 4}, posteriormente se registraron 33 alelos para MICA⁵⁰ y 11 para MICB¹, y en la actualidad se han descrito 54 alelos de MICA y 16 para MICB⁷. Estos resultados se han derivado de las investigaciones para determinar las asociaciones de esta familia de genes con diversas poblaciones humanas, pero también, debido a su cercanía con los genes HLA-B, ya que se ha demostrado que están asociados a estos en determinados padecimientos¹⁴ (Fig. 2).

Cabe mencionar que también existe el interés por desarrollar estrategias moleculares que puedan emplearse en estudios clínicos para tipificar a los genes MICA y MICB^{35, 45}, en los casos en los que su determinación molecular sea indispensable para establecer algún diagnóstico debido a la asociación demostrada de estos genes con el HLA-B, o en estudios de poblaciones en los que la determinación del polimorfismo de estos genes ha manifestado ser importante para un mejor conocimiento de la evolución de las características de esa población y para estudios clínicos, entre otros. En este sentido, en el laboratorio L-327 (FESZ) se ha desarrollado un sistema para tipificar a los diferentes alelos del gene MICA empleando la determinación de las secuencias del gene MICA por el empleo de plantillas moleculares específicas (PCR-SSOP, por sus siglas en inglés). El sistema basado en esta estrategia ha demostrado ser bastante confiable y reproducible, y a diferencia de la secuenciación directa del ADN, el tiempo de identificación se reduce considerablemente^{13, 35, 53}.

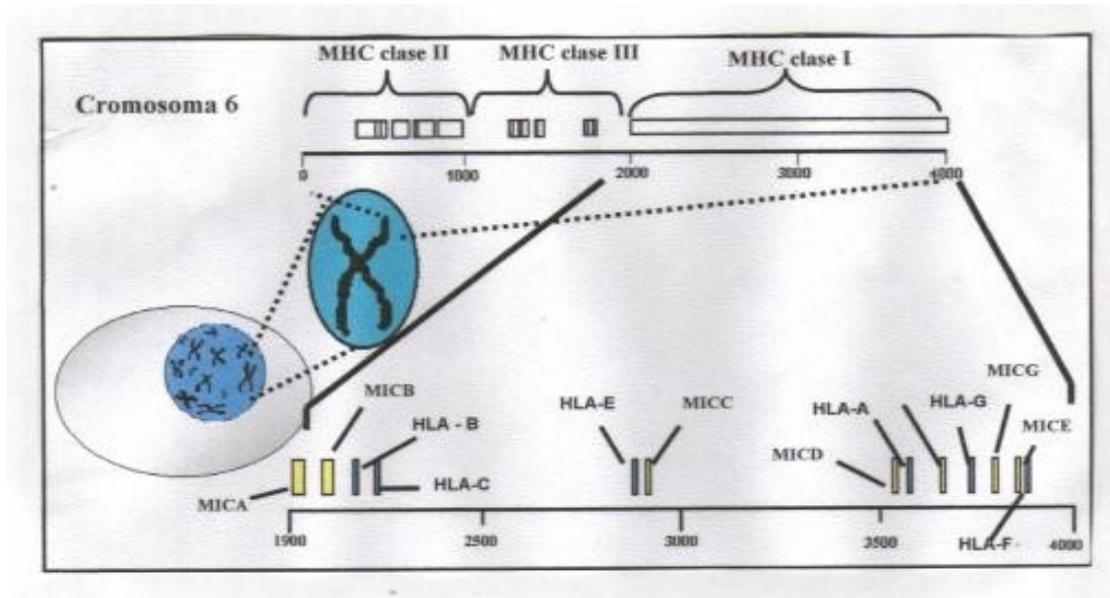


Figura 2. Localización de los genes MIC en el cromosoma 6 (tomada de Mendoza et al.2001)

3.11 TIPOS CELULARES DONDE SE EXPRESAN

En contraste con los genes del MHC-I, los genes MIC no se expresan de forma ubicua. Inicialmente fue postulada la expresión de los antígenos de MICA y MICB a través de la detección de su RNAm en células de origen epitelial y en fibroblastos².

De particular interés es la demostración de que células epiteliales gastrointestinales expresan estos antígenos y que dicha expresión está regulada por la participación del promotor de proteínas de choque térmico que codifica el gene respectivo conocido como HSP70¹⁴. Recientemente con el desarrollo de anticuerpos policlonales para MICA, que es el más polimórfico de los genes de esta familia, se ha puesto en evidencia la expresión de estos antígenos en otros tipos celulares, tanto en células normales como en algunas líneas celulares. También existen anticuerpos policlonales para MICB. En células del linaje linfohematopoyético se ha estudiado poco la expresión de los genes MICA y MICB, aunque sólo se ha podido demostrar la presencia de sus proteínas en células mononucleares en proliferación estimuladas con fitohemaglutinina⁵⁴. Además, recientemente se ha demostrado que la expresión

de este gene no se restringe sólo a células de tejido conectivo y epitelial, sino que también se puede inducir su expresión en linfocitos T CD4+ y CD8+ activados a proliferar. Se ha demostrado que el producto de MICA es reconocido por una subpoblación de células T intestinales que portan el receptor V δ 1 γ/δ ¹⁹ por lo que se cree que puede estar involucrado en la vigilancia inmunológica del intestino, jugando un papel importante en la enfermedad injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés) después de los trasplantes de médula ósea, dado que el intestino es una de los principales sitios de tal padecimiento^{3, 40}.

Por otra parte, hay un receptor de células NK (Natural Killer) conocido como NKG2D, de 42 kDa, que interactúa con MICA. Este receptor se expresa ampliamente en células T (CD 8+, α/β y γ/δ) y células NK; sin embargo se ha descubierto que este receptor no se asocia exclusivamente a MICA (Fig. 3), ya que se expresa también en ratón, que como se ha comentado con anterioridad, ésta es una especie que no expresa genes MIC.

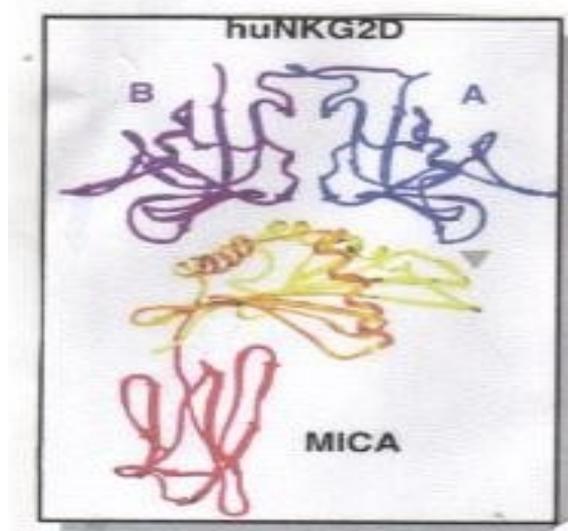


Figura 3. Estructura cristalográfica del complejo formado entre NKG2D y MICA (extraído de Bauer et al. 1999)

Además, es de considerar la elevada expresión de MICA en monocitos, lo que puede implicarla en un posible circuito de respuesta inmune donde la interacción de esta importante célula efectora contribuya a desempeñar alguna función en la que esté involucrada la molécula de MICA^{36, 54}.

3.12 Expresión de MICA y MICB: Asociación con estrés fisiológico en células epiteliales.

Se ha aceptado que las moléculas HLA de clase I (HLA-A, B y C) se expresan ubicuamente en la mayoría de las células de nuestro organismo, mientras que las moléculas no clásicas del HLA de clase I (HLA-E, E, F y G) tienen una distribución mucho más limitada. Por consiguiente, no fue ninguna sorpresa cuando aparecieron los primeros reportes de la expresión de las proteínas MICA y MICB. Por lo general, tanto MICA como MICB se expresan principalmente en fibroblastos y células epiteliales, pero preponderantemente en la mayoría de los tejidos de origen epitelial⁴⁶. Por otra parte, reportes recientes indican que la expresión de las proteínas de MICA y MICB en la superficie celular se encuentra disminuida o sobreexpresada en células transformadas de diversos tipos, pero de manera particular en aquéllas de origen epitelial. Todas estas evidencias en su conjunto nos indican de manera clara que las proteínas MICA y MICB pueden considerarse como marcadores fisiológicos de estrés en células epiteliales, lo cual es consistente con los reportes de que el calor (a través de las proteínas de choque térmico) y los virus inducen un incremento de la expresión de las proteínas MIC en la superficie celular de las células epiteliales^{19, 21}.

3.13 NKG2D

Tratando de dilucidar de que manera las proteínas MIC interactúan con el sistema inmunológico, se descubrió que las proteínas MIC funcionan como ligandos para el receptor NKG2D cuya expresión se encontró inicialmente en las células NK²⁴. NKG2D es un miembro de la superfamilia de las lectinas C⁵¹, el cual se relaciona muy poco con los receptores de la familia NKG2²⁵ y que no tiene asociación con CD94, ya que se expresa como un homodímero⁵¹, además se asocia con un adaptador transmembranal conocido como DAP 10^{32, 51}. Este receptor está codificado por un gen que se encuentra dentro de la región denominada NKC (Natural Killer Complex), en el cromosoma humano 12 y en el 6 en el caso del ratón. (Fig. 4)

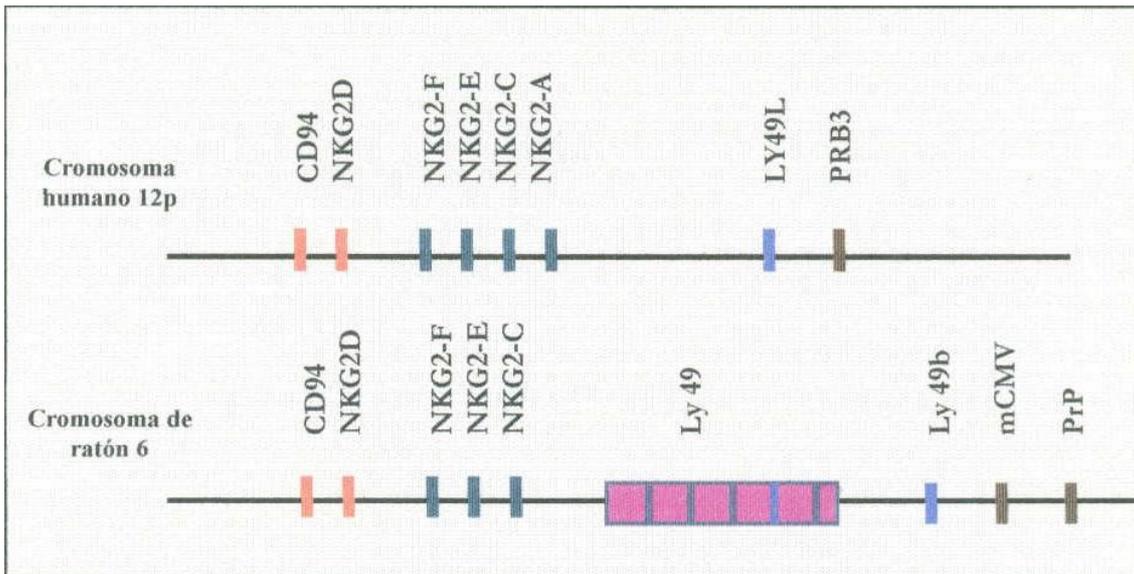


Figura 4. ubicación del gen que codifica para el receptor NKG2D. el gen para NKG2D se encuentra dentro de la región NKC (Natural Killer Complex), localizado en el cromosoma 12 en el caso de los humanos y en el cromosoma 6 en el caso del ratón. (Fan et al., 2001)

NKG2D se encuentra en todas las células NK tanto en humanos como en ratones¹². En ratones NKG2D, se encuentra expresado además de las células NK, en algunos subtipos de $\gamma\delta$ T en el bazo, en todas las células $\gamma\delta$ T epidérmicas, pero no en las células $\gamma\delta$ T provenientes del intestino^{12, 27}.

En el caso de los humanos de igual manera que los roedores, NKG2D no está confinada a las células NK, se ha descubierto que la mayoría de los linfocitos $\gamma\delta$ T así como los $\alpha\beta$ T y los macrófagos presentan en su superficie al receptor NKG2D⁴⁹. Se ha observado que la expresión de NKG2D se ve aumentada en células NK por la acción de IFN α , IL-15 e IL-12⁴⁸.

El receptor NKG2D tiene como ligandos varios grupos de proteínas que guardan una semejanza con las proteínas del MHC clase I, las cuales se encuentran presentes en células tumorales, células infectadas por virus y en células bajo condiciones de estrés fisiológico¹¹: RAE-1 y H60 en ratones y MICA, MICB y ULBP en humanos¹². Los primeros ligandos para NKG2D en ser descubiertos en humanos fueron las proteínas relacionadas con las moléculas clase I del MHC: MICA y MICB⁸, de las cuales ya se ha hablado ampliamente.

Las células NK y los linfocitos $V\delta 1$ T; los cuales son un subtipo de los linfocitos $\gamma\delta$ T, expresan este receptor en su superficie y puede esta unión NKG2D-MIC por si sola desencadenar una respuesta citotóxica en contra de las células que

presentan en su superficie las proteínas MIC¹⁰, ya sean células tumorales autólogas, o provenientes de diferentes tejidos tumorales²⁰.

Por otro lado, se han reportado evidencias de que la presencia del receptor NKG2D funciona como un co-estimulador en la actividad citotóxica de las células $\alpha\beta$ T, es decir, la unión NKG2D-MIC (Fig. 5), que se pudiera presentar en las células $\alpha\beta$ T no desencadena una acción lítica en contra de la célula que expresan la proteína MIC^{8, 19, 30}. Algo paradójico con respecto a las proteínas MIC es el hecho de que si su función es la de estimular al sistema inmune, cabría preguntar ¿cómo es que entonces se desarrollan los tumores aún estando presentes las proteínas MIC?. Esto comenzó a dilucidarse cuando se descubrió que no todas las variantes de genes que codifican para MICA se ven expresados en las membranas de las células³⁷, específicamente la variante del gen para MICA 5.1, el cual se caracteriza por la inserción de 4 nucleótidos causando la terminación prematura de la proteína por la aparición del triplete de terminación (TAA) en la región transmembranal, esto trae como consecuencia que la proteína no se pueda expresar en la superficie de las células, dando origen a una forma soluble de MICA (sMICA). Ya existen reportes en los que se demuestra que ciertas líneas tumorales tienen la capacidad de liberar una forma soluble de las proteínas MIC²¹. En estos ensayos se ha encontrado que la liberación de sMIC trae como consecuencia un hecho muy importante que pudiera en determinado momento explicar la razón por la cual se da la progresión del cáncer: La proteína sMIC se une al receptor NKG2D presente en linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T así como en células NK, esta unión promueve la endocitosis seguido de reciclamiento o degradación de NKG2D, similar a lo que sucede con diversos receptores al unirse a sus ligandos²⁶. La disminución en la expresión de NKG2D provoca la aparición de células NK y linfocitos $\alpha\beta$ T y $\gamma\delta$ T carentes de dicho receptor, estas células “ciegas” por llamarlas de alguna manera, son incapaces de reconocer a las células tumorales o transformadas aún estando presentes las proteínas MIC a nivel de membrana y así evadir al sistema inmunológico (Fig 5).

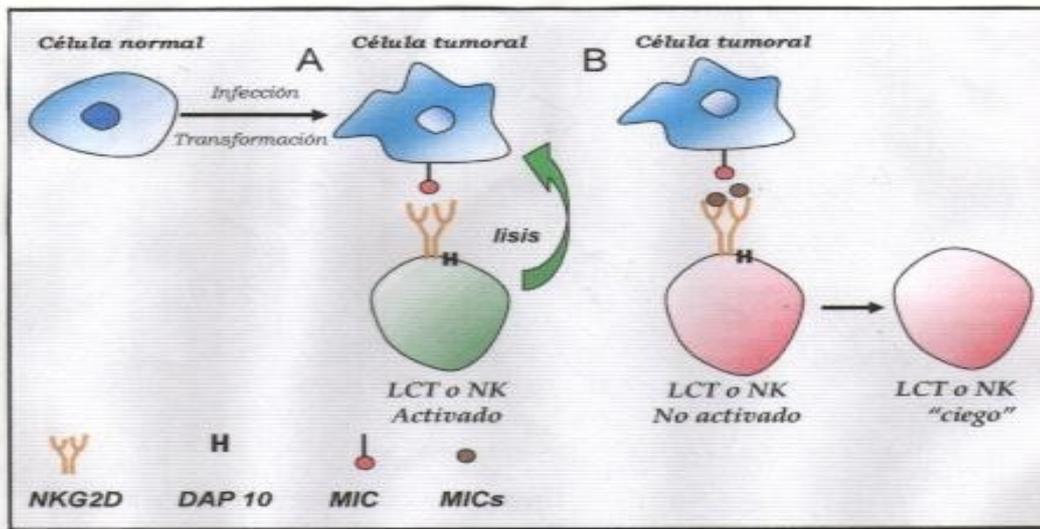


Figura 5. Evasión tumoral del sistema inmune. A. la unión de las proteínas MIC y el receptor NKG2D presente en las células NK (Natural Killer) y linfocitos $\alpha\beta T$, y $\gamma\delta T$ promueve la lisis de las células tumorales o transformadas que expresan dichas proteínas. B. La liberación de una forma soluble de las proteínas MIC, promueve la endocitosis receptor NKG2D, dando como resultado la agrupación de células que expresan la proteína MIC a nivel membranal (tomado de Yokohama 2002)

La hipótesis sobre el hecho de que la forma soluble de las proteínas MIC pudiera contribuir a la progresión del cáncer se apoya en ensayos realizados por el grupo de Groh, en los cuales pacientes positivos sMIC, presentaron una disminución del receptor NKG2D, los cuales después de la utilización de anticuerpos dirigidos contra las proteínas sMIC sus células efectoras presentaron una densidad normal del receptor NKG2D²¹.

3.14 ELISA (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay)

La técnica ELISA fue descrita casi al mismo tiempo, en 1971, por dos equipos de trabajo diferentes, el de Engvall y Perlmann en Suecia y el de Van Weemen y Schuurs en Holanda. Esta técnica se basa en un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático. Las distintas modalidades técnicas del ELISA se pueden clasificar en DIRECTOS e INDIRECTOS. En el método directo el anticuerpo dirigido específicamente

contra el antígeno es el que lleva unida la enzima. En el método indirecto se mide la concentración de anticuerpos en muestras de fluidos biológicos. El antígeno inmovilizado reacciona con el anticuerpo de la muestra y posteriormente reacciona con un segundo anticuerpo unido a la enzima. Para el método competitivo en este caso se usará el anticuerpo específico unido a la fase sólida y el conjunto enzimático estará compuesto de antígeno y enzima covalentemente unidos. En esta modalidad se ponen a reaccionar una cantidad fija de antígeno conjugado a una enzima y cantidades variables de antígeno libre, con alícuotas de anticuerpo en fase sólida. El anticuerpo libre inhibirá la unión del antígeno conjugado, haciendo que la actividad enzimática unida a la fase sólida, al final del ensayo, sea menor cuanto mayor sea la concentración del antígeno libre en el medio de reacción. Como podemos apreciar la técnica de ELISA es muy versátil y por eso existen múltiples variantes de la misma. En la más común, el antígeno es el reactante que adsorbe sobre la fase sólida. Las etapas generales para la búsqueda de anticuerpos en este sistema incluyen las siguientes: 1) recubrimiento de los pozos en las placas para ELISA con una cantidad apropiada del antígeno (de nanogramos a microgramos, dependiendo del antígeno); 2) la eliminación del exceso de antígeno por lavado de los pozos con un regulador fisiológico adicionado de un detergente (comúnmente se utiliza solución salina-fosfatos, PBS, pH 7.4, con Tween-20); 3) el bloqueo de los sitios de los pozos no ocupados por el antígeno, con una proteína inmunológicamente irrelevante para el sistema de prueba (albúmina, gelatina, caseína); 4) la adición de los sueros problema apropiadamente diluidos en PBS (la dilución se establece experimentalmente), e incubación del sistema; 5) la eliminación del exceso de suero por lavado con solución PBS-Tween; 6) la incubación del sistema con un "segundo anticuerpo" conjugado a una enzima (la más popular es la peroxidasa de rábano) a la dilución conveniente; 7) la eliminación del exceso de anticuerpo conjugado por lavado con PBS-Tween; 8) la dilución de una mezcla del substrato y un cromógeno (cuando el segundo anticuerpo está conjugado a peroxidasa se utiliza una mezcla de peróxido de hidrógeno y de orto-fenilendiamina); 9) la incubación de la placa a temperatura ambiente; 10) medir la absorbancia en el lector de ELISA. Aquellos pozos que den las absorbancias más altas corresponderán a los sueros con mayores cantidades de anticuerpos dirigidos contra el antígeno

usado en el sistema^{9, 38}. Fig. 6

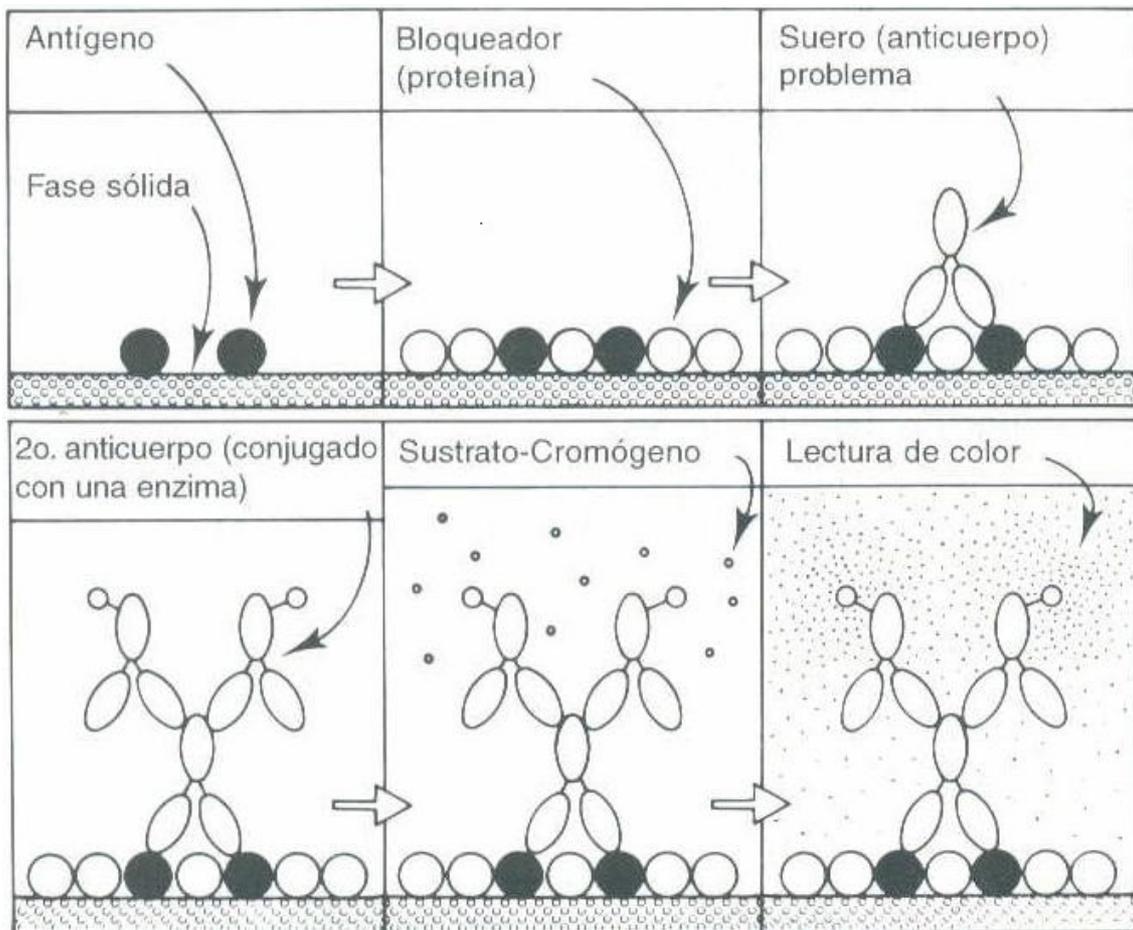


Figura 6. Una de las variantes de la técnica de ELISA se utiliza para buscar anticuerpos contra antígenos conocidos. Los pozos de las placas se recubren con el antígeno, después se lavan y se tratan con una solución bloqueadora de "proteínas irrelevantes" como la caseína, la gelatina o la albúmina, y luego se incuba con el suero problema. Los anticuerpos presentes en el suero (que al reaccionar con el antígeno son retenidos en el sistema) se detectan por adición de "un segundo anticuerpo" acoplado a una enzima. El exceso de segundo anticuerpo se elimina por lavado y luego se adiciona el sustrato de la enzima y un cromógeno. La enzima actúa sobre su sustrato generando un intermediario inestable que modifica químicamente al cromógeno y lo transforma en un compuesto colorido. El color desarrollado se mide en un fotolorímetro a la longitud de máxima absorbancia. Cuando la enzima acoplada al segundo anticuerpo es la peroxidasa, el sustrato es el peróxido de hidrógeno y el cromógeno puede ser la diaminobenzidina, la o-fenilendiamina, o cualquier otro de los varios que existen para el caso.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad las leucemias agudas (LA) siguen cobrando muertes sin distinción de edad, sexo y posición social, la letalidad media anual de las LA (leucemia aguda) es de tres a cinco casos por cada 100,000 habitantes y existe una tendencia notable al aumento del padecimiento. En los niños, las LA son la causa más frecuente de muerte por neoplasia. En la segunda mitad del siglo XX, se realizaron avances importantes en el tratamiento de las leucemias agudas, que cambiaron de modo notable el concepto que prevalecía de que la palabra leucemia era sinónimo de muerte a muy corto plazo. Estos avances lograron que en la actualidad se curen casi todos los niños y aproximadamente un tercio de los adultos con LA linfoblástica. En el caso de las LA mieloblásticas, los avances terapéuticos han sido menos notables y las cifras de curación para niños y adultos oscilan en torno a 25 y 15%, respectivamente. El conocimiento de la biología de los genes MIC hace apenas unos años y la expresión de las proteínas MICA se demostró en células de origen epitelial o fibroblástico. Aunque su función biológica de la expresión de esta proteína no es del todo clara. Estudios posteriores revelaron que pueden considerarse como proteínas de estrés fisiológico y tener alguna función en la respuesta inmune en una gran variedad de enfermedades: artritis reumatoide, espondilitis anquilosante (EA), procesos de cáncer de cérvix y últimamente en leucemias por mencionar algunas. Es por eso que el propósito de este trabajo fue demostrar la presencia de las proteínas de estrés fisiológico MICA en suero de pacientes con diagnóstico de leucemia agudas. Por otra parte el conocimiento de esta información ayudará a la investigación de las proteínas MICA y sus genes así como su relación con este padecimiento. Adicionalmente a esto es posible generar un método factible para la detección de las proteínas en suero antes o durante el diagnóstico de la leucemia

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la presencia de la proteína de estrés fisiológico MICA en el suero de pacientes con leucemia mieloide y linfoide.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar el protocolo para llevar a cabo la determinación de la proteína MICA en el suero de pacientes con leucemia.
2. Establecer la metodología y las condiciones favorables para medir en suero de pacientes con leucemia la proteína MICA.
3. Determinar por medio del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) la presencia de la proteína MICA en el suero de pacientes con LAM (Leucemia Aguda Mieloblástica) y LAL (Leucemia Aguda Linfoblástica)
4. Comparar el sistema de ELISA convencional versus el método modificado utilizado en este trabajo.

6. HIPOTESIS

Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en suero sean mayores que en los sueros de los pacientes normales (sin diagnóstico de leucemia).

7. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS EMPLEADOS

MATERIAL BIOLÓGICO

- Sueros de pacientes con leucemia linfoblástica y mieloblástica humana proporcionados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).
- Sueros humanos como controles negativos (sin diagnóstico de leucemia) proporcionados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

LISTA DE REACTIVOS

| NOMBRE | FORMULA | PROVEEDOR |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------|
| Carbonato de sodio | Na ₂ CO ₃ | J.T.BARER |
| Bicarbonato de sodio | NaHCO ₃ | J.T.BARER |
| Tween 20 | | Hycel de México |
| Cloruro de magnesio | MgCl ₂ 6H ₂ O | |

CONJUGADOS

| CONJUGADO | PROVEEDOR |
|--------------------------------------|--|
| anti-hMICA purified Mouse Monoclonal | R& D systems catalogo number MAB 1300 |
| Recombinant Human MICA/Fc Chimera | R& D systems catalogo number MAB 1300-MA |

EQUIPO

| NOMBRE | MARCA |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Espectrofotómetro para ELISA | Bio-Tek instruments ELx 800 |
| Espectrofotómetro Spectronic 20 | Bausch y Lomb |
| Agitador Vortex | GENIE 2 |
| Potenciómetro Digital | CORNING SCHOLAR 425 |
| Microscopio Invertido Carl Zeiss | Leica |
| Milli-Q | Academic |

| | |
|-----------------------------|-----------------------|
| Agitador de Placas | VWR |
| Refrigerador 4°C | General electric |
| Congelador Revco | General electric |
| Incubadora CO ₂ | Forma Scientific. inc |
| Balanza analítica eléctrica | OHaus |

MATERIAL

| MATERIAL | MARCA |
|--------------------|--------------|
| Placa para ELISA | Gilson |
| Micropipeta 0-2 µL | Gilson |

8. MÉTODOS

8.1 ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

CURVA ESTANDAR

Metodología para la elaboración de la curva estándar

Paso1. Primero se preparó la proteína (recombinant Human MICA/Fc Chimera) en PBS c/albúmina al 1%, ya que este producto está liofilizado. A partir de esta solución y después de varios ensayos, se colocaron las siguientes concentraciones de la proteína 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng en la placa de ELISA con un volumen de 100µl en cada pozo, cada concentración se realizó por triplicado. Se incubó por 1 hora a 37°C, pasado este tiempo se retiró el líquido y se procedió al lavado de los pozos con una solución de PBS-TWEEN 0.05% (PBST).

Adición de la proteína bloqueante

Paso 2. Terminado el paso anterior se bloquearon los pozos donde se colocó la proteína (rhMICA), utilizando 120µl de una solución de PBST con leche descremada (Svelty) al 3%. Se incubó 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo se retiró el líquido y se procedió a el lavado de los pozos con una solución de PBS-TWEEN 0.05% (PBST).

Adición del anticuerpo primario (anti-MICA)

Paso3. Para agregar el anticuerpo primario anti-MICA se procedió a prepararlo primero ya que también este producto está liofilizado. Se utilizó PBS c/albúmina al 1% para la hidratación. Después de varios ensayos se utilizó la dilución 1:100 (para conseguir esta dilución ver procedimiento en apéndice) y se procedió a

colocar 100µl a cada pozo donde se colocó la proteína (rhMICA). Se incubó por 1 hora a 37°C, pasado este tiempo se retiró el líquido y se procedió al lavado de los pozos con una solución de PBS-TWEEN 0.05% (PBST).

Adición del anticuerpo secundario

Paso4. Para agregar el anticuerpo primario anti-MICA se procedió a prepararlo primero ya que también este producto está liofilizado. Se utilizó PBS c/albúmina al 1% para la hidratación. Después de varios ensayos se utilizó la dilución 1:4000 (para conseguir esta dilución ver procedimiento en apéndice) Y se procedió a colocar 100µl a cada pozo donde se colocó la proteína (rhMICA). Se incubó por 1 hora a 37°C, pasado este tiempo se retiró el líquido y se procedió al lavado de los pozos con una solución de PBS-TWEEN 0.05% (PBST).

Adición del sustrato-cromógeno

Paso 5. Por último se adicionaron 100 µL del sustrato-cromógeno (ABTS) a cada pozo y se dejó por 1 hora a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Transcurrido este tiempo se leyó la densidad óptica en un lector para placas de ELISA a 405 nm.

8.2 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA MICA EN SUERO

Metodología para la determinación de la proteína MICA en el suero.

Prácticamente el procedimiento es el mismo al que se usó para la metodología en la elaboración de la curva estándar, así que sólo se mencionaran las variantes que se realizaron.

Los sueros de los pacientes enumerados en número progresivo (1,2.....) se mantuvieron en congelación a -70°C hasta la utilización, se colocaron 100 µl en la

placa de ELISA la colocación de cada suero se realizo por triplicado. El resto del ensayo continuó igual que en la elaboración de la curva estándar

8.3 MÉTODO ESTADÍSTICO

Se aplicó el paquete estadístico SPSS para la versión Windows 5.1

El análisis estadístico se realizo comparando la LAL contra el control y la LAM contra el control.

9. RESULTADOS

Estandarización del protocolo para la construcción de la curva estándar de la proteína (rhMICA)

1.- Concentración de rhMICA

Para determinar la concentración más adecuada de la rhMICA que se debe emplear para la elaboración de la curva estándar se realizaron varios ensayos con el objetivo de encontrar los valores reportados en la literatura que se encuentran en el orden de los pico gramos (pg). Previamente en el laboratorio L-327 (FESZ) se trabajaron concentraciones de proteína MICA en ensayos con células de cérvix que se utilizaron como concentraciones de referencia. Por otro lado, se tomaron en consideración los niveles de la proteína MICA en ensayos de pacientes con leucemias humanas en los que se reportan entre 5pg hasta 2500pg (ref.16).

Las concentraciones empleadas en estos ensayos se reportan en la **tabla 2**

Tabla 2. Concentraciones de rhMICA

| | | | | |
|----------------|--------------|-------------|------------|--------------|
| ensayo1 | 2500pg | 250pg | 25pg | 2.5pg |
| ensayo2 | 500ng | 50ng | 5ng | 0.5ng |
| ensayo3 | 100ng | 10ng | 1ng | 0.1ng |

2.- Sensibilización de la Proteína Humana MICA

Además se emplearon diferentes condiciones de sensibilización de la proteína en las inmunoplasmas utilizadas, ver **tabla 3**. Básicamente, se encontró que la mejor

sensibilización fue a incubar la proteína (rhMICA) a 37° C por una hora ya que no se presentaron variaciones en los resultados cuando se utilizó esta temperatura.

Tabla 3. Incubaciones

| | |
|----------------|--------------------------------|
| ensayo1 | incubación toda la noche a 4°C |
| ensayo2 | incubar 1hora a 37°C |

3.-Condiciones de Bloqueo

En cuanto a las condiciones de bloqueo, por lo general, se emplea albúmina humana o bovina en los diferentes protocolos en los que se emplea ELISA. Sin embargo, nosotros decidimos emplear leche descremada en polvo ya que ensayos realizados anteriormente en el laboratorio L-327 encontramos que cumple satisfactoriamente con esta función. Ello se pudo nuevamente corroborar al emplearla en los ensayos de ELISA ya que eliminó cualquier unión inespecífica permitiéndonos evaluar de manera satisfactoria en nuestros ensayos.

4.-Anticuerpo Primario monoclonal Anti-MICA

Teniendo en consideración reportes preliminares por el grupo de trabajo del (L-327) sobre el anticuerpo polyclonal anti-MICA³¹, se decidió comenzar con la dilución 1:1000 y se hicieron variaciones de diluciones sobre esta concentración hasta encontrar la dilución adecuada del anticuerpo primario ver **tabla 4**. Encontrándose que la mejor concentración fue de 1:100 ya que concentraciones más diluidas simplemente no dieron buenos resultados.

Tabla 4. Anticuerpo monoclonal primario

| | | | |
|----------------|--------------|-------|------|
| ensayo1 | 1:1000 | | |
| ensayo2 | 1:500 | 1:200 | |
| ensayo3 | 1:100 | 1:50 | 1:25 |
| ensayo4 | 1:100 | | |

5.-Anticuerpo secundario

Teniendo en consideración reportes preliminares sobre el anticuerpo secundario³¹, se decidió comenzar con la dilución 1:3000 y se hicieron variaciones de

diluciones sobre esta concentración hasta encontrar la dilución adecuada del anticuerpo secundario ver **tabla 5**. En este caso correspondió a la dilución 1:4000. Ya que otras diluciones simplemente nos dieron resultados erróneos.

Tabla 5. Anticuerpo 2rio

| | |
|---------|--------|
| ensayo1 | 1:3000 |
| ensayo2 | 1:5000 |
| ensayo3 | 1:4000 |

6.- Utilización de Diferentes Sustratos

Además se emplearon diferentes sustratos para determinar cuál era el más estable y que presentara mayor reproducibilidad.

Para considerar el sustrato a utilizar se tomo en cuenta trabajos previos que utilizaron orto-fenilendiamina (OPD), Asimismo el sustrato que reportan en ensayos de pacientes con leucemias humanas MBTH (3-metil-2-benzo-tiazolinona, se decidió usar el sustrato ABTS (ácido 2,2-azino-bis [3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico]). En este caso encontramos que el ABTS resultó más estable y reproducible porque nuestras lecturas se podían realizar hasta 1 hora después sin que este se oxidara tan rápido.

Análisis de la presencia en el suero de pacientes con LAM (Leucemia Aguda Mieloblástica) y LAL (Leucemia Aguda Linfoblástica) de la proteína de estrés fisiológico MICA por el método de ELISA.

Realizada la estandarización de la técnica de ELISA y la construcción de la curva estándar respectiva, se procedió a realizar el análisis de la presencia de la proteína MICA en los sueros problemas (sueros de pacientes con leucemia linfoide y mieloides humanas) por medio del método de ELISA.

1.- En una placa de poliestireno se colocaron cuatro concentraciones de la proteína rhMICA ver **tabla 6**.

Tabla 6. Concentraciones de la proteína MICA

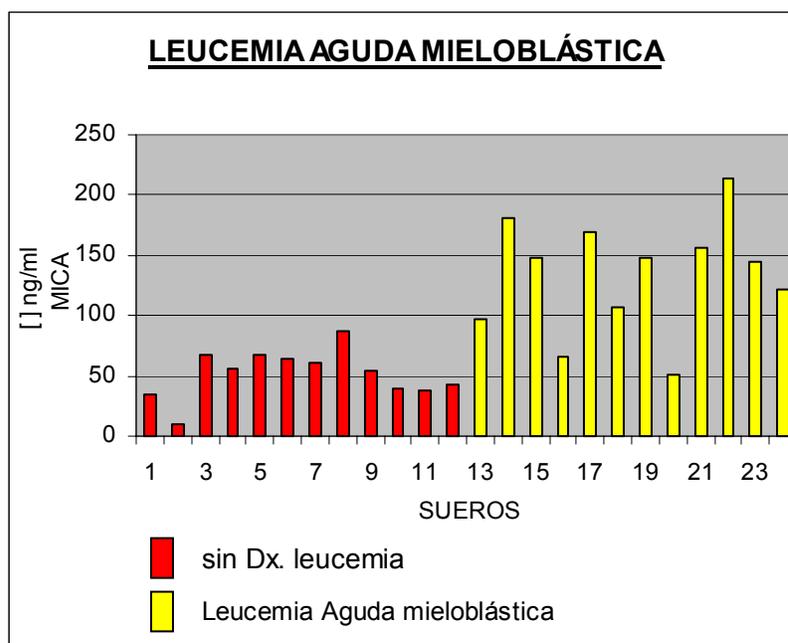
| | | | | |
|--------|-------|------|-----|-------|
| rhMICA | 100ng | 10ng | 1ng | 0.1ng |
|--------|-------|------|-----|-------|

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se analizaron 12 sueros de pacientes con LAM bajo las condiciones señaladas anteriormente en el protocolo de estandarización. En la **tabla 7** se muestran las características clínicas de los pacientes utilizados así como los resultados de las concentraciones encontradas de la proteína MICA en suero, así también en la Gráfica 1 se muestran los resultados de la leucemia mencionada.

Tabla 7. RESULTADOS LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

| NO. | SEXO | EDAD | DX | WBC 10 ³ MM ³ | Hb G/DL | plt 10 ³ MM ³ | MICA (ng/ml) | controles (ng) |
|-----|------|------|-------|---|------------|--|---------------------|-------------------|
| 1 | M | 48 | L.A.M | 2.5 | 11.2 | 155 | 97.4 | 34.6 |
| 2 | F | 45 | L.A.M | 82.0 | 7.8 | 35 | 181.4 | 10 |
| 3 | M | 11 | L.A.M | 5.4 | 6.2 | 7000 | 148 | 67.2 |
| 4 | F | 52 | L.A.M | 0.8 | 8.9 | 3000 | 65.5 | 56 |
| 5 | F | 52 | L.A.M | 8.4 | 13.3 | 178 | 169.2 | 67.2 |
| 6 | F | 36 | L.A.M | 18.0 | 11.7 | 656 | 107.1 | 64 |
| 7 | M | 34 | L.A.M | 22.0 | 10.6 | 228 | 148 | 61 |
| 8 | M | 39 | L.A.M | 2.5 | 13.5 | 211 | 50.7 | 87 |
| 9 | F | 42 | L.A.M | 24 | 14.1 | 92 | 156.7 | 55 |
| 10 | M | 28 | L.A.M | 25.0 | 10.3 | 167 | 214.6 | 40 |
| 11 | F | 47 | L.A.M | 34.0 | 8 | 302 | 145.1 | 38 |
| 12 | M | 27 | L.A.M | 15.0 | 11 | 450 | 122.8 | 43 |

L.A.M: Leucemia Aguda Mieloblástica WBC: glóbulos blancos Hb: Hemoglobina
plt: plaquetas



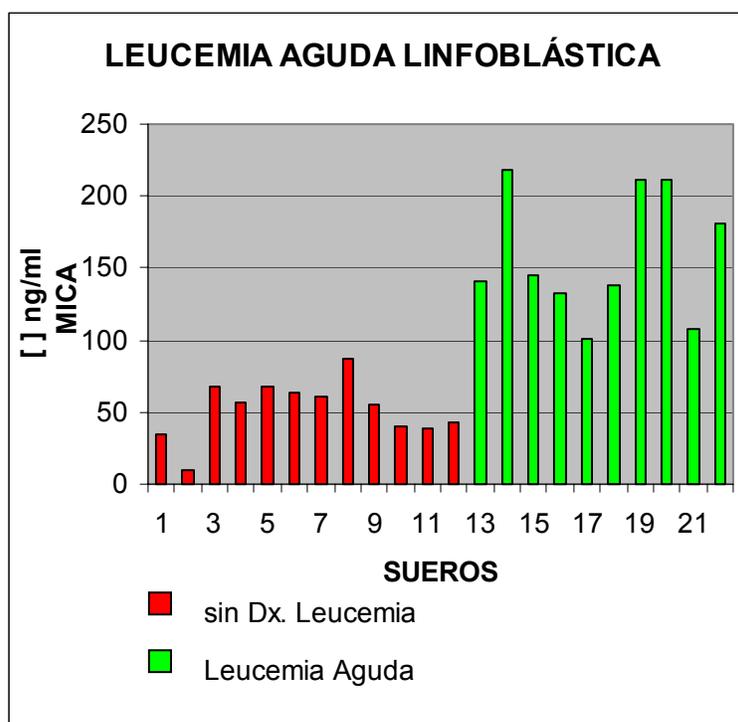
Gráfica 1. Representación grafica de los valores de proteína MICA en suero.

Por otro lado se analizaron 10 pacientes con L.A.L bajo las condiciones señaladas anteriormente en el protocolo de estandarización. En la **tabla 8** se muestran las características clínicas de los pacientes utilizados así como los resultados de las concentraciones encontradas de la proteína MICA en suero. Así también la Gráfica 2 muestra los resultados de la leucemia mencionada.

Tabla 8. RESULTADOS LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA

| NO. | SEXO | EDAD | DX | WBC 10 ³ MM ³ | Hb G/DL | PLT 10 ³ MM ³ | MICA (ng) | controles |
|-----|------|------|-------|--|------------|--|--------------|-----------|
| 1 | F | 18 | L.A.L | 5.7 | 11.7 | 188 | 141 | 34.6 |
| 2 | F | 13 | L.A.L | 53.2 | 13.2 | 410 | 218 | 10 |
| 3 | F | 13 | L.A.L | 12.8 | 4.5 | 1500 | 145.1 | 67.2 |
| 4 | F | 8 | L.A.L | 38.6 | 12.4 | 91 | 133 | 56 |
| 5 | F | 9 | L.A.L | 2100 | 12.8 | 88 | 101 | 67.2 |
| 6 | M | 10 | L.A.L | 500 | 10.7 | 44 | 138 | 64 |
| 7 | F | 11 | L.A.L | 24.0 | 11.3 | 174 | 212 | 61 |
| 8 | F | 10 | L.A.L | 10.0 | 8.2 | 25 | 211 | 87 |
| 9 | F | 10 | L.A.L | 8100 | 9.6 | 101 | 108 | 55 |
| 10 | M | 7 | L.A.L | 14.7 | 7 | 250 | 181 | 40 |
| 11 | | | | | | | | 38 |
| 12 | | | | | | | | 43 |

L.A.L: Leucemia Aguda Linfoblástica WBC: glóbulos blancos Hb: Hemoglobina
PLT: Plaquetas

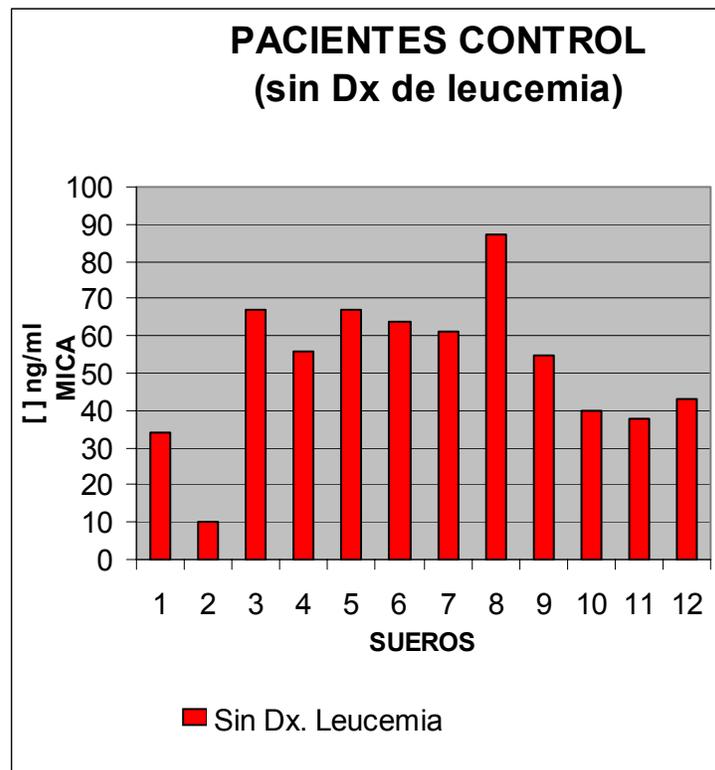


Gráfica 2. Representación grafica de los valores de Proteína MICA en suero.

Tabla 9. Pacientes control (sin diagnostico de leucemia)

| NO. | SEXO | EDAD | DX | WBC 10 ³ MM ³ | Hb G/DL | PLT 10 ³ MM ³ | controles |
|-----|------|------|------|--|------------|--|-----------|
| 1 | F | 29 | s/dx | 4.5 | 13.8 | 350 | 34.6 |
| 2 | F | 5 | s/dx | 5.0 | 13.4 | 298 | 10 |
| 3 | F | 1 | s/dx | 3.9 | 15.1 | 358 | 67.2 |
| 4 | F | 48 | s/dx | 6.7 | 14.0 | 400 | 56 |
| 5 | F | 35 | s/dx | 5.9 | 13.7 | 270 | 67.2 |
| 6 | M | 66 | s/dx | 7.1 | 12.8 | 289 | 64 |
| 7 | F | 16 | s/dx | 5.3 | 14.5 | 234 | 61 |
| 8 | F | 11 | s/dx | 4.6 | 13.8 | 302 | 87 |
| 9 | F | 34 | s/dx | 5.7 | 13.0 | 295 | 55 |
| 10 | M | 40 | s/dx | 7.0 | 16.7 | 369 | 40 |
| 11 | M | 10 | s/dx | 4.8 | 12.9 | 410 | 38 |
| 12 | M | 45 | s/dx | 6.0 | 16.0 | 271 | 43 |

s/dx. sin diagnostico de leucemia; WBC: glóbulos blancos Hb: Hemoglobina
PLT: Plaquetas



Gráfica 2. Representación grafica de los valores de Proteína MICA en suero

RESULTADOS DE LA ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTANDAR

| X [ng | Yabs. |
|-------|-------|
| 100 | 0.606 |
| 10 | 0.290 |
| 1 | 0.313 |
| 0.1 | 0.305 |

$$A = 0.292$$

$$B = 3.10 \times 10^{-3}$$

$$R = 0.988$$

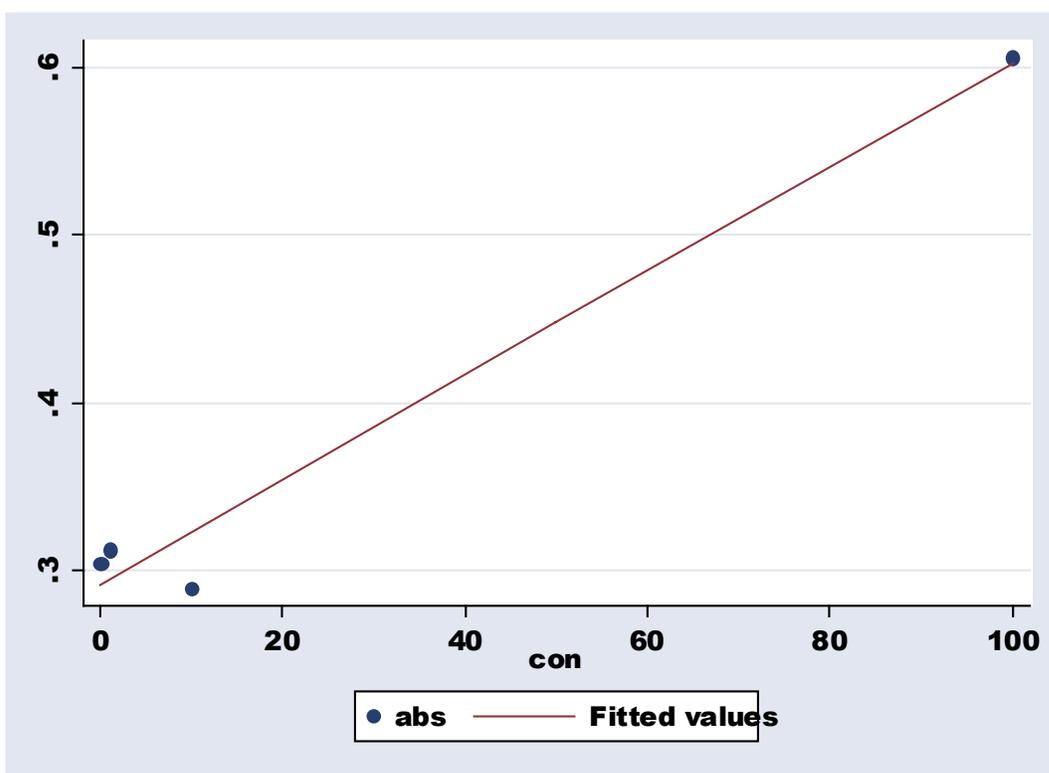


Figura 7. Representación grafica de la curva estándar por mínimos cuadrados

NOTA: el ensayo se realizó por triplicado, las absorbancias se sumaron y se sacó una media, que es la que está en la tabla arriba.

10. ANALISIS ESTADISTICO

Se aplicó el paquete estadístico SPSS para la versión Windows 5.1

El análisis estadístico se realizo comparando la LAL contra el control y la LAM contra el control.

Método estadístico t de student

La distribución t de student fue introducida por W. S. Gosset, quién hizo publicaciones bajo el pseudónimo de “student” en 1908.

Para la leucemia aguda linfoblástica

Tabla 10. Resultados de proteína MICA entre LAL Y Px. Control.

| | Px. c/LAL | grupo control (Px. Sin Dx de leucemia) |
|--|-------------|--|
| tabla x [] en ng de proteína MICA en los grupos de LAL y control. | 141 | 34.6 |
| | 218 | 10 |
| | 145.1 | 67.2 |
| | 133 | 56 |
| | 101 | 67.2 |
| | 138 | 64 |
| | 212 | 61 |
| | 211 | 87 |
| | 108 | 55 |
| | 181 | 40 |
| | suma:1588.1 | 542 |
| media:158.81 | 54.2 | |

Esta claro que hay una diferencia entre estos dos grupos.

HIPÓTESIS:

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en suero **sean igual** a los sueros de los pacientes normales (sin Dx. de leucemia).

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en suero **sean mayor** a los sueros de los pacientes normales (sin Dx. de leucemia).

Por lo tanto: Ho: $\mu_1 = \mu_2$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$

Resultados del análisis estadístico

MUESTRAS ESTADISTICAS PAREADAS

| | Mean | N | std. Deviation | std. Error mean |
|---------------|----------|----|----------------|-----------------|
| par px. c/LAL | 158.8100 | 10 | 43.5595 | 13.7747 |
| CONTROL | 54.2000 | 10 | 21.3423 | 6.7490 |

CORRELACIÓN MUESTRA PAREADAS

| | N | Correlation | sig. |
|---------------|----|-------------|------|
| par px. c/LAL | 10 | -.207 | .567 |
| CONTROL | | | |

PAIRED SAMPLES TEST

| | paired Differences | | | | | t |
|----------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|---|---------|--------------|
| | Mean | std. Desviation | Std. Error Mean | 95% confidence interval of the Difference | | |
| | | | | lower | upper | |
| -par px. c/LAL -CONTROL | 104.61 | 52.3188 | 16.5446 | 67.183 | 142.036 | 6.323 |

PAIRED SIMPLES TEST

| | df | SIG. (2-tailed) |
|--------------------------|----|-----------------|
| par px. c/LAL CONTROL | 9 | 0.001 |

CONCLUSIÓN: Se concluye que entre los pacientes de LAL y control hay una gran diferencia y entonces se acepta la hipótesis Ha. Con una $p=0.001$

Para la leucemia aguda mieloblástica

Tabla 11. Resultados de proteína MICA entre LAM Y Px. Control.

| | Px. c/LAM | grupo control (Px. Sin Dx de leucemia) |
|---|---------------|--|
| tabla [] en ng de proteína MICA en los grupos de LAM y control. | 97.4 | 34.6 |
| | 181.4 | 10 |
| | 148 | 67.2 |
| | 65.5 | 56 |
| | 169.2 | 67.2 |
| | 107.1 | 64 |
| | 148 | 61 |
| | 50.7 | 87 |
| | 156.7 | 55 |
| | 214.1 | 40 |
| | 145.1 | 38 |
| | 122.8 | 43 |
| | suma:1606.6 | 623 |
| | media:133.883 | 51.916 |

Esta claro que hay una diferencia entre estos dos grupos.

HIPÓTESIS:

Ho: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en suero **sean igual** a los sueros de los pacientes normales (sin Dx. de leucemia).

Ha: Si las leucemias provocan un estrés fisiológico debido a que se desarrolla un proceso de neotransformación, entonces es posible que los niveles de la proteína MICA en suero **sean mayor** a los sueros de los pacientes normales (sin Dx. de leucemia).

Por lo tanto: Ho: $\mu_1 = \mu_2$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$

Resultados del análisis estadístico

MUESTRAS ESTADISTICAS PAREADAS

| | Mean | N | std. Deviation | std. Error mean |
|---------------|---------|----|----------------|-----------------|
| par px. c/LAM | 133.050 | 12 | 47.4013 | 13.6836 |
| CONTROL | 51.9167 | 12 | 20.0562 | 5.7897 |

CORRELACIÓN MUESTRA PAREADAS

| | N | Correlation | sig. |
|--------------------------|----|-------------|------|
| par px. c/LAM CONTROL | 12 | -.460 | .133 |

PAIRED SAMPLES TEST

| | paired Differences | | | | | t |
|----------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|---|---------|--------------|
| | Mean | std. Desviation | Std. Error Mean | 95% confidence interval of the Difference | | |
| | | | | lower | upper | |
| -par px. c/LAM -CONTROL | 81.133 | 59.357 | 17.1352 | 43.419 | 118,847 | 4.735 |

PAIRED SIMPLS TEST

| | df | SIG. (2-tailed) |
|--------------------------|----|-----------------|
| par px. c/LAM CONTROL | 11 | 0.001 |

CONCLUSIÓN: Se concluye que entre los pacientes de LAM y control hay una gran diferencia y entonces se acepta la hipótesis H_a . Con una $p=0.001$

11. ANALISIS DE RESULTADOS

En estudios previos se ha utilizado preferentemente el ensayo de ELISA para determinar la presencia de la proteína MICA usando diferentes condiciones y sustratos para el revelado del ensayo. Sin embargo, al tratar de reproducir estas condiciones en el laboratorio L-327 (FESZ) se observó que no eran reproducibles y que los sustratos empleados comúnmente (OPD; ortofenilendiamina), MBTH (3-metil-2-benzo-tiazolinona) eran bastante inestables y poco confiables dado que los tiempos de desarrollo de color variaban constantemente. Por ello, se utilizaron condiciones que empleamos para los ensayos de Western Blot (concentraciones de anticuerpos primarios y secundarios) además de que buscamos otro sustrato que nos diera mejores condiciones para el desarrollo de color y que fuera más estable. En este caso empleamos el ABTS ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico), que nos permitió tener condiciones más estables en cuanto a desarrollo de color y tiempo en la que se mantenía esta coloración. Es importante resaltar que al estandarizar encontramos que las condiciones más adecuadas fueron sustancialmente diferentes a las reportadas en trabajos preliminares e inclusive a las concentraciones empleadas previamente por nuestro grupo de trabajo en el laboratorio L-327 (FESZ) ³¹. Básicamente los tiempos de incubación fueron modificados así como en lo referente al empleo de la sustancia bloqueadora. En cuanto a la sensibilización de la proteína en la inmunoplaaca se encontró que el mejor tiempo de incubación fue de 1 hora a 37°C, por lo que respecta al bloqueo de sitios no ocupados por la proteína rhMICA para evitar la unión inespecífica se utilizó una proteína inerte (leche descremada) que básicamente dio los mismos resultados que si empleáramos albúmina humana o bovina que son comunes como agentes bloqueadores. Con respecto a la proteína recombinante (rhMICA) las concentraciones más adecuadas de esta fueron de 100ng, 10ng, 1ng y 0.1ng como se muestra en la tabla 1, concentraciones más diluidas no fueron suficientes para la que la reacción antígeno-anticuerpo se llevará a cabo por lo que los resultados no fueron aceptables. Después de varios ensayos la concentración más adecuada de anticuerpo primario (anti-MICA) y del anticuerpo secundario fueron de una dilución 1:100 y 1:4000 respectivamente ver

tabla 8 (apéndice), con lo cual se pudieron llevar a cabo los ensayos de manera reproducible. En estas reacciones antígeno-anticuerpo las condiciones experimentales que usamos fueron de gran trascendencia, la temperatura oscilo entre 15-24°C (temperatura ambiente y 37°C). El pH oscilo entre 7.0-7.2. Es importante mencionar que nosotros usamos un detergente no iónico (Tween 20 al 0.05%) con el fin de evitar uniones inespecíficas. Todo los ensayos se realizaron por triplicado esto fue para asegurar la especificidad y la reproducibilidad del ensayo. Por esta razón recomendamos realizar 3 lavados. El medio de reacción que se utilizó fue PBS + Tween 20 al 0.05%. Por último de los sustratos (OPD, MBTH y ABTS) que se utilizaron, el ABTS fue el que mejor resultados presentó ya que fue muy estable, muy viable para conjugarse eficientemente, con una baja toxicidad, una sensibilidad adecuada y su buena disponibilidad en el mercado. Por último consideramos que lo más apropiado era estandarizar el tiempo necesario para llegar al equilibrio entre reactivos y productos. Una vez que encontramos que estas condiciones eran estables y reproducibles procedimos a analizar la presencia de la proteína MICA en el suero de pacientes con L.A.M y L.A.L. En cuanto a la determinación de la proteína MICA en el suero de los pacientes con L.A.M y L.A.L se analizaron 22 sueros (ver apéndice). Se observo que hay una fuerte correlación en la detección de la proteína MICA y el estado patológico de las muestras empleadas en más de la mitad de nuestros pacientes con diagnostico de L.A.M y L.A.L. Como se observa en la tabla 6, Grafica. 1 los resultados muestras que las concentraciones de la proteína MICA de pacientes con L.A.M están en valores arriba de los 100 ng/ml en comparación con las muestras que se utilizaron como controles cuyos valores están por debajo de los 50 ng/ml. Cabe hacer notar que aún en los controles se encontraron dos muestras con valores cercanos a los 100 ng/ml lo que representa probablemente que estas personas estaban cursando con un cuadro de estrés fisiológico o con una infección en curso. Con respecto a la L.A.L podemos observar que las concentraciones de la proteína MICA de estos pacientes están en valores arriba de los 130 ng/ml en comparación con las muestras que se utilizaron como controles cuyos valores están por debajo de los 50 ng/ml. Nosotros también

observamos que hay una fuerte correlación en más de la mitad de nuestros pacientes con diagnóstico de L.A.M y L.A.L que muestran concentraciones altas (100-210 ng/ml) de la proteína de estrés fisiológico MICA en los pacientes que tienen elevada la cantidad de WBC (Glóbulos Blancos) que en los pacientes que tienen cantidades menores de WBC alrededor de (100-130ng).

De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo podemos observar que la proteína MICA es secretada por las células leucémicas de pacientes con L.A.L y L.A.M ya que se pudo detectar su presencia en el suero. El segundo aspecto que se deriva de estos resultados es que al poderse detectar a la proteína MICA en el suero de los pacientes con L.A.L y L.A.M esto podría utilizarse para el diagnóstico clínico ya que de comprobarse que este fenómeno es generalizado en pacientes que sufren de esta patología esto tendría implicaciones en el diagnóstico porque podría utilizarse para medir los valores de la proteína MICA y asociarse con la patología L.A.L o L.A.M. Es evidente que estos resultados presentados en este trabajo son parciales y que se necesita de una “n” mas alta para poder tener resultados confirmatorios de la utilidad de la proteína MICA en el diagnóstico clínico. Por otra parte, también sería necesario detectar la presencia de MICB para conocer si tiene alguna participación en las patologías de L.A.L y L.A.M

Apéndice

1. Condiciones de bloqueo: leche descremada Svelty al 3% en PBS-Tween 20 al 0.05%
2. Solución de carbonatos buffer sensibilizador
 - 0.2 M carbonato de sodio (Na_2CO_3)
 - 0.2 M bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
 - 0.5 M cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
3. ejemplo: para preparar 5ml de una solución 1:100 entonces se utiliza:
50 μL de anticuerpo primario + 4950 μL de una solución de PBST en leche Svelty 3%.
4. ejemplo: para preparar 6ml de una solución 1:4000 entonces se utiliza:
1 μL de anticuerpo secundario + 3999 μL de una solución de PBST en leche Svelty 3%.

- **Tabla 12** concentración de anticuerpo 1rio y 2rio

| anticuerpo | dilución |
|-----------------------|---------------|
| anticuerpo primario | 1:100 |
| anticuerpo secundario | 1:4000 |

-la concentración de los viales del anticuerpo primario y secundario fueron de 50 microgramos

-Se analizaron 22 sueros de pacientes diagnosticados con leucemia del Instituto Mexicano del Seguro Social # 25 México DF

10 sueros de pacientes fueron leucemia aguda linfoblástica, 12 muestras de pacientes con leucemia aguda mieloblástica.

Los datos generales de los pacientes se muestran en las **tablas 6 y 7** respectivamente, así como los resultados de medir la proteína MICA en el suero de los 22 pacientes analizados.

12. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

-Por medio de la técnica de ELISA es posible determinar la proteína de estrés fisiológico MICA en el suero de pacientes con leucemia aguda mieloblástica y leucemia aguda linfoblástica. Proponemos que es importante seguir trabajando con la proteína MICA en otros campos de la medicina por citar algunos: cardiología, hepatología etc. Y llegar a deducir si hay alguna asociación entre el padecimiento y la proteína MICA, o si es que algunos padecimientos específicos son los responsables de la expresión de los genes MIC. Así también aunque el diagnóstico de las leucemias se establece por la biometría hemática, y la observación inevitable de células blásticas en un extendido de sangre conteniendo un 30% de dichas células, es importante recurrir a técnicas mas específicas para el diagnóstico preciso de la leucemia, es aquí donde creemos que también las proteínas MICA pudieran estar involucradas para el diagnóstico y pronóstico del padecimiento, de la siguiente manera: monitoreando la proteína MICA en el transcurso de la enfermedad. Sabemos que es un trabajo difícil pero no imposible de realizar. De trascendencia importante tendría todo esto ya que de un diagnóstico preciso un tratamiento mejor.

-es importante señalar que al empezar utilizar las condiciones de la técnica de ELISA era importante adecuarlas a una estandarización y condiciones favorables para la reproducibilidad de los ensayos ya que de otra manera no se hubieran tenido buenos resultados, así que las modificaciones más notables para la realización de este trabajo fueron: usar leche descremada al 3% en PBST, en lugar de albúmina, sustrato ABTS en lugar de OPD por ejemplo, incubar la proteína recombinante 1hrs. a 37°C, 3 lavados entre cada reacción, 1 hora de incubación para el anticuerpo primario, media hora para el anticuerpo secundario, ABTS como sustrato y por ultimo leer en un lapso de 45 minutos a 1 hora. Consideramos que nuestro método de ELISA modificado servirá para futuras determinaciones de la proteína MICA.

Con respecto a la L.A.L podemos observar que la concentración media de la proteína MICA de estos pacientes están en valores de 158 ng en comparación con

las muestras que se utilizaron como controles cuyos valores están por debajo de los 54.2 ng. Es importante apreciar que hay una alta cantidad de proteína MICA en pacientes con LAL y LAM que en los controles. Por último una producción alta de proteína MICA pudiera estar asociada o involucrada con la cantidad de glóbulos blancos.

13. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Al reconstituir los viales de la proteína MICA (rMICA) y anticuerpos es importante después de reconstituir cada uno de estos, hacer alicuotas en fracciones de 150µl o dependiendo la cantidad a ocupar en dicho ensayo, esto es para no descongelar todo el vial, por la razón de que hemos notado que las estructuras de la proteína MICA son muy lábiles y fácil de desnaturalizarse.

14. REFERENCIAS

- 1.- Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S and Inoko H. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Inmunogenetics* 1997. 46:499-508.
- 2.- Bahram S and Spies T. The MIC gene family. Non- polymorphic antigen presentation molecules. *Res Immunol* 1996a; 147:328-33.
- 3.- Bahram S and Spies T. Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Inmunogenetics* 1996b; 43:230-33.
- 4.- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE and Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:6259-63.
- 5.- Bahram S, Mizuki N, Inoko H and Spies T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Inmunogenetics* 1994a; 44:80-1.
- 6.- Bahram S, Shiina T, Oka A, Tamiya G and Inoko H. Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Inmunogenetics* 1996b; 45:161-2.
- 7.- Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Advances in Immunology* 2001; 76:1-60.
- 8.- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727-9.
- 9.- Claudia F.M. Purificación de antígenos específicos de Leishmania mexicana mexicana usando una colimna de intercambio iónico, reconocidos por sueros de pacientes con leishmaniasis. Tesis 2000

- 10.- Das H., Groh V., Kujil C., Sugita M., Morita C. T., Spies T., Bukowski J.F. 2001. MICA Engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. Vol. 15:83-93.
- 11.- Diefenbach A. And Raulet D.H. 1999. Natural killer cells: Stress out, turn on, tune in. *Current Biology*. Vol 9:22:851-853
- 12.- Diefenbach A., Jamieson A.M., Liu S.D., Shastri N., Raulet D.H. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and macrophages. *Nat. Immunol.* 1:119-126.
- 13.- Fischer G, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Travers PJ and Madrigal JA. Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 2000; 51:591-9.
- 14.- Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I and Bahram S. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996; 44:351-7.
- 15.- Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I and Bahram S. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 1999; 49:557-60.
- 16.- Gaudieri S, Leelayuwat C, Townsend DC, Mullberg J; Cosman D and Dawkins RL. Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC. *Immunogenetics* 1997a; 45:209-16.
- 17.- Gaudieri S, Giles KM, Kulski JK and Dawkins RL. Duplication and polymorphism in the MHC: Alu generated diversity and polymorphism within the PERB11 gene family. *Hereditas* 1997b; 127:37-46.
- 18.- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M and Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:12445-50.

- 19.- Groh V, Steinle A, Bauer S and Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 1998; 279:1737-40.
- 20.- Groh V., Rhinehart R., Scecrist H., Vauer S., Grabstein K., d Spies T. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived δ T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96: 6879-6884.
- 21.- Groh V., Wu J., Yee C. & Spies T. 2002. Tumor-derived soluble MIC ligands impar expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734-738
- 22.- Guillermo J. R. Hematología. México: Editorial Panamericana, 2003: 225-245.
- 23.- Helmut R, Holger A, Friederike G, Stefan Zoltan and Alexander S. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia.*BLOOD* 2003; 102 (4): 1389-96.
- 24.- Holmes M.A. Li P., Petersdorf E. W., Strong R.K. 2002. Structural of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stree-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *Journal of immunology* 1395-1400.
- 25.- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F.H., 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells *J. Exp. Med.* 173, 1017-1020.
- 26.- Huard B. And Karlsson L. 2000. KIR expression on self-reactive CD8+ T cells controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* 403: 325-328.
- 27.- Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C. W., Xiong N., Carlyle J.R., Raulet D.H. 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. Vol.17:19-29.
- 28.- Jesús F.S Cuestiones en hematología. España: Editorial Elsevier Science; 2^{da} edición, 1998:95-106

- 29.- Kandil E, Noguchi M, Ishibashi T and Kasahara M. Structural and phylogenetic analysis of the MHC class I like Fc receptor gene. *J. Immuno* 1995; 154(11):5907-18.
- 30.- Kennedy C., Naipian A., Gruis A. N., Strujik L., Ter S.J., Willemze R., Frans H.J., Bouwes N.J., Doxiadis I. N. 2002. MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer. *The journal of investivative dermatology*. Vol 118 No.4:686-691.
- 31.- Leelayuwat C, Pinelli M and Dawkins RL. Clustering of diverse replicated sequences in the MHC. *J. Immunol* 1995; 155:692-8
- 32.- Leiner LL. 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Current opinion immunology*. Vol. 15:17
- 33.- Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T and Strong RK. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T cell ligand. *Immunity* 1999; 10:577-84.
- 34.- El Manual Merck. España: Editorial Oceano; 16ª Edición, 1992: 1374-1386
- 35.- Mendoza-Rincón J, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Fischer G and Madrigal JA. Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing. *Inmunogenetics* 1999; 49:471-8.
- 36.- Mendoza-Rincón JF, Partida Rodríguez O, Soto Cruz I, Corona Ortega MT, Rangel Corona R, García del Valle A, Weiss Steider B. *Vertientes* 2001 4:11-18.
- 37.- Mizuki N., Ota M., Kimura M. 1997^a. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of the six GCT repetitions with behcet disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol.94:1298-1303.
- 38.- Oscar R. *Inmunología (de memoria)*. México: Editorial Panamericana, 1996.
- 39.- Patricia C. cocom-Góngora, Mirza C. Los receptores de los linfocitos de la inmunidad innata. *Rev. Biomed* 2004;15:113-122.

- 40.- Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Inoko H, Hauptmann G, Debre P, Bahram S and Theodorou I. Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics* 1997; 46:434-6.
- 41.- Pellet P, Vaneensberghe C, Debré P, Sumyuen MH y Theodorou I. 1999. MIC genes in non-human primates. *Eur. Journal of immunogenetics*. Vol. 26:239-241.
- 42.- Dr. Rubén M, S. Curso teórico practico de Inmunología. 2002
- 43.- Samuel B. C, Claudia M. R. Determinación de las Proteínas MICA y MICB en Células Provenientes de Cáncer de Cérvix. Tesis 2004. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FESZ). México. DF
- 44.- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, y col. Molecular dynamics of the MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999a 96(23): 13282-7.
- 45.- Stephens HA, Vaughan RW, Collins R, Kondeatis E, Theron J and Payne A. Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphism in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens* 1999; 53(2):167-74.
- 46.- Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?. *TRENDS Immunol* 2001; 15 (4): 23-31.
- 47.- Stephens HA. MHC haplotypes, MICA genes and the "wonderland" of NK receptor polymorphism. *TRENDS Immunol* 2002; 23 (8): 385-386.
- 48.- Sutherland CL., Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol*. 168:671-679.
- 49.- Vetter CS, Groh V, Straten P, Spies T, Brocker E, Becker JC. 2002. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J. Of investigative dermatology*. Vol. 118:4: 600-605

- 50.- Visser CJT, Tilanus MGJ, Tatari Z, y col. Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes. *Inmunogenetics* 1999. 49:561-6.
- 51.- Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., Phillips J.H. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 285:730-732.
- 52.- Yokoyama W M. 2002. Catch us if you can. *Nature* Vol. 419:679-698.
- 53.- Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B and Stastny P. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol* 2001; 62(6):620-31.
- 54.- Zwirner NB, Fernández-Viña MA and Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes. *Inmunogenetics* 1998; 47:139-48.