



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGIA**

“Identificación de Fas (CD95) y Fas-L (CD178) en población de células CD8+ de sangre periférica y médula ósea de niños con diferentes estadios de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**Juan Alberto Ponciano Gómez**

DIRECTOR DE TESIS: DR EN C. RAFAEL JIMÉNEZ FLORES



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO 2009



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.

### ***Dedicatoria***

**Dedico este trabajo a mis Padres Juan Ponciano Zaragoza y Fe Cira Gómez Méndez, a mis hermanos Karla, Diana y Luis, gracias por otorgarme su apoyo no solo económico sino también emocional y moral; Sin el cual no hubiese podido culminar este logro.**

***“Gracias” por darme la posibilidad de llamarlos así... Mi Familia.***

**Madre, serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, gracias por enseñarme que todo se puede aprender y que todo esfuerzo es al final recompensa. Tu esfuerzo, se convirtió en tu triunfo y el mío, *Te amo.***

**Papa, eres mi ejemplo a seguir, tu empeño y esfuerzo son admirables, algún día quisiera llegar a ser tan solo la mitad del hombre que tu eres.**

**A ti Myriam mi vida, que eres la luz en mi camino, gracias por tu apoyo, cariño, tolerancia y sobre todo por mostrarme que hasta aun en la más grande obscuridad puede salir el sol.**

### ***Agradecimientos***

**Son tantas personas a las cuales debo parte de este triunfo:**

**A mis amigos; Santiago y la familia Carbajal gracias por ayudarme a creer y madurar como persona y por estar conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles.**

**A todos mis Familiares gracias por comprender mi ausencia en los eventos de la familia.**

**Gracias a mi tutor el Dr. Rafael Jiménez Flores por ser más que un guía académico, gracias por su apoyo, comprensión y enseñanzas.**

**Gracias a todos los miembros del laboratorio de Inmunología de la UMF por su apoyo a este trabajo.**

**A todos mis profesores en especial al Dr. Elías Piedra gracias por sembrar en mí la inquietud y las ganas de estudiar.**

**Gracias a mis Sinodales por su tiempo y sus consejos, para hacer de este un trabajo de calidad.**

**Gracias al Dr. Leopoldo Flores Romo del CINVESTAV y el personal de su laboratorio, así como al maestro Víctor Rosales, por permitirme el uso de sus instalaciones, materiales y su apoyo con sus conocimientos tanto teóricos como prácticos, así mismo gracias al Dr. Arturo Cerbulo del INPer por su apoyo en el análisis de las citometrias.**

**Gracias al personal del Centro Médico Nacional "La Raza" la Dra. Dueñas, Dra. Jiménez y la QFB Wendy por su apoyo en la coordinación y toma de muestras.**

**Gracias a los niños del servicio de hematología que sin saberlo hicieron este trabajo realidad.**

**Y a todos aquellos, que en este momento no vienen a mi memoria, pero que fueron participes en mi formación tanto académica como personal GRACIAS.**

***“Dios no solo juega a los dados,  
Sino que a veces los tiras donde no podemos verlos”***

***Stephen Hawking.***

## Índice

Resumen .....	6
Introducción .....	7
Leucemia linfoblástica aguda.....	8
Etiología y patogénesis. ....	9
Factores de riesgo.....	9
Cambios genéticos adquiridos.....	10
Características clínicas.....	11
Características de laboratorio.....	11
Diagnóstico y clasificación celular. ....	11
Clasificación inmunológica .....	12
Clasificación Genética. ....	14
Factores pronóstico .....	14
Tratamiento .....	15
Apoptosis .....	17
Características de la muerte celular programada.....	21
Apoptosis en enfermedades humanas. ....	23
Fas y Fas-L.....	26
Fas ligando.....	27
Fas .....	28
La activación de caspasas.....	30
Justificación .....	33
Objetivos.....	33
Hipótesis.....	33
Material y Metodología .....	34
Resultados.....	38
Discusión .....	59
Conclusiones .....	63
Perspectivas .....	64

## Resumen

La Leucemia es el cáncer más frecuente en niños menores de 14 años a nivel mundial. En México la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) representa 80.5% de esta patología con una incidencia de 44.9 casos por millón de niños durante el período del año 1996 a 2000. Esta neoplásia hematológica se origina de un solo progenitor de linfocitos T o B.

Estudios recientes indican que las células no funcionales o malignas, en particular, los linfocitos T y B, se eliminan de manera normal por apoptosis mediante la vía Fas/Fas-L. Esta unión resulta en la activación de la cadena de caspasas, llevando la célula a una muerte celular programada.

Revisando la literatura no se encontró información sobre el estado de esta vía en la LLA el objetivo de esta investigación fue Identificar el nivel de expresión de FAS y FAS-L en linfocitos de niños mexicanos con diferentes estadios de evolución de LLA (Diagnostico de NOVO, RECAÍDA, VIGILANCIA), utilizando citometría de flujo, obtuvimos el numero de linfocitos T CD8+ que expresan Fas y Fas-L, así como la intensidad media de fluorescencia (MFI). En SP y MO los resultados muestran que el número de células y el MFI no varía con respecto a la muestra sea esta en MO o SP; Y que al comparar los niveles de expresión de las moléculas entre los 3 grupos de evolución de la enfermedad solo existe una elevación estadísticamente significativa de los valores del grupo de NOVO con respecto a los del grupo de VIGILANCIA, en los demás grupos no se presenta una diferencia estadísticamente significativas, esta elevación parece ser congruente ante el daño celular y fragmentación del ADN en una neoplasia como la leucemia, En el caso de Fas-L parece existir una alteración que provoca que el comportamiento no sea el esperado de tal forma que esta alteración podría estar relacionada con el desarrollo u origen de la enfermedad, sin que esta signifique que sea el único factor relacionado con el cáncer.

## **Introducción**

La leucemia es el tipo de cáncer más frecuente en niños menores de 14 años y corresponde al décimo lugar como causa de muerte por cáncer a nivel mundial (1,2); su incidencia varía dependiendo de área del mundo, siendo peculiarmente frecuentes las leucemias agudas (LA) en poblaciones de origen hispano (3, 4, 5). En México, la incidencia de las LA es de 58.5 por millón de niños, donde la leucemia linfoblástica aguda representa el 80.5 %, con una incidencia de 44.9 por millón de niños entre el año 1996 y 2000 (6), cifra que resulta ser mayor que la registrada en el año de 1991 cuando la incidencia reportada fue de 22.2 por millón de niños.

La leucemia fue oficialmente diagnosticada por primera vez, en 1845 por John Hughes Bennett el cual publicó un artículo que llevó por nombre: *Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver in which Death Took Place from Suppuration of the Blood*. Esta enfermedad fue denominada como leucocitemia por el diario médico y quirúrgico de Edimburgo (7); al comienzo del siglo XIX los médicos en Europa comenzaron a encontrar en sus pacientes altos números de células blancas en sangre, por lo que llamaron "Weisses blut" o "sangre blanca" a la patología. El término "Leucemia" que se usa actualmente proviene de las raíces griegas *leukos* y *hemia* que significa "sangre blanca". En el año de 1913, surgió la primera clasificación de las leucemias dividiéndola en 4 clases: leucemia linfocítica crónica, leucemia Mielogénica crónica, leucemia Linfocítica aguda y la eritroleucemia. En el siglo XVIII Thomas Fowler generó un tratamiento conocido como solución de Fowler, la cual era una combinación de arsénico y bicarbonato de potasio que se convirtió en el remedio estándar para enfermedades como la anemia y la leucemia, hasta el comienzo del siglo XX con el advenimiento de la radioterapia (8,9).

La leucemia es descrita comúnmente como una proliferación neoplasia generalizada de leucocitos inmaduros en médula ósea (10,11), que puede

propagarse a sangre periférica, ganglios linfáticos, bazo, hígado, sistema nervioso central y otros órganos. La leucemia es una enfermedad compleja que tiene muchos tipos y subtipos diferentes. El tratamiento y el pronóstico del paciente leucémico varían de manera significativa y depende del tipo exacto de leucemia y múltiples factores individuales. En la actualidad se acepta una clasificación en la cual se divide a las leucemias en cinco tipos (10):

- I. Leucemia mieloide aguda.
- II. Leucemia mieloide crónica.
- III. Leucemia Linfocítica crónica.
- IV. Leucemia linfoblástica aguda.
- V. Leucemia de células peludas.

Cada uno de estos tipos de leucemia posee características específicas y subtipos, elementos que la hacen una enfermedad muy compleja.

### **Leucemia linfoblástica aguda**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un desorden maligno que se origina de un solo progenitor de linfocitos T o B. La proliferación y acumulación de células blásticas en la médula ósea resulta en la supresión de la hematopoyesis y después de esto, anemia, trombocitopenia y neutropenia (10,11). La infiltración extramedular de linfoblastos puede ocurrir en varios tejidos, especialmente las meninges, gónadas, timo, hígado, bazo y los ganglios. Esta enfermedad es más común en niños de entre 1 y 5 años con un pico entre los 3 y 4 años (16). La LLA tiene muchos subtipos que pueden ser clasificados usando morfología, inmunología, citogenética y métodos de genética molecular (17,18 ,19 ,20).

La LLA es una enfermedad neoplásica que resulta de la mutación somática en una célula linfoide progenitora, en alguna de las etapas del desarrollo celular. El inmunofenotipo de las células leucémicas constituyen un diagnóstico del nivel

de diferenciación de la clona dominante (21,22). El origen clonal de la LLA se estableció mediante un análisis citogenético y un análisis de restricción de fragmentos para mujeres que son heterocigotas para la poliforma del cromosoma X (10). También el análisis del gen del receptor de las células T, los genes de las inmunoglobulinas y su rearreglo, han documentado la naturaleza monoclonal de la enfermedad (23). Las células leucémicas se dividen más lentamente y toman un tiempo más largo en sintetizar su ADN, que sus contrapartes hematopoyéticas normales, entonces las células leucémicas se acumulan implacablemente, compitiendo y substituyendo con éxito las células hematopoyéticas normales y dando por resultado anemia, trombocitopenia y neutropenia (10).

#### *Etiología y patogénesis.*

El inicio y progresión de la LLA se conduce por mutaciones sucesivas en diferentes etapas del desarrollo de las células blásticas (1). Así los subtipos específicos de LLA parecen tener orígenes genéticos distintos unidos por diversos mecanismos responsables. Agentes medioambientales como la radiación ionizante, los agentes químicos mutágenos, han sido implicados como inductores de la LLA en algunos pacientes. Sin embargo, la mayoría de los casos carece de factores etiológicos perceptibles. Actualmente se considera que la LLA es el reflejo de la interacción entre múltiples factores genéticos y factores medioambientales, siendo necesario un modelo para ser confirmado en una población bien controlada y con estudios epidemiológicos moleculares (10,18).

#### *Factores de riesgo*

A pesar de la falta del conocimiento de los factores que aumentan el riesgo de LLA. En una minoría de casos está asociado con síndromes genéticos heredados de la predisposición, implicando a menudo los genes que codificaron las proteínas que afectan la estabilidad genómica y la reparación del ADN. La

variación normal inherente al polimorfismo genético, también puede contribuir indirectamente al riesgo de leucemia

### *Cambios genéticos adquiridos*

Los linfoblastos en, virtualmente, todos los casos de LLA adquieren cambios genéticos. Estas lesiones incluyen cambios en el número y estructura de los cromosomas, estos últimos corresponden a las translocaciones que son las anormalidades más frecuentes, las inversiones, deleciones, mutaciones puntuales y amplificaciones. Estos reareglos afectan la expresión de genes, la programación normal de la diferenciación celular, proliferación y sobrevivencia (1).

Existen generalmente dos mecanismos de inducción de la leucemia. Uno depende de la activación de protooncogenes o la creación, por medio de la fusión, de genes con propiedades oncogénicas. En ambos casos los genes codifican factores de transcripción, que suelen ser los blancos frecuentes de la mutación y que reflejan el papel regulatorio de estas proteínas en la función de la célula (Tabla.1) (10). El segundo mecanismo envuelve la pérdida o inactivación de uno o más genes supresores de tumores del tipo de p53, la cual inhibe la sobreexpresión de la oncoproteína MDM-2. Los supresores de tumores actúan en un punto específico del ciclo celular: la expresión P53 aumenta cuando existe daño de ADN, bloqueando la división de la célula en G1 del ciclo de la célula para permitir la reparación del ADN y es capaz de estimular la apoptosis de la célula que tengan daño irremediable en el ADN; por lo tanto la pérdida de función del supresor del tumor en la célula leucémica, le da una ventaja proliferativa o previene su muerte programada normal. En la actualidad existen varios ejemplos de este tipo de genes, que definen un mecanismo fundamental responsable de la regulación aberrante de la muerte celular en LLA (11,1).

### *Características clínicas.*

La presentación clínica de la LLA es variable. Los síntomas pueden ser insidiosos o agudos. La presencia de las características generalmente refleja el grado de infiltración de la médula ósea y su consecuente disfunción. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan fiebre inducida por citocinas pirógenas relacionadas con los leucocitos, incluyendo la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 y el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ). En algunos otros casos la fiebre es secundaria a una infección. La fatiga, el cansancio extremo y la pérdida de peso y del apetito, son datos frecuentes. Los signos y síntomas resultan finalmente de la falla de la médula ósea (Tabla 2) (10).

### *Características de laboratorio*

La anemia, neutropenia y trombocitopenia son resultados comunes en pacientes con reciente diagnóstico de LLA, esto es el reflejo de la degradación de la médula y remplazo con linfoblastos. El conteo de glóbulos blancos es elevado en el 60% de los casos sin embargo, el número de leucocitos normales disminuye y lo que realmente se cuantifica es el número de blastos circulantes. Un conteo de glóbulos blancos por encima de  $50 \times 10^9/L$  es frecuente verlo asociado a una prominente linfadenopatía y hepatoesplenomegalia (Tabla 2) (10).

### *Diagnóstico y clasificación celular.*

El examen cuidadoso de la médula es esencial para establecer un diagnóstico de LLA, porque el 16 % de los pacientes carecen de blastos en sangre periférica al momento del diagnóstico. También, la morfología de la célula leucémica en sangre puede variar contra las de la médula. La fibrosis, en ocasiones puede dificultar el aspirado de la médula, haciéndose necesario una biopsia de hueso, la cual es utilizada para un diagnóstico citológico (18,11).

### *Clasificación inmunológica*

Debido a la falta de características citoquímicas y morfológicas específicas de los linfoblastos de la leucemia, el inmunofenotipo es una parte esencial para el diagnóstico. Los anticuerpos monoclonales creados para este propósito CD (cluster of differentiation), son anticuerpos capaces de reconocer el mismo antígeno celular, pero no necesariamente el mismo epítipo. La mayoría de los antígenos leucocitarios no presentan especificidad, por lo que es necesario establecer un panel de anticuerpos para el diagnóstico y para distinguir entre las diferentes subclases inmunológicas de las células leucémicas (1,10).

Aunque los casos pueden ser subclasificados de acuerdo con las etapas normales de la vía de maduración dentro del linaje T (temprano, medio y tardío del timocito), la única distinción de importancia terapéutica son las existentes entre el inmunofenotipo de las células T y B maduras, y otros linajes B (Precusores de células B) (1).

La LLA Pre B (con presencia de inmunoglobulina citoplasmática), ocurre en el 20 % de la niñez y el 10 % de los casos de adultos, alguna vez fue considerado como un subgrupo específico fenotípicamente. Sin embargo, las características de alto riesgo, anteriormente adscrito a este subgrupo, se encuentran más estrechamente asociadas con la presencia de la t (1; 19) y la fusión de genes E2A-PBX1. La LLA Pre B transicional se caracteriza por la expresión en el citoplasma y superficie de la cadena pesada de inmunoglobulinas  $\mu$  sin la expresión de ligeras  $\kappa$  o  $\lambda$ . La LLA de células Pre B transicional se presenta, aproximadamente en el 3 % de los casos de LLA infantil.

<b>Características Clínicas</b>	<b>Porcentaje de presentación</b>	<b>Características de laboratorio</b>
<b><u>Síntomas</u></b>		<b><u>Glóbulos Blancos (x 10<sup>9</sup>/L)</u></b>
<b>Fatiga</b>	92	<b>&lt; 10</b>
<b>Dolor de articulaciones</b>	79	<b>10-49</b>
<b>Fiebre sin infección</b>	71	<b>50-99</b>
<b>Pérdida de peso</b>	66	<b>&gt;= 100</b>
<b>Baja de peso</b>	62	<b>Neutrofilos (x 10<sup>9</sup>/L)</b>
<b>Purpura</b>	51	<b>&lt;1</b>
<b>Hemorragia</b>	27	<b>1-2</b>
<b><u>Resultados físicos</u></b>		<b>&gt;2</b>
<b>Esplenomegalia</b>	86	<b><u>Volumen del paquete celular (L/L)</u></b>
<b>Linfadenopatía</b>	76	<b>&lt; 30</b>
<b>Hepatomegalia</b>	74	<b>&gt;30</b>
		<b><u>Plaquetas (x 10<sup>9</sup>/L)</u></b>
		<b>&lt; 50</b>
		<b>50-150</b>
		<b>&gt;150</b>

Tabla 2. Frecuencia de las características clínicas y de laboratorio en el diagnóstico de niños y adultos con leucemia linfoblástica aguda (10).

En algunos estudios, los casos de LLA de precursores de células B se subdividen en CD10 positivos (llamado LLA común) y CD10 negativo (conocido como pre pre B CD10 negativo o LLA de precursores B); mientras que los casos de LLA de linaje T, son clasificados como pre T (o pro T) y leucemias de células T maduras. A pesar de sus implicaciones pronósticas, estas categorías de LLA no se han utilizado para el tratamiento. La Tabla 3 resume las principales características de los seis subtipos inmunológicos de LLA (10).

### *Clasificación Genética.*

La Leucemia Linfoblástica Aguda surge a partir de una célula progenitora linfopoyética, que ha sufrido daños genéticos específicos que conducen a la transformación maligna y la proliferación. De este modo, la clasificación genética de las células blásticas genera más información biológica pertinente que la que se puede obtener por otros medios. Aproximadamente el 60% de los casos de adultos y el 70% de los casos infantiles pueden ser fácilmente clasificados en subgrupos para fines terapéuticos, basados en el número de cromosomas (o ADN contenido estimado por citometría de flujo), reordenamientos cromosómicos específicos, y los cambios genéticos moleculares (Tabla 4)(10,1).

### *Factores pronóstico*

La piedra angular del enfoque terapéutico moderno para la LLA infantil ha sido la cuidadosa evaluación del riesgo de recaída, de modo que sólo los casos de riesgo estándar y alto son los casos con tratamiento intensivo, El tratamiento con menos anti metabolitos, por lo general, esta reservado para los casos de bajo riesgo. En contraste, virtualmente todos los pacientes adultos son candidatos para tratamiento intensivo. De las muchas variables que influyen en el pronóstico, el tratamiento es el más importante.

La edad y el número de leucocitos siguen siendo utilizados para la clasificación del riesgo en casi todos los ensayos clínicos pediátricos de LLA de precursores de células B. El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, ha adoptado los criterios para aquellos niños entre 1 y 9 años y un conteo de leucocitos menor de  $50 \times 10^9 / L$  como los criterios mínimos para la LLA de bajo riesgo. Este criterio, probablemente sólo se aplica a los precursores de células B y no a las LLA de células T. El género ha sido desde hace mucho tiempo reconocido como un importante factor pronóstico en la LLA infantil. A pesar de la consistencia de este hallazgo, las diferencias de género sólo han atraído escasa atención en la terapia hasta hace poco. Aunque los niños y las

niñas se han beneficiado de la reciente mejora de la terapia, los niños suelen presentar resultados menos benéficos en comparación con las niñas, esto sólo se explica en parte por la mayor frecuencia de LLA de células T en los niños. Un elemento útil en la evaluación del riesgo es la respuesta al tratamiento precoz, según los reportes de la tasa de disminución de las células leucémicas en sangre o médula, o por el nivel de enfermedad mínima residual después de la inducción de una remisión clínica. Actualmente se ha desarrollado un sistema de clasificación utilizando el factor de riesgo (Tabla 5).

### *Tratamiento*

El tratamiento de los pacientes con LLA está adaptado al riesgo del paciente al diagnóstico y comprende tres fases: inducción, intensificación (consolidación) y mantenimiento. La duración global es de un mínimo de dos años.

#### Inducción

El objetivo inicial de todo tratamiento de una LLA es inducir una remisión completa con una recuperación de la hematopoyesis normal. Decimos que un paciente está en remisión completa cuando no existe evidencia de leucemia ni en su exploración física ni en el examen de sangre periférica ni de médula ósea. Los valores en sangre periférica deben ajustarse a los normales para la edad del paciente y la médula ósea debe tener una celularidad normal, con menos del 5% de blastos. La remisión completa incluye también la ausencia de afectación del SNC o de afectación extramedular. Obtener la remisión completa es la base del tratamiento de la LLA y un requisito imprescindible para tener una supervivencia prolongada. Con la mejoría de los tratamientos de soporte y de los agentes quimioterapéuticos, la tasa de remisión completa alcanzada se aproxima al 96-99%.

### Intensificación (consolidación)

La fase de intensificación es la administración de un tratamiento intensivo inmediatamente tras finalizar la inducción.

### Mantenimiento

Los pacientes con LLA requieren tratamientos de mantenimiento muy prolongados. Se ha comprobado que en algunos pacientes que están en aparente remisión completa, al analizar sus células con técnicas de biología molecular, encontramos enfermedad mínima residual. Es por ello que los tratamientos de mantenimiento se mantienen al menos durante dos años, con reevaluaciones frecuentes para la detección de recaídas (4,17, 19, 24)

### Tratamiento del SNC

El SNC actúa como un “santuario” para las células leucémicas, porque están protegidas por la barrera hemato-encefálica, que no permite a los agentes quimioterapéuticos alcanzar concentraciones adecuadas. Para la profilaxis del SNC, se utiliza punciones lumbares repetidas y frecuentes con quimioterapia intratecal.

### Tratamiento de la recaída

Aunque los resultados totales para los niños con LLA han mejorado durante los últimos 40 años, el tratamiento de los niños que experimentan recaída sigue siendo un desafío significativo. A pesar de regímenes de tratamiento intensivos, el 15% a 20% de pacientes recae, y la gran mayoría de estos niños muere. La mayoría de las recaídas (75%) ocurre dentro del plazo de 3 años de diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico dependen del sitio de la recaída (médula o extramedular), donde aproximadamente el 12% de las recaídas es a nivel de médula, 4% a SNC y 1.3% a testículo. Los factores asociados a un diagnóstico desfavorable incluyen la recaída de LLA-T y una recaída temprana en médula (durante la primera remisión <36 meses de

diagnóstico). Los resultados son mejores para las recaídas en el SNC o testiculares y una recaída tardía en médula en LLA-B.

### Trasplante hematopoyético

Los pacientes con criterios de muy alto riesgo al diagnóstico, así como aquellos que sufren una recaída, tienen en general una mala evolución si se les trata sólo con quimioterapia convencional. Es en estos pacientes en los que el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) ha conseguido aumentar su supervivencia. Actualmente las indicaciones de TPH en la LLA se resumen en: LLA con t9:22, pacientes que no alcanzan la remisión completa tras el tratamiento de inducción y pacientes con recaída (sobre todo si la recaída es precoz).

### Apoptosis

La apoptosis es una forma fisiológica de muerte celular, que ha evolucionado en los organismos multicelulares como un mecanismo de eliminación de células no deseadas. La apoptosis es un proceso celular automático, que puede ser activado por la detección de un receptor que se expresa cuando existe daño celular. Son pasos enzimáticos coordinados, orquestados por la activación de una clase específica de proteasas (caspasas), las cuales son controladas por inhibidores en cada uno de estos, lo que confiere un estricto control sobre este proceso letal. La destrucción de células se acompaña de alteraciones en la mayoría de orgánulos, en particular las mitocondrias, así como cambios en el citoesqueleto, membrana plasmática, los sistemas de transporte de iones, y culmina en la degradación del ADN nuclear mediante la acción de endonucleasas.

Subtipo	Marcadores	Frecuencia en niños	Características asociadas
<b>Precusores de células B Pre-pre B</b>	CD19+, CD22+, CD79a, clg+-, sLg-, HLADR+ CD10-	5	Alto conteo de leucocitos, pseudo diploidias, pronóstico desfavorable.
<b>Temprana Pre-B</b>	CD10+	63	Diagnóstico favorable en el grupo de edad de 1-9 años, bajo conteo de leucocitos, hiperdiploidias > 50 cromosomas.
<b>Pre-B</b>	CD10+-, clg+	16	Alto conteo de leucocitos, pseudodiploidias
<b>De células B</b>	CD9+, CD33+, CD79a+, clg+, slg+	3	Predominante en hombres, masas abdominales, con frecuencia afectación renal
<b>De linaje T</b>	CD7+CD3+, CD2+, CD1+-, CD4+-, CD8+-, HLA-DR-, TdT+	12	Predominante en hombres, hiperleucocitosis, enfermedad extramedular
<b>Pre-T</b>	CD2-, CD1-, CD4-, CD8-, HLA-DR+-, TdT+	1	Predominante en hombres, hiperleucocitosis, enfermedad extramedular, pronóstico desfavorable

Tabla 3. Características y marcadores de los subtipos inmunológicos de la LLA. Abreviaturas: cCD3 CD citoplasmático, slg inmunoglobulina citoplasmática, slg inmunoglobulina de superficie, TdT deoxinucleotidil transferasa terminal (10).

Subtipo	Características asociadas	Frecuencia
<b>Hiperdiploidias cromosomas &gt;50</b>	Fenotipo precursor de células B, conteo de leucocitos bajo, diagnóstico favorable	80-90
<b>Hipodiploidias cromosomas &lt;45</b>	Fenotipo de precursor de células B, conteo de leucocitos incrementado, diagnóstico pobre	30
<b>Fusión ETV6-CBFA2</b>	CD13-+/CD33+- fenotipo pre-B, pseudodiploidia, pronóstico favorable	85-90
<b>t(1;19)(q34;q23)</b>	CD10+/CD20+/-/CD34-, fenotipo pre-B, pseudodiploidias incremento de leucocitos, pronóstico intermedio	70-80
<b>t(9;22)(q34;q11)</b>	Fenotipo de precursores de B, incremento de leucocitos, malos resultados	20-40
<b>t(4;11)(q21;q23)</b>	CD10-/CD15+/-/CD33+/-/CD65+- fenotipo precursor de B, hiperleucocitosis, malos resultados	110-35
<b>t(8;14)(q24;q32.3)</b>	Fenotipo de Células B, predominante en hombres pronóstico favorable	75-85
<b>t(1;14)(p34;q11)</b>	CD10- fenotipo células T, predominante en hombres, hiperleucocitosis, pronóstico intermedio	65-75
<b>dic(9;22)(p11-12;?p12)</b>	CD10+ fenotipo precursor de B, predominante en hombres, leucocitos bajos, pronóstico excelente	80-90

Tabla 4. Subtipos genéticos de la LLA (10)

Grupo de riesgo	Características
<b>Bajo</b>	Fenotipo de percursores de células B, edad entre 1-9 años, presenta conteo de leucocitos de, fusión ETV6-CBFA2, hiperdiploidia, >50 cromosomas
<b>Estándar</b>	T (9; 22), t (1; 19) hipodiploidia respuesta temprana pobre.
<b>Alto</b>	T (9; 22) (BCR-ABL), con leucocitos >25X10 <sup>9</sup> /L, respuesta temprana pobre.

Tabla 5. Clasificación de LLA por grupo de riesgo (10).

La apoptosis es un término originalmente acuñado por Kerr, Wyllie, y Currie para describir una forma de muerte celular, caracterizado por el encogimiento celular y condensación nuclear. La palabra apoptosis es un neologismo derivado directamente de la palabra griega (απωπτωσις) utilizada para expresar la “caída de las hojas” debido al significado de “ptosis” (πτωσις, “caída”) y el prefijo “apo” (απω, “inducción a”) referida a la pérdida otoñal de las hojas. La apoptosis se produce en todos los organismos multicelulares como un recurso para equilibrar la proliferación celular en los tejidos que se renuevan continuamente, a fin de mantener un tamaño armónico de órganos. En el sistema hematopoyético, la producción de células es delicadamente equilibrada por medio de la muerte celular y la eliminación a través del sistema de monocito macrófagos.

Un conjunto de citocinas y factores de crecimiento regulan la supervivencia celular, proliferación y apoptosis. Factor de células madre, Flt ligando, trombopoyetina, e IL-3 suprimen la apoptosis, mientras que IL-6 y IL-11 estimulan la proliferación de los primeros progenitores. El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-FCD) puede suprimir la apoptosis y desencadenar la proliferación. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), Fas ligando, TNF-relacionados con la inducción de apoptosis

ligando (TRAIL), y el interferón gamma promueven la apoptosis de las células que expresan los receptores apropiados.

La apoptosis ocurre en tiempos definidos durante el desarrollo. Se trata de un proceso crítico durante la embriogénesis, donde se requiere la remodelación altamente regulada por medio de la muerte celular. La muerte celular programada es el proceso mediante el cual los renacuajos pierden sus colas, y su aparición se ha estudiado en detalle en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Tres de los más importantes genes que controlan la apoptosis han sido identificados a través de estudios de desarrollo en *C. elegans*. Dos de ellos designados CED-3 y CED-4 que resultan ser esenciales en la muerte celular programada, y un gen, CED-9, se ha demostrado que es importante para oponerse a la muerte celular.

#### *Características de la muerte celular programada*

Alteraciones mitocondriales, activación de caspasas, fragmentación de la cromatina, se encuentran entre los principales eventos que caracterizan a la apoptosis. Al inicio del programa de muerte, las células se someten a la pérdida dramática del volumen, degradación de membrana, acidificación de citoplasma, la reorganización del citoesqueleto y pérdida de contacto con las células adyacentes y la matriz extracelular (10).

Alteraciones en el citoesqueleto se deben en parte a la división fotolítica de actina, así como a los cambios en la actividad de cinasas y las proteínas G que regulan el estado de montaje de los componentes del citoesqueleto. Una variedad de vías de señalización que participan en la supervivencia son inactivadas proteolíticamente (28).

#### Alteraciones mitocondriales

La mitocondria es un organelo complejo que consta de una membrana externa, una membrana interna, un espacio intermembranal y la matriz que

está delimitada por la membrana interna. La membrana externa es permeable a las pequeñas moléculas, mientras que el interior de la membrana es altamente impermeable y capaz de mantener un gradiente de protones equivalentes a 1 unidad de pH. El sistema de transporte de electrones está incrustado en la membrana interior de la mitocondria, se oxidan sustratos con el fin de pasar los protones a través de la membrana interna. Este gradiente de protones es la fuerza motriz para la síntesis de ATP. El citocromo c que sirve como un portador de electrones se encuentra en la intermembrana y la electricidad es asociada con la membrana interna. Además de su papel en la producción de ATP, las mitocondrias juegan un papel clave en la regulación de la apoptosis. El citocromo c se encuentra secuestrado en el espacio entre el interior y exterior de la membrana mitocondrial, siendo un cofactor para la activación de caspasa; por ejemplo caspasa 9 es activada a través de la interacción del citocromo c con el factor de activación de proteínas apoptóticas 1 (apaf 1).

Dos grandes alteraciones mitocondriales se producen en la apoptosis, la pérdida de citocromo c y la despolarización de la membrana interna. El primer caso es la disociación de citocromo c de la cadena de transporte de electrones, después de su liberación de la mitocondria al citosol, donde podrá participar en la activación de caspasas. La pérdida de la asociación del citocromo c con la cadena de transporte de electrones impide la entrega de los electrones a los complejos IV y desde allí al oxígeno (10).

La participación de la mitocondria en la apoptosis se encuentra regulada por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (29) la cuales son proteínas que se encuentran en relacionadas con canales en la membrana de la mitocondria, algunos de los miembros de esta familia de proteínas son los encargados reprimen mientras que otros promueven la apoptosis. Bcl-2 es capaz de impedir la liberación de citocromo c de la mitocondria, mientras que Bax promueve su liberación, además tiene semejanzas estructurales con las proteínas encargadas de generar poros en la membrana por lo cual se ha dirigido mucha atención a su posible papel como formador de poros en la membrana externa de la mitocondria.

## Alteraciones nucleares

La clásica manifestación histológica de la apoptosis es la condensación de la cromatina en el núcleo, además de la fragmentación del mismo (28). La condensación del ADN, clásica de la apoptosis, depende de la proteólisis de una o más caspasas. La digestión del ADN se logra por varias endonucleasas, eventualmente resultan fragmentos que representan múltiplos de unos 200 pares de bases a las que se les llama nucleosomas de escalera. La búsqueda de la endonucleasa responsable ha dado múltiples candidatos, incluyendo la ADNasa I y la ADNasa II. El factor de fragmentación de ADN (FFD) consiste de una caspasa con actividad de ADNasa (CAD) de 40 kDa y un inhibidor (ICAD). Y aunque la fragmentación del ADN es comúnmente observada en la apoptosis, esta no es una característica esencial. En adición, los cambios morfológicos característicos en el núcleo, como la fragmentación del ADN pueden ser detectados usando métodos histológicos o bien por medio de citometría de flujo.

### *Apoptosis en enfermedades humanas.*

La participación de la apoptosis en la fisiopatología de algunas enfermedades resulta de una pérdida del control fisiológica de estas. Más simplemente, las enfermedades se pueden agrupar en función de si hay niveles bajos o altos de apoptosis (30).

### Apoptosis excesiva

La muerte celular excesiva en particular concierne a órganos que están poblados de células totalmente diferenciadas. Cualquier célula que se pierda en estos órganos, ya sea por apoptosis o necrosis, es irremplazables. En los entornos donde la muerte celular es inevitable, la inhibición enzimática de los procesos anti apoptóticos no podrían salvar la célula, por lo cual es preferible un elevado nivel de apoptosis para evitar los daños colaterales acusados por la inflamación efecto de la necrosis

El exceso de apoptosis se encuentra relacionado con algunos trastornos hematopoyéticos. En algunos casos, esto puede ser resultado de la falta de respuesta ante un factor de crecimiento necesario, rompiendo así el equilibrio entre los elementos proapoptóticos y antiapoptóticos. El síndrome mielodisplásico que se caracteriza por citopenias periféricas y la hiperplasia de médula, actualmente se conoce que se encuentra asociado con un exceso de apoptosis en las últimas etapas de diferenciación mieloide, lo que resulta en una hematopoyesis ineficaz (31).

#### Apoptosis insuficiente

Dado que la apoptosis ocurre durante el desarrollo en tiempos bien definidos, cualquier alteración en ella puede dar lugar a defectos en esta. Sin embargo, no se han detectado anomalías genéticas en el proceso de apoptosis que conlleven a trastornos del desarrollo en humanos. Algunas ideas se han obtenido a partir del estudio de ratones "knock-out" para el gen que codifica para la Caspasa 3, que posiblemente es la proteasa más importante de la muerte celular, el resultado es que los ratones mueren en el útero o poco después del nacimiento, presentándose un exceso de tejido cerebral, debido a una falla de la muerte celular programada normal durante el desarrollo neuronal.

Existe un gran número de proteínas virales que bloquean la señal de apoptosis. Un ejemplo es la proteína CrmA del baculovirus p35 que inhibe directamente las caspasas. La proteína E1B de adenovirus que inhibe la activación de la caspasa 3. La función de estas proteínas resulta crítica para la virulencia, ya que son las encargadas de bloquear la maquinaria contra la replicación viral.

La policitemia es caracterizada por una clona anormal de progenitores eritropoyéticos, cuya proliferación es independiente de eritropoyetina. Estas células sobreexpresan Bcl-xL, que previene la apoptosis y contribuyen a la

sobrevivencia de los progenitores eritropoyéticos en ausencia de eritropoyetina (10).

La tasa de crecimiento de los tumores está determinada por el desequilibrio entre la mitosis y la apoptosis. Por ejemplo, la función del producto del gen Bcl-2 cuya sobreexpresión previene la muerte normal de células B, estando asociado entonces con el origen de linfomas. Una célula maligna puede surgir cuando una célula no se ve sometida a apoptosis cuando debería. La pérdida de un factor necesario para el crecimiento o la remoción de la matriz extracelular deben dar lugar a que la célula cometa suicidio. Sin embargo, a veces la célula no muere y logra sobrevivir y proliferar lo suficiente para que su progenie adquiera otras mutaciones, incluyendo la pérdida de p53 o la activación de oncogenes.

El producto del gen p53 es un factor de transcripción que se activa por el daño al ADN, induciendo una familia de genes dependientes de p53 que regulan el ciclo celular e inducen la apoptosis. La mutación de p53 ha sido encontrada en gran cantidad de tumores malignos y en algunas familias con síndrome cancerosos hereditarios (10). Entonces, el primer paso a la oncogénesis es la pérdida de la apoptosis. La leucemia mielógena crónica representa otro ejemplo del bloqueo normal de la apoptosis por el efecto del oncogen BCR-ABL. La modulación de la apoptosis es considerada la clave para la terapia del cáncer (32, 33).

En el sistema inmune la eliminación de células T auto reactivas es esencial para prevenir enfermedades. La señalización para la eliminación de linfocitos se realiza a través de la unión de uno o más receptores de membrana, incluyendo las moléculas conocidas como Fas/APO-1/CD95 y su ligando Fas-L (34, 35 y 36).

## Fas y Fas-L

Muchas células nocivas o inútiles se generan durante el desarrollo de la inmunidad celular. Por ejemplo, cuando los genes del receptor de linfocitos T (TCR) o de las inmunoglobulinas, o los genes del receptor de células B (BCR) son reorganizados, a menudo se obtienen células inútiles o autóreactivas. Estas células inmunes deben ser removidas antes de que entren en la periferia; además, el número de glóbulos blancos de la sangre se mantiene constante a pesar de que un gran número de nuevas células se generan, ya que alrededor de  $2 \times 10^9$ /kg neutrófilos se producen diariamente en la médula ósea y entran en el torrente sanguíneo. Sin embargo, la vida útil de un neutrófilo maduro en la sangre es de unos dos días, por lo tanto el número de neutrófilos en sangre se mantiene constante (10).

Pero ¿cómo son las células excedentes, inútiles o senescentes eliminadas de nuestros cuerpos? Esta cuestión no ha sido contestada aún en la mayoría de los casos. Sin embargo, estudios recientes indican que algunas células inmunitarias, en particular, T y los linfocitos B, se eliminan por apoptosis (37,38).

La proliferación y diferenciación de células inmunes es estimulada por citocinas como las interleucinas y factores estimulantes de las colonias. Estas citocinas estimulan una cascada de cinasas, que finalmente conduce a la expresión de un conjunto de genes y estimula la replicación del ADN. Estudios recientes demuestran que la apoptosis de las células inmunitarias también está regulada por citocinas. Estas citocinas son factores que matan activamente a las células. Los factores identificados hasta ahora son miembros de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF). En particular, Fas y su ligando (Fas-L), inducen la muerte de las células por un proceso que ha sido ampliamente estudiado bioquímicamente y genéticamente. Estos análisis revelaron funciones fisiológicas y patológicas del proceso de muerte celular en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico (37, 38, 39).

### *Fas ligando*

Fas-L es una citocina que pertenece a la familia de los TNF. Fas-L se expresa predominantemente en linfocitos T activados y en células “natural killer” (NK) (10). La expresión inducida de Fas-L en las células T activadas se produce por el carácter vinculante de NF- $\kappa$ B y Egr-3 que flanquean la región 5' del gen de Fas-L, que requiere la activación de LCK, un miembro de la familia src de tirosin cinasas. La exposición de las células T a factores como la radiación gamma o UV induce también la expresión de Fas-L (40). Esta inducción por estrés de Fas-L depende de la activación de JNA y MEKK1, lo que conduce a la unión de c-Jun y ATF2 a la sección 5' de la región promotora del gen humano de Fas-L.

Fas-L se sintetiza como una proteína de membrana tipo II, y su región extracelular de unos 150 residuos de aminoácidos está bien conservado (20-25%) con otros miembros de la familia del TNF. Un informe reciente sugiere que Fas-L se almacena en lisosomas secretores especializados en células T y NK, donde la activación de estas células hace que Fas-L se presente en la superficie celular. La región citoplasmática de Fas-L, esta formada por 77 aminoácidos. Esta región, regula la expresión de Fas-L en la superficie celular, además de que traduce la señal de proliferación de los linfocitos T CD8+ (40).

La metaloproteinasa llamada TACE (Enzima de conversión de TNF alfa) rompe la asociación de los TNF a la membrana generando productos solubles de TNF. Del mismo modo, Fas-L de membrana se somete a metaloproteinasas que por proteólisis genera formas solubles (40).

La forma de Fas-L asociado a membrana es más activa que la forma soluble induciendo la apoptosis en células T. En particular, Fas-L de ratón pierde su actividad citotóxica cuando es colocado en forma soluble sobre la membrana. Estos resultados indican que Fas-L funciona a nivel local a través del contacto célula-célula en condiciones fisiológicas y el proceso de liberar Fas-L soluble parecería tener el propósito de atenuar el proceso. La forma

soluble de Fas-L humano existe como un trímero, lo que sugiere que la forma de membrana también tiene una estructura trimérica funcional (40).

### *Fas*

Fas (también conocido como APO-1 o CD95), es el receptor de Fas-L, es una proteína de membrana tipo I, pertenece a la familia de los receptores TNF. Fas se expresa abundantemente en diversos tejidos, en particular timocitos, células T activadas, o células T transformado por VIH o HTLV-1 (40). Aunque las células B en reposo no expresan Fas, su expresión es inducida por ligando de CD40 o endotoxinas. Existe solo una copia del gen de Fas que presenta 8 intrones, el cual se encuentra en el cromosoma humano 10q24.1 y en el cromosoma 11 del ratón. En el primer intrón de este gen se encuentran los elementos encargados de la expresión de p53, el cual a su vez es el encargado de la expresión de Fas (40).

Fas se expresa en la membrana celular. Sin embargo, existen informes que sugieren que reside en el complejo de Golgi de células de músculo liso vascular humano, ahí es transportado a la superficie celular donde se vuelve p53 dependiente (40). La región extracelular de los miembros de la familia de receptores TNF presenta 2 a 6 subdominios ricos en cisteína conservados (17-30%), lo que les da identidad a los miembros de esta familia. Del mismo modo, Fas lleva tres subdominios ricos en cisteína.

Fas-L se une al Fas con un Kd de aproximadamente 1.1 nM. El "splicing" alternativo del RNA precursor de Fas puede producir formas solubles de Fas que carecen de dominio transmembranal, pero que si se pueden unir a Fas-L. El gen DcR3 codifica para un receptor homólogo a Fas (40). DcR3 también es miembro de la familia de receptor TNF y presenta 4 subdominios de cisteína, pero no tiene un dominio transmembranal y es secretado por las células. Aunque su estructura no es significativa en relación con la de Fas (17% de identidad), DcR3 se une a Fas-L con una afinidad comparable a Fas (Kd de 0.8 nM). El gen de DcR3 está localizado en el cromosoma 20q13 en humanos, y es

expresada en diversos tejidos, incluido el cerebro, pulmón, bazo y colon. En más del 50% de los carcinomas de colon y de pulmón, el gen de DcR3 se amplifica, y estas células expresan altos niveles del mRNA de DcR3 (40).

### La activación de Fas

La unión de Fas-L a Fas, o entrecruzamiento de Fas con anticuerpos, inducen la apoptosis de las células vía Fas. Existen dos diferentes receptores TNF: TNFR1 y TNFR2. Aunque TNFR2 tiene mayor afinidad por TNF que TNFR1, la inducción de señales vía TNF (activación de la apoptosis, NF-kB, y AP1) son predominantemente mediadas por TNFR1. Fas y TNFR1 comparten una homología de dominio (alrededor de 80 aminoácidos) en su región citoplasmática (40). Análisis de mutaciones de Fas y TNFR1 indican que este dominio es necesario y es suficiente para traducir la señal de apoptosis (40). Por lo cual se le ha designado un dominio de muerte. DR-3 y RA-4 también se encuentran asociados a un dominio de muerte y puede traducir la señal de apoptosis en algunas circunstancias (40).

Tanto Fas como TNFR1 deben oligomerizarse para ser activado. El análisis por difracción de rayos X de la unión TNF-receptor de TNF, ha demostrado que el receptor de TNF es un trímero (40). Esto sugiere que TNF induce trimerización de su receptor. La similitud entre las estructuras de Fas-L y TNF y entre Fas y los receptores de TNF sugiere que también Fas-L induce la trimerización de Fas, y que la región citoplásmica trimerizada entonces traduce la señal. La apoptosis mediada por Fas no requiere de la síntesis de proteínas, e incluso las células sin núcleo pueden someterse a apoptosis por la activación de Fas. Entonces, los componentes necesarios para la traducción de la señal apoptótica ya se encuentran presentes en las células y Fas solo provoca la activación del mecanismo.

### *La activación de caspasas*

El análisis genético de la muerte celular programada ha puesto de manifiesto la participación de determinados productos genéticos en la apoptosis. Entre ellos, CED-3 (muerte de células anormales-3) y CED-4 se requieren para ejecutar el proceso. La clonación del gen CED-3 ha demostrado que está relacionada; con la enzima de conversión de interleucinas (ICE). ICE es una cisteína proteasa que consta de dos grandes (p17) y dos pequeñas (p10) subunidades, que son generados por la división proteolítica de un precursor mayor (40). Al menos 12 moléculas relacionadas con las ICE se han identificado en mamíferos, a las cuales se le ha llamado caspasas. Todas las caspasas se dividen en tres subgrupos sobre la base de su especificidad por el sustrato. En base a esta propiedad los péptidos inhibidores específicos de las caspasas deben de unirse al sitio activo de las caspasas. En adición estas proteínas inhibidoras, como son las IAP (inhibidora de la apoptosis) y CrmA (modificador de la respuesta de citocinas A), se unen a determinadas caspasas e inhiben su actividad de proteasa (40).

La adición de péptidos inhibidores de las caspasa a las células bloquea la apoptosis inducida por Fas, las células que expresan IAP, o CrmA son resistentes a la apoptosis inducida por Fas, lo que indica que caspasas son mediadores de inducción de la apoptosis por medio de Fas.

El modelo actual para la activación de las caspasas por activación con Fas (Figura 1) (41) es el siguiente: Cuando Fas esta activo, presenta una molécula adaptadora llamada FADD (Proteína asociada con Fas y el dominio de la muerte) o también conocida como MORT1 que contiene un dominio de la muerte (DED) en su región C terminal, que es usado por Fas y es el responsable de la transducción de señales hacia la pro-caspasa 8 a la cual se une. La pro-caspasa 8 lleva dos dominios DED/MORT1 en su región N terminal a través de la cual se une a FADD/MORT1 (41).

La trimerización de Fas inducido por la unión de Fas-L resulta en la formación del DISC (Complejo de señalización para la inducción de la muerte) y la activación de la caspasa 8 por oligomerización. La pre-caspasa 8 tiene una débil actividad de proteasa y es totalmente activada por auto corte cuando es oligomerizada. De esta manera se activa la caspasa 8, que a su vez activa a la caspasa 6, lo que sugiere una cascada de proteasas activada durante la apoptosis e inducida por Fas. La caspasa activada degrada muchas proteínas. Más de 60 sustratos de la caspasa han sido identificados, incluyendo proteínas estructurales del citoesqueleto, proteínas implicadas en el ciclo celular y la replicación (topoisomerasa y retinoblastoma) y factores de transcripción (42).

De este modo CD95 cumple un papel importante en la homeostasis del sistema inmune, erradicando a los linfocitos potencialmente autoreactivos y regula en forma negativa la respuesta inmune tras la eliminación de patógenos, por reducción del número de células T y B antígeno específicas estimuladas en los órganos linfáticos periféricos. Fas (CD95) junto con su ligando Fas-L (CD178) median la respuesta apoptótica e inflamatoria del sistema inmune.

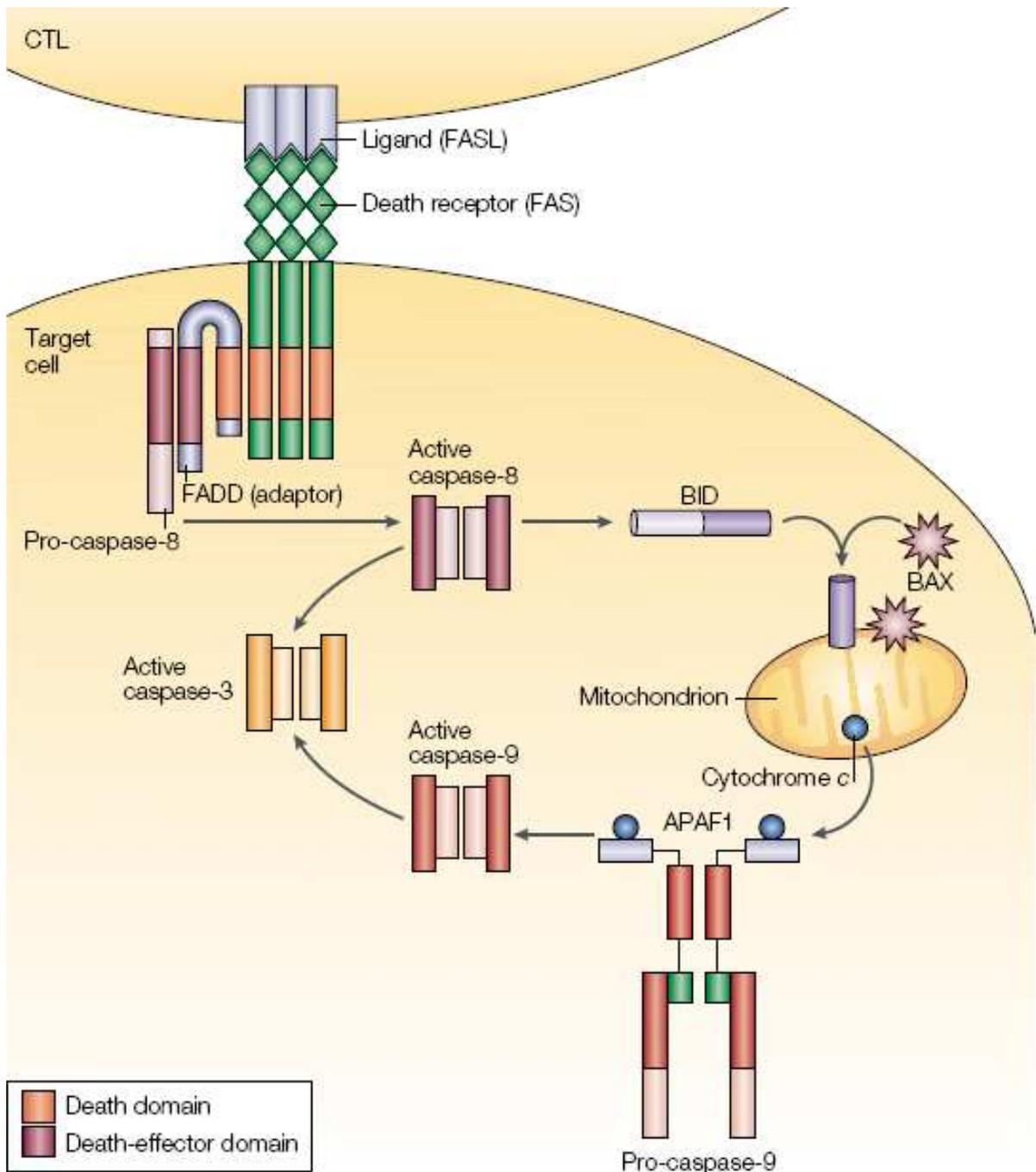


Figura.1. La estimulación del receptor Fas resulta en la activación de las caspasas, caspasa 8 a través de la interacción de Fas y la proteína del dominio de la muerte (FADD). Esto resulta en la activación de la caspasa 8. La caspasa 8 tiene diferentes efectos en diferentes células existiendo dos tipos. En las células del tipo I es capaz de activar a otros miembros de la familia de las caspasas (como la caspasa 3) directamente. Por lo contrario, en las células de tipo II, la activación de la caspasa 8 resulta en la activación del ensamblaje de BCL2 una molécula proapoptóticos miembro de la familia BID, y la translocaciones de BID y BAX en la mitocondria. Una vez insertado en la membrana mitocondrial, BID y BAX inducen la liberación de citocromo c mitocondrial, lo que resulta en la activación de la caspasa-9 a través de la interacción con la molécula apoptótica factor 1 activador de proteasas (APAF1). Entonces la caspasa 9 es capaz de activar a la caspasa 3 Nat. Rev. Immunol. 2006 .2.401-409.

## ***Justificación***

A nivel mundial la leucemia es el cáncer más frecuente en niños, siendo en México la Leucemia Linfoblástica Aguda la más frecuente con una incidencia de 44.9 casos por millón de niños, con una supervivencia aproximada del 50% a 5 años del diagnóstico. La LLA es una neoplasia hematológica que se origina de tan solo un progenitor de linfocitos T o B.

En condiciones normales la eliminación de linfocitos malignos se realiza por apoptosis y preferentemente esta se lleva a cabo por vía Fas/Fas-L, sin embargo en la actualidad no existen reportes en la literatura sobre el estado de esta vía en LLA que permita tener un acercamiento a la comprensión del comportamiento de estas dos moléculas en distintas etapas de la enfermedad.

## ***Objetivos***

### **Objetivo General**

Identificar el nivel de expresión de Fas y Fas-L en linfocitos de niños mexicanos con diferentes estadios de leucemia linfoblástica aguda (LLA).

### **Objetivos Particulares**

1. Identificar mediante citometría de flujo, la presencia de Fas y Fas-L en la población de LT CD8+ en sangre periférica y medula ósea en niños con diferentes estadios de LLA

## ***Hipótesis***

En la Leucemia Linfoblástica Aguda en niños mexicanos existe aumento de la expresión de Fas y Fas-L en algún momento de su evolución, tanto en MO como en SP, relacionada con el tratamiento.

## ***Material y Metodología***

En la muestra se incluyeron un total de 22 pacientes de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAЕ), del Servicio de Hematología Pediátrica del Centro Médico Nacional La Raza, I.M.S.S. con Leucemia Linfoblástica Aguda, menores de 16 años al diagnóstico, de ambos géneros y en las siguientes etapas de la enfermedad LLA: de Novo, Recaída y pacientes en Vigilancia con mínimo de tres años de remisión completa continua (Fig.6).

Dentro de la UMAЕ a los pacientes les fue practicado un aspirado de médula ósea y una muestra de sangre venosa periférica para los siguientes estudios: Biometría Hemática Completa, Química sanguínea con urea, creatinina y electrolitos séricos, policultivos y serología viral para hepatitis B, hepatitis C, Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH, Citomegalovirus CMV, Virus Ebstein-Barr EB y Toxoplasma. Todos los estudios anteriores se realizan rutinariamente a todos los pacientes como parte del protocolo de estudio para integrar el diagnóstico, ya sea de Novo, Recaída o de Remisión.

Para la cuantificación de Fas y Fas-L, la muestra se obtuvo en la misma toma que la de los estudios de rutina. El diagnóstico de LLA se estableció con un nivel de blastos de 25% o mayor, de acuerdo a los criterios de la FAB e inmunofenotipo en el aspirado de médula ósea.

En la muestra de MO, como en la de SP, se midió la expresión de Fas y Fas-L por medio de citometría de flujo; las tinciones se realizaron en el laboratorio de inmunología de la Unidad de Morfología y Función en Facultad de Estudios Superiores Iztacala, U.N.A.M. y las lecturas en el Laboratorio de citometría de flujo de los Laboratorios Centrales en el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN.

	DIAGNÓSTICO RECIENTE		RECAÍDA		VIGILANCIA	
<b>MEDIANA DE EDAD EN AÑOS</b> Al diagnóstico	8,5 ± 3		7 ± 2.5		7,2 ± 2.5	
<b>TOTAL</b>	11		4		7	
	N	%	N	%	N	%
<b>GÉNERO</b>						
Masculino	10	90.9	2	50	5	71.42
Femenino	1	9.09	2	50	2	28.57
<b>DIAGNÓSTICO FAB</b>						
L1	11	100	4	100	6	85.71
L2	0	0	0	0	1	14.28
<b>DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO</b>						
Células B	11	100	4	100	7	100
Células T	0	0	0	0	0	0
<b>RIESGO AL DIAGNÓSTICO</b>						
Alto	5	45.45	2	50	2	28.57
Estándar	6	54.54	2	50	5	71.42
<b>BIOMETRÍA HEMÁTICA</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min-Max</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min-Max</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min-Max</b>
Hemoglobina gr/dl	8.7	3.6-14.4	11,45	8.6-14.2	14	12.7-15.4
Hematocrito %	38.35	11.5-31.3	33.32	23.7-42.2	41	36.2-44.1
Leucocitos/μl	33352.9	1080-429720	58017.5	7110-195300	6101.4	2900-8200
Neutrófilos/ μl	5371	40-21480	6225	3610-11718	3132	1102-4740
Blastos/μl	76641.5	0-365200	42979.5	0-167958	0	0-0
Plaquetas/ μl	133875	20000-359000	127500	49000-213000	23000	70000-276000

Tabla 6. Características generales de los pacientes.

## Criterios de inclusión

### Diagnóstico reciente (Novo)

El diagnóstico de LLA T o B se estableció con blastos del 25% o mayor, morfología linfoide de acuerdo con los criterios de la FAB e inmunofenotipo en el aspirado de médula ósea

### Recaída

Cuando el paciente presenta nuevamente datos clínicos de leucemia, o en la biometría hemática citopenias y/o blastos y se corroboran en aspirado de médula ósea cuando hay mas de 5% de blastos, o en algún sitio extramedular.

## Remisión completa (vigilancia)

Ausencia de datos clínicos de leucemia, restauración de la hematopoyesis en la médula ósea con menos de 5% de blastos y biometría hemática con hemoglobina mayor de 10gr/dL (sin transfusión), neutrófilos totales  $\geq 1500/\text{mCL}$  y plaquetas  $\geq 100,000/\text{mCL}$ .

## Tinciones

Para realizar la tinción en la muestra de MO tanto como de SP es importante revisar que no este coagulada ni tenga fibrina.

- 1) Colocar 25  $\mu\text{L}$  de la muestra (MO o SP) en cada un de los 4 tubos FACS a utilizar.
- 2) Se realizan los marcajes con los anticuerpos correspondientes:

Tubo 1	Blanco
Tubo 2	Isotipo (SC-3738 Lot HQ007)
Tubo 3	CD 3 (EXBIO PC-202-T100 Lot 12-2009), CD 8 (BD 347313 Lot 19203) y Fas (SC-3738 Lot E2306)
Tubo 4	CD 3 (EXBIO PC-202-T100 Lot 12-2009), CD 8 (BD 347313 Lot 19203) y Fas-L (SC-56101 Lot A3107)

- 3) Se incubó los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 4) Se realizó un lavado agregando 500  $\mu\text{L}$  de PBS (4°C) resuspendiendo y centrifugando a 2000 rpm.
- 5) Se eliminó el sobrenadante y agregó 100  $\mu\text{L}$  de Buffer de Lisis (sc 3621 Lot #F2102).
- 6) Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- 7) Se realizó un segundo lavado agregando 500  $\mu\text{L}$  de PBS (4°C) resuspendiendo y centrifugando a 2000 rpm.
- 8) Se eliminó el sobrenadante y agregó 50  $\mu\text{L}$  de Buffer de Fijación (SC 3622 Lot #F2102)
- 9) Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

- 10) Se realizó un tercer lavado agregando 500  $\mu$ L de PBS (4°C) resuspendiendo y centrifugando a 2000 rpm.
- 11) Se eliminó el sobrenadante y agregó 200  $\mu$ L de Buffer de Lavado (SC 3624 Lot #F2102).

La lectura de las muestras se llevó a cabo en un citómetro FACS Calibur BD de cuatro canales, midiendo 20,000 eventos. Los datos fueron analizados con el Software de la empresa DAKO MoFlo and CyAn ADP Versión 4.3 en el cual con ayuda de los isotipos y el blanco, se seleccionó una región en un *Dot plot* FSC vs. CD3 seleccionando la región que correspondía a los eventos negativos, entonces en los tubos 3 y 4 con ayuda de esta región se seleccionaron todos los eventos CD3 positivos, posteriormente en un segundo *Dot plot* se pudieron seleccionar las regiones positivas para CD8 vs. Fas o Fas-L correspondientes, obteniendo así el número y porcentaje de células, además de la Intensidad Media de Fluorescencia (MIF).

## **Conclusiones**

- En niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en los estadios de diagnóstico de NOVO, RECAÍDA y VIGILANCIA la intensidad de fluorescencia y el número de células que expresan Fas y Fas-L, no depende del ambiente tisular ya sea este MO o SP.
- En los niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en el estadio de NOVO, existe una alteración que provoca que el número de células que expresan Fas-L y su intensidad de fluorescencia no se eleven, en comparación con un grupo en el cual no existe actividad de la enfermedad (VIGILANCIA) como se esperaría ante el daño celular y fragmentación del ADN en una neoplasia como la leucemia, de tal forma que esta alteración podría estar relacionada con el desarrollo u origen de la enfermedad, sin que esta signifique que sea el único factor relacionado con el cáncer.
- En niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en la fase de NOVO el número de células que expresan Fas y su intensidad de fluorescencia se ven elevadas en comparación con un grupo en el cual no se encuentra activa la enfermedad (VIGILANCIA), como se esperaría ante el daño celular y fragmentación del ADN en una neoplasia como la leucemia, lo que indica que esta molécula no se encuentra relacionado con el origen y desarrollo de la enfermedad.

## ***Perspectivas***

- El comportamiento heterogéneo del grupo de RECAÍDA puede ser atribuido al tamaño de la muestra en ese grupo, por lo cual se recomienda el aumento de la  $n$  en esta muestra para posteriores investigaciones.
- Con respecto a la correlación 2:1 de las moléculas Fas-L: Fas se recomienda aumentar el tamaño de la muestra en los tres grupos, además de agregar un grupo más con una población sana para próximas investigaciones.

## **Literatura citada**

1. Teitell A, Pandolfi P. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4:175–98. 2009.
2. Rizo P, Sánchez F, González A, Betancourt M, Meneses A, Mohar A, Kuri P. Mortalidad por leucemias en menores de 20 años. México 1998–2002. *medigraphic Artemeni.* Vol. 62, enero-febrero 2005.
3. Glazer ER, Perkins CI, Young JL Jr, Schlag RD, Campleman SL, Wright WE: Cancer among Hispanic children in California, 1988–1994: comparison with non-Hispanic white children. *Cancer* 1999, 86:1070-1079.
4. Waxman S , and Anderson KC (2001) History of the Development of Arsenic Derivatives in Cancer Therapy. *The Oncologist* 6:3-10.
5. Monge P, Wesseling C, Rodriguez AC, Cantor KP, Weiderpass E, Reutfors J, Ahlbom A, Partanen T: Childhood leukaemia in Costa Rica, 1981–96. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002, 16:210-218.
6. Mejía J, Bonilla M, Lorenzana R, Juárez S, Reyes G, María, Pérez M, González G. A. Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: Population-based data.
7. Greaves M (2000) *Cancer: The Evolutionary Legacy.* Oxford: Oxford University Press
8. Virchow R. Cellular Pathology: Lecture VIII. Blood and Lymph. *CA Cancer J Clin* 1975;25;93-97. 2008.
9. Beutler E. The treatment of acute leukemia: past, present, and future. *Leukemia* 15, 658–661. 2001.
10. Beutler E, Et al. *Williams Hematology.* Mc Graw Hill, U.S.A. 2001.
11. Greer. P. J ., Et al, *Wintrobe's Clinical Hematology,* Editorial Lippincott Williams y Wilkins Philadelphia U.S.A. 2003.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103 (4): 620-5, 1985.
13. Lee N, Jaffe E, Diebold J, Flandrin G, Et al. *The World Health Organization Classification of Hematological Malignancies Report of the*

- Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol.* 13(2):193–207. 2000.
14. Song J Et al. identification of gene expression signatures for molecular classification in human leukemia cells. *International Journal of oncology.* 29: 57-64, 2006 57.
  15. Ottensmeier C. The classification of lymphomas and leukemias. *Chemico-Biological Interactions* 135–136 (2001) 653–664. 2001.
  16. William L, Bhojwani D, Dong-Joon M, Raetz E, Relling M. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology.* 102-131. 2003.
  17. Basso G, Case C, Campo M. Diagnosis and genetic subtypes of leukemia combining gene expression and flow cytometry. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 39 164–168. 2007.
  18. Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 5 223–234. 2005.
  19. Han Song J, Hyeoung K, Hyun Lee C, Jun Kim S. Identification of gene expression signatures for molecular classification in human leukemia cells. *International Journal of Oncology* 29: 57-64, 2006.
  20. McKenna W. Multifaceted Approach to the Diagnosis and Classification of Acute Leukemias. *Clinical Chemistry* 46:8(B) 1252–1259. 2000.
  21. Kaleem Z, Crawford E, Hanif M, Jasper L, Covinsky M. Flow Cytometric Analysis of Acute Leukemias Diagnostic Utility and Critical Analysis of Data. *Arch Pathol Lab Med—Vol.* 127, January 2003.
  22. Fiona E. Craig A, Kenneth A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111: 3941-3967. 2008.
  23. Aifantis L, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T cell leukaemia and lymphoma. *Nature Reviews Immunology.* 10.1038. 2008.
  24. Malumbres M, Barbacid M. To Cycle or not to Cycle: A Critical Decision in Cancer. *Nature Reviews* vol. 1 222- 231. 2001.
  25. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development.* 17:60–65. 2007.
  26. Johnson D, Walker C. Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:295–312. 1999.

27. King K, Cidlowski J. Cell Cycle Regulation and Apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:601–17. 1998.
28. Strasser A, O'Connor L, Vishva M. Apoptosis Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69:217–45 2000.
29. Debra T. Chao J. Stanley J. BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annual Review of Immunology Vol. 16:* 395-419. 1998.
30. Rudin C, Thompson B, APOPTOSIS AND DISEASE: Regulation and Clinical Relevance of Programmed Cell Death *Annual Review of Medicine.* Vol. 48: 267-281. 1999.
31. Blom B, Spits H. Development of Human Lymphoid Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24:287–320, 2006.
32. Khanna C, Helman J. Molecular Approaches in Pediatric Oncology *Annual Review of Medicine Vol. 57:* 83-97 2006.
33. Kaufmann H, Gores G. Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays* 22:1007-1017. 2000.
34. Kinashi T. Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews immunology.* Vol. 5 546-559. 2005.
35. Russell J, Ley T. Lymphocyte Mediated Cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20:323–70. 2002.
36. Barry M, Bleackley R. Cytotoxic T lymphocytes all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology.* Vol. 2 401-409. 2002.
37. Vanessa S. Strasser A. CONTROL OF APOPTOSIS IN THE IMMUNE
38. SYSTEM: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu. Rev. Immunol.* 21:71–105. 2003.
39. Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis *Leukemia* 18, 1176–1199. 2004.
40. Shigekazu Nagata Fas Ligand-Induced Apoptosis *Annu. Rev. Genet.* 1999. 33:29–55. 1999.
41. Barry M, Bleackley C. Cytotoxic T lymphocytes all roads lead To Death. *Nature Reviews Immunology vol. 2* 401. 2002.
42. Budihardjo I, Holt O, Lutter H, Xu Luo, Biochemical Pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999. 15:269–90. 1999.

43. Bidere N, Su C, Genetic Disorders of Programmed Cell Death in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* 24:321-352. 2006.
44. Jabłońska E, Kiersnowska-Rogowska B, Rogowski F, Parfieńczyk A, Puzewska W, Bukin M. Soluble form of TRAIL, Fas and FasL in the serum of patients with B-CLL. *Rocz Akad Med Białymst.* 50:204-7. 2005.
45. Müschen M, Warskulat U, Beckmann MW. Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med.* 78(6):312-25. 2000.
46. S Tamiya, K Etoh, H Suzushima, K Takatsuki, M Matsuoka. Mutation of CD95 (Fas/Apo-1) gene in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 91: 3935-42. 1998.