



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

REVISIÓN BIBLIO-HEMEROGRÁFICA-ELECTRÓNICA DEL
IMPACTO DE LA TIMIDINA KINASA Y SUS APLICACIONES
EN LA MEDICINA CLÍNICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

GRECIA PATRICIA CRUZ LÓPEZ

ASESOR: DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

ASESOR: DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ



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.



ÍNDICE

Índice de Figuras	4
Índice de Cuadros.....	5
ABREVIATURAS	6
RESÚMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	11
GENERAL:	11
PARTICULARES:.....	11
ANTECEDENTES.....	12
TIMIDINA KINASA	12
Historia.....	12
Definición.....	12
Bioquímica	13
TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE TIMIDINA KINASA	15
INMUNOENSAYOS	15
Inmunoensayo competitivo	15
LIAISON [®] Thymidine Kinase (310960).....	16
Finalidad.....	16
Fundamento.....	16
Material	17
Integrador de reactivos	17
Obtención y preparación de muestras	18
Preparación del integrador de reactivos	18
Calibración	18
PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	19
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	20
VALORES ESPERADOS.....	20
CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	21
Sensibilidad analítica	21
Sensibilidad funcional.....	21
Precisión.....	22
TIMIDINA KINASA EN SUERO.....	22



TIMIDINA KINASA EN TEJIDO	22
RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE TIMIDINA KINASA EN DIFERENTES INVESTIGACIONES:	23
TIMIDINA KINASA EN LEUCEMIAS	24
Leucemias mieloides agudas.	24
Clasificación:.....	25
Leucemias linfoides agudas.	25
Clasificación:.....	25
Leucemia mieloides crónica.	26
Leucemia linfática crónica.	26
TIMIDINA KINASA EN LINFOMA NO HODGKIN	38
TIMIDINA KINASA EN TUMORES SÓLIDOS	51
CÁNCER DE TIROIDES	51
CÁNCER DE MAMA	56
CÁNCER DE PULMÓN	62
CÁNCER DE OVARIO.....	66
TIMIDINA KINASA Y LOS MEDICAMENTOS.....	71
GANCICLOVIR	71
TERAPIA GÉNICA.....	72
Estrategias en terapia génica del cáncer	73
VIRUS HERPES SIMPLE.....	75
HSV-TK/GCV en Leucemias.....	77
HSV-TK/GCV en cáncer de pulmón.....	79
TIMIDINA KINASA EN EXPERIMENTOS	83
CONCLUSIONES	89
GLOSARIO.....	92
REFERENCIAS.....	97
Páginas Electrónicas.....	102
Referencias de figuras.....	105
Referencias de cuadros.....	106



Índice de Figuras

Figura 1.....	12
Figura 2.....	14
Figura 3.....	15
Figura 4.....	24
Figura 5.....	25
Figura 6.....	26
Figura 7.....	27
Figura 8.....	28
Figura 9.....	29
Figura 10.....	29
Figura 11.....	30
Figura 12.....	31
Figura 13.....	39
Figura 14.....	41
Figura 15.....	42
Figura 16.....	45
Figura 17.....	46
Figura 18.....	48
Figura 19.....	49
Figura 20.....	49
Figura 21.....	53
Figura 22.....	54
Figura 23.....	54
Figura 24.....	63
Figura 25.....	64
Figura 26.....	67
Figura 27.....	69
Figura 28.....	72
Figura 29.....	76
Figura 30.....	80
Figura 31.....	81
Figura 32.....	84
Figura 33.....	85
Figura 34.....	85



Índice de Cuadros

Cuadro 1.....	17
Cuadro 2.....	20
Cuadro 3.....	21
Cuadro 4.....	33
Cuadro 5.....	34
Cuadro 6.....	36
Cuadro 7.....	37
Cuadro 8.....	42
Cuadro 9.....	44
Cuadro 10.....	47
Cuadro 11.....	58
Cuadro 12.....	59
Cuadro 13.....	60
Cuadro 14.....	61
Cuadro 15.....	78
Cuadro 16.....	87



ABREVIATURAS

5-FU:	5-fluorouracilo
aGTP:	Trifosfato de desoxiguanosina
Anti- VLB:	Anticuerpo contra leucosis bovina
ASB:	Albumina sérica bovina
ATP:	Trifosfato de Adenosina
AZT:	3´Azido- 3´ desoxitimidina
AZTMP:	3´Azido- 3´ desoxitimidina monofosfato
B₂M:	β- 2 microglobulina
B-CLL:	Leucemia linfocítica crónica de células B
CgA:	Cromogranina A
CCP:	Carcinoma de células pequeñas de pulmón
CNCP:	Carcinoma de células no pequeñas de pulmón
CMV:	Citomegalovirus
CR:	Respuesta completa
CP:	Cáncer de pulmón
CTP:	Trifosfato de citidina
dCK:	Desoxicitidina Kinasa
DF3/MUC1:	Antígeno para cáncer de mama
DHL:	linfoma difuso histiocítico.
Dli:	Linfoma difuso intermedio
DPDL:	Linfoma difuso linfocítico pobremente diferenciado
dTMP:	Desoxitimidina monofosfato
DWDL:	Linfoma difuso linfocítico bien diferenciado
EIA:	Enzimoimmunoanálisis
FW:	Sedimento globular
GCV:	Ganciclovir
GRP:	Péptido liberador de gastrina.



HCL:	Leucemia de células pilosas
HSV-1, 2:	Herpes virus tipo 1 y 2
LLA:	Leucemia linfocítica aguda
LLC:	Leucemia linfocítica crónica
LMA:	Leucemia mieloide aguda
LMC:	Leucemia mieloide crónica
LNH:	Linfoma no Hodgkin
MCL:	Linfoma de células de manto
MGUS:	Gammopatía monoclonal de importancia indeterminada
MTC:	Carcinoma medular tiroideo
NDPL:	Linfoma nodular linfocítico pobremente diferenciado
NH:	Linfoma histiocítico
NM:	Linfoma mixto (linfocítico- histiocítico)
NSE:	Enolasa neuronal específica
OMS:	Organización mundial de la salud
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PR:	Respuesta parcial
ProGRP:	Pro-péptido liberador de gastrina
PTC:	Carcinoma papilar tiroideo
PTLP:	Enfermedad linfoproliferativa
TDH:	Desoxitimidina
TK:	Timidina Kinasa
TS:	Timidilato sintasa
VEB:	Virus Epstein Barr
VPPA:	Virus de la peste porcina africana
VSG:	Velocidad de sedimentación globular
WBC:	Recuento de glóbulos blancos



RESÚMEN

El presente trabajo de tesis es una recopilación de la información más sobresaliente de la actividad de la Timidina Kinasa así como sus aplicaciones en la medicina y en la clínica. Timidina Kinasa es una fosfotransferasa que cataliza la reacción de la desoxitimidina y debido a su intervención en el ciclo celular y síntesis de ADN es muy importante ya que es considerada un marcador de proliferación celular, el cual se puede medir su actividad a través de un kit comercial llamado LIAISON[®] Thymidine Kinase (310960) y utilizando la técnica de inmunoensayo competitivo se puede saber la actividad de dicha enzima.

Timidina Kinasa se encuentra presente en suero o plasma debido a la proliferación descontrolada de las células tumorales, por lo que numerosos estudios han reportado los diferentes niveles de Timidina Kinasa en el cáncer. La tesis involucra principalmente las leucemias, ya sean linfocíticas o mielocíticas, linfoma no Hodgkin y cánceres sólidos como son; cáncer de tiroides, de mama, de pulmón y de ovario.

Diferentes estudios no solo involucran a Timidina Kinasa como marcador tumoral, sino también como un apoyo en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Timidina Kinasa es utilizada en la terapia génica y en diversas estrategias para combatir el cáncer, así como leucemias y cáncer de pulmón entre otros. En cuanto a los trabajos experimentales con la enzima Timidina Kinasa, se reportan estudios genéticos y se observan los cambios físicos que sufren los animales de experimentación, también se utilizó para la identificación de leucosis bovina entre otros estudios.

Básicamente la utilización de la enzima Timidina Kinasa es para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diferentes neoplasias sin embargo también es parte de la estrategia para combatir estas enfermedades. La recopilación de información de esta enzima proporcionara información relevante que apoye no solo en el diagnóstico de cáncer, sino que también aportara nuevos conocimientos para seguir estudiando esta enzima y encontrar nuevas aplicaciones que apoyen en las necesidades de las personas. El principal objetivo es dar a conocer la importancia de la enzima Timidina Kinasa y de esta manera hacer su presencia más comercial en los estudios clínicos para que se puedan prevenir o en tal caso dar una mejor calidad de vida.



INTRODUCCIÓN

Cáncer es un término que se utiliza para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. La pérdida, mutación o alteración de genes que codifican moléculas involucradas en la regulación del crecimiento y diferenciación es el hecho inicial que determina el desarrollo de una gran parte de las neoplasias. El cáncer tiene un comportamiento distinto en cada persona, que depende del órgano afectado y de la etapa que haya sido diagnosticado. Hay más de 100 diferentes tipos de cáncer. La mayoría de los cánceres toman el nombre del órgano o de las células en donde empiezan y según el tipo de cáncer es la edad de presentación.⁸¹

En México el cáncer en niños es un problema de salud pública y representa para ellos entre la segunda y cuarta causa de muerte.⁵³ El comportamiento en la mortalidad infantil se ha considerado un indicador predilecto para valorar el estado de salud de una comunidad. La mortalidad causada por las principales neoplasias malignas en algunos países desarrollados ha demostrado a través de los años una reducción en la prevalencia. Sin embargo en los países menos desarrollados el perfil de mortalidad por neoplasias malignas presenta un patrón ascendente.⁵⁵

En México, en el año de 1990 la mortalidad por cáncer en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ocupó el décimo lugar en el grupo de menores de un año, el quinto en el de 1 a 4 años y el primero en el de 5 a 14 años.¹⁹

Las leucemias agudas (LA) son cánceres del sistema hematopoyético que involucran en la mayoría de los casos una transformación maligna de las células progenitoras linfoides y mieloides y presentan el tipo de cáncer más frecuente en la infancia.¹⁸

Las leucemias, en general, son más frecuentes en hombres (56%) que en mujeres. La incidencia varía de acuerdo a la edad y tipo de leucemia. En USA, las leucemias representan 25% de todos los cánceres que se presentan en menores de 20 años en el período 1997-2002, siendo la Leucemia Linfática Aguda la más frecuente en este grupo de edad. En cambio en los adultos, especialmente en los mayores de 50 años, las más



frecuentes son la Leucemia Linfática Crónica y Leucemia Mieloide Aguda. La incidencia de Leucemia Mieloide Crónica aumenta discretamente en mayores de 40 años.⁹⁷

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una enfermedad heterogénea en cuanto a su pronóstico y evolución clínica. Hay dos sistemas que clasifican a la leucemia y basándose en ello se toma una decisión para el tratamiento. Pacientes con principios de LLC es decir etapa Binet A o Rai 0 por lo general no reciben tratamiento hasta su progresión. Sin embargo aproximadamente del 30 al 40% de los pacientes con este tipo de leucemia muestran una corta supervivencia libre de progresión y un tratamiento precoz los beneficiaría. Desafortunadamente los sistemas de clasificación actual no son capaces de identificar los primeros casos de leucemia linfocítica crónica de alto riesgo en progresión.³³

La enzima Timidina Kinasa (TK) es una fosfotransferasa que convierte la desoxitimidina (THD) a desoxitimidina monofosfato (dTMP). Se puede encontrar en la mayoría de las células vivas de los mamíferos y de algunos virus que contienen la información genética para expresar a la Timidina Kinasa viral. La Timidina Kinasa tiene una función primordial en la síntesis de ADN y por lo tanto también en la división celular, ya que es una reacción en cadena única para introducir desoxitimidina en el ADN además de que es considerada un marcador de proliferación celular.⁵²

Timidina Kinasa es una enzima que contribuye a la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) por la incorporación de timina. Se toma como base la proliferación generalizada de la actividad celular al observar un aumento significativo en los niveles de Timidina Kinasa en suero.

La aplicación más importante para el ensayo de la Timidina Kinasa en suero es en el diagnóstico de linfoma no Hodgkin y la leucemia linfocítica crónica. La medición de los niveles de la Timidina Kinasa es un indicador temprano en la recurrencia de enfermedades, lo que permite un tratamiento oportuno. La Timidina Kinasa en suero es un marcador muy específico en una enfermedad maligna, ya que solo un número limitado de enfermedades virales, anemia perniciosa y ciertos medicamentos que interfieren en el metabolismo de la Timidina pueden elevarla.²⁷



OBJETIVOS

GENERAL:

Recopilar información relacionada con la enzima Timidina Kinasa en la medicina clínica como marcador bioquímico por medio de una revisión biblio-hemerográfica-electrónica con el propósito de su utilización en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades hematológicas.

PARTICULARES:

- Ⓢ Revisar la importancia de la enzima Timidina Kinasa en pacientes con leucemias como marcador bioquímico específico para el apoyo en el diagnóstico, tratamiento y el pronóstico de la enfermedad.
- Ⓢ Recopilar información de la función de la Timidina Kinasa en el linfoma no Hodgkin
- Ⓢ Investigar el efecto de la enzima Timidina Kinasa en pacientes con tumores sólidos.
- Ⓢ Describir el método de determinación de la actividad la Timidina Kinasa, así como su fundamento y sus niveles normales en suero y en tejidos.
- Ⓢ Mencionar la función de la Timidina Kinasa en procedimientos diagnósticos, en métodos terapéuticos y en el establecimiento del pronóstico contra el cáncer.
- Ⓢ Seleccionar la información más relevante sobre el uso de Timidina Kinasa en experimentos científicos.



ANTECEDENTES

TIMIDINA KINASA

Historia

En el año de 1951 se demostró la incorporación de la desoxitimidina en el DNA, pero fue hasta 1956 que se descubrió su fosforilación antes de incorporarse al DNA. La reacción es catalizada por la enzima Timidina Kinasa descubierta entre 1958-60 cuando fue aislada y parcialmente purificada.²⁵

Durante los años sesenta se demostró que la Timidina Kinasa provenía de las procariotas y de diferentes especies de eucariotas, además ciertos virus codifican sus propias isoenzimas de TK. En 1967 se localizó el primer gen autosómico de la enzima Timidina Kinasa en el cromosoma 17.²¹

Definición

Timidina Kinasa es una fosfotransferasa que convierte la desoxitimidina (THD) a desoxitimidina monofosfato (dTMP). Se puede encontrar en la mayoría de las células vivas de los mamíferos y de algunos virus que contienen la información genética para expresar a la Timidina Kinasa viral.⁷³

La Timidina Kinasa cataliza la siguiente reacción:

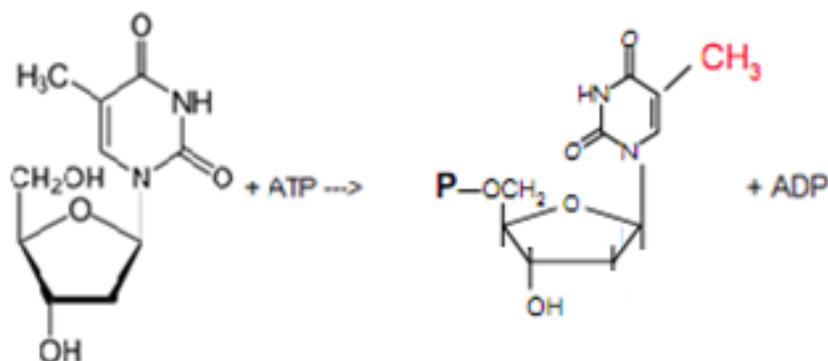


Figura 1: Desoxitimidina + ATP → dTMP + ADP



La Timidina Kinasa tiene una función primordial en la síntesis de ADN y por lo tanto también en la división celular, ya que es una reacción en cadena única para introducir desoxitimidina en el ADN además de que es considerada un marcador de proliferación celular.¹³

Bioquímica

La enzima Timidina Kinasa se encuentra presente en tejido y fluidos biológicos en bajas cantidades. Timidina Kinasa también contiene isoenzimas TKI citoplasmática, TKII mitocondrial y TK viral pero desde el punto de vista de la química clínica la isoenzima más importante es la TKI citoplasmática.⁶⁹

Primeramente se demostró que la TKI se encontraba presente en el citoplasma en previsión de la división celular, mientras que la TKII se encontró en las mitocondrias. Los genes de ambas isoenzimas fueron localizadas en la década de 1970.

La determinación de TKI en el tejido tumoral indica la tasa de crecimiento de las células tumorales, lo que puede reflejar un pronóstico tratándose de neoplasias hematológicas, tumores cerebrales, cáncer colorectal y cáncer de mama.

La TKI humana se compone de 234 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25.5 kDa por monómero. La actividad de TKI fluctúa con la síntesis de ADN celular, alta actividad en la proliferación de células malignas y baja actividad o nula en células en reposo. Muchas investigaciones han relacionado el crecimiento celular característico con la fluctuación de TKI en la regulación de la expresión específica en la fase S.³

Los niveles de TKI son bajos cuando no hay proliferación de células, sin embargo aumenta dramáticamente en la fase G1 a finales de la fase tardía S y a principios de la fase G2 del ciclo celular en células proliferantes y células tumorales.⁴³

La determinación de TKI en suero es un buen indicador de pronóstico, en el efecto de la terapia y la recurrencia de enfermedades hematológicas, sobre todo en las leucemias y en el linfoma no-Hodgkin. También se ha sugerido como un indicador en la diseminación de



cáncer de próstata²⁶. En pacientes con tumores malignos más del 95% de TKI en suero proviene de células malignas.⁶

El mecanismo por el cual la TKI entra a torrente sanguíneo no se conoce completamente, sin embargo la evidencia experimental en la detección de niveles elevados de TKI en suero llega a ser un medio sencillo y eficaz de detección y seguimiento de enfermedades malignas. El nivel de TKI en suero de pacientes con diversos tipos de cáncer ha demostrado la correlación con el estadio de la enfermedad y las repetidas recaídas y remisiones.⁴⁹

El gen de la isoenzima Timidina Kinasa TKII se encuentra en el cromosoma 16 pero no se ha clonado por el momento. La información sobre esta enzima es limitada, en tanto la localización celular y la presencia exclusiva en mitocondrias no se aclaran por completo. La actividad de TKII es baja tanto en la división como en el reposo de las células.¹¹

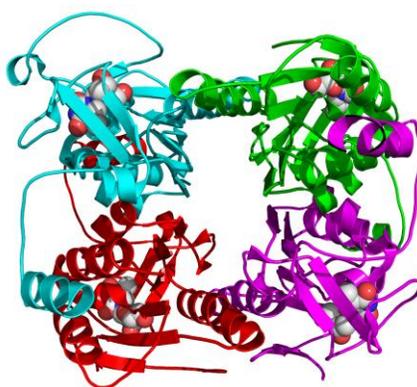


Figura 2: Estructura cristalina de un tetrámero de la Timidina Kinasa



TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE TIMIDINA KINASA

Para comprender un poco más a profundidad la actividad de la enzima Timidina Kinasa se ha descrito una técnica Inmunoenzimática utilizada en los laboratorios de investigación y de alta especialidad, la determinación cuantitativa de la TK a partir del suero o plasma humano. Tener la metodología disponible ha permitido conocer el significado e importancia clínica de la actividad enzimática de la TK.

INMUNOENSAYOS

El Inmunoensayo es una técnica que se basa en la reacción de antígeno- anticuerpo, su gran sensibilidad y especificidad permite la cuantificación de compuestos presentes en líquidos orgánicos en concentraciones reducidas.

Los inmunoensayos utilizan un anticuerpo selecto o más para detectar analitos de interés, los analitos que se miden pueden ser aquellos que están presentes en el cuerpo naturalmente (como por ejemplo una hormona tiroidea), aquellos que el cuerpo produce pero no están típicamente presentes (como por ejemplo un antígeno de cáncer), o aquellos que naturalmente no existen en el cuerpo (como por ejemplo una droga de abuso).⁹¹

Inmunoensayo competitivo

El antígeno de la muestra y el antígeno marcado (Ag^*) se ponen en contacto con un anticuerpo específico en concentración limitante, compitiendo por los sitios de unión del Ac. Cuanto más Ag halla en la muestra, menos Ag^* se unirá al Ac, por lo que la medida de la marca de fracción ligada es inversamente proporcional a la concentración del analito.¹

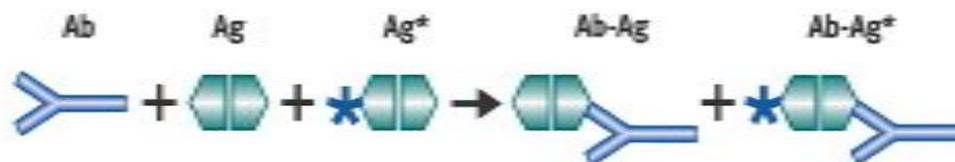


Figura 3: Inmunoensayo competitivo



LIAISON[®] Thymidine Kinase (310960)

Finalidad

El LIAISON[®] Thymidine Kinase de DiaSorin⁴¹ es un inmunoensayo cuantitativo para la determinación *in vitro* de la actividad de la Timidinquinasa (TK) en suero o plasma humano. La determinación de la actividad de la timidinquinasa en suero es útil para el pronóstico y la monitorización de pacientes con malignidades hematológicas.

Los resultados del ensayo deben utilizarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar en el diagnóstico y tratamiento de estados que denoten malignidades hematológicas. El LIAISON[®] Thymidine Kinase está diseñado para efectuar el ensayo en el LIAISON[®] Analyzer totalmente automatizado.

Fundamento

El ensayo LIAISON[®] Thymidine Kinase es un inmunoensayo indirecto modificado de quimioluminiscencia en dos pasos, cuya finalidad es la determinación cuantitativa de la TK en suero y plasma humano.

El ensayo utiliza una reacción enzimática inicial en la que la TK de la muestra convierte el AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina) en AZTMP (monofosfato 3'-azido-3'-desoxitimidina), tras lo cual se realizó un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa del AZTMP. La cantidad de AZT convertida en AZTMP es una medida de la cantidad de TK presente en la muestra.

En el ensayo, 50 µl de la muestra se incuba con 100 µl de amortiguador de ensayo 1, 20 µl de tampón de ensayo 2 y 20 µl de partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos policlonales anti-AZTMP. La fase sólida se reviste con IgG de conejo anticabra y después con anticuerpos policlonales anti-AZTMP de cabra. La mezcla se incuba durante 40 minutos y después se le agrega 100 µl de trazador, un análogo del AZTMP conjugado con un derivado de isoluminol.



Durante la primera incubación, el AZTMP se une a la fase sólida. En la segunda incubación, el trazador conjugado compite por unirse con el AZTMP en la solución. Tras una incubación de 20 minutos, el material libre se elimina con un ciclo de lavado.

A continuación se agregan los reactivos iniciadores y tiene lugar una reacción quimiluminiscente rápida. La señal luminosa se mide en unidades lumínicas relativas con un fotomultiplicador y es proporcional a la concentración de TK presente en los calibradores, controles o muestras.

Material

Integrador de reactivos

Cuadro 1: Material suministrado y modo de preparación de los calibradores

Partículas magnéticas (2,4 ml)	Partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos de conejo y cabra, amortiguador, ASB al 0,1 %, NaN_3 al 0,09 %, pH 7,4.
Conjugado (12 ml)	Derivado de isoluminol en tampón, ASB al 0,2 %, NaN_3 al 0,09 %, pH 7,4.
Amortiguador de ensayo 1 (12 ml)	Amortiguador, pH 7,4 con cofactores e IgG de conejo y cabra
Amortiguador de ensayo 2 (2,5 ml)	Tampón, pH 4,5
Número de ensayos	100

Calibrador 1 (liofilizado)	Suero humano, NaN_3 al 0,09 % y TK. Reconstituya con 1 ml de agua destilada o desmineralizada. Divida en partes y guarde el calibrador reconstituido a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.
Calibrador 2 (liofilizado)	Suero humano, NaN_3 al 0,09 % y TK. Reconstituya con 1 ml de agua destilada o desmineralizada. Divida en partes y guarde el calibrador reconstituido a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.



Obtención y preparación de muestras

Debe utilizarse suero o plasma humano. Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible. La sangre debe extraerse asépticamente por punción venosa y dejarse coagular; el suero ha de separarse del coágulo lo antes posible.

Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservadores. Las muestras que presentan partículas, turbidez, lipemia o detritus de eritrocitos pueden necesitar clarificación por filtración o centrifugación antes de la prueba.

No deben analizarse las muestras hemolizadas o lipémicas ni las que contengan partículas o presenten una evidente contaminación microbiana. El volumen mínimo requerido es de 200 μ l.

Preparación del integrador de reactivos

Antes de quitar el sello, es fundamental agitar suavemente y con cuidado el integrador de reactivos en sentido horizontal (sin formar espuma). Quite el sello y gire la rueda pequeña del compartimiento de partículas magnéticas hasta que la suspensión adopte un color marrón. Este procedimiento inicia la suspensión de las partículas magnéticas. Debe asegurarse la completa resuspensión del *pellet* de partículas. Coloque el integrador en la zona de reactivos del LIAISON[®] Analyzer y se deja reposar durante 30 minutos antes de utilizarlo para asegurar la completa agitación y resuspensión de las partículas.

Calibración

Cada integrador de reactivos de timidinaquinasa tiene una etiqueta de código de barras con información específica sobre la calibración del lote de integrador de que se trate y debe calibrarse:

- ⊕ Con cada nuevo lote de reactivos (integrador de reactivos o reactivos iniciadores)
- ⊕ Después de una tarea de reparación o mantenimiento del LIAISON[®] Analyzer
- ⊕ Si los resultados del control de calidad están fuera del rango aceptable



Rango de medida. El ensayo LIAISON[®] Thymidine Kinase de DiaSorin mide entre 0,5 U/L y 100 U/L. El valor mínimo presentable es 0,5 U/L. Los valores inferiores a 0,5 U/L deben presentarse como < 0,5 U/L. El máximo valor presentable sin dilución es 100 U/L. Las muestras que superen el rango presentable deben diluirse usando el LIAISON[®] Thymidine Kinase Specimen Diluent y someterse de nuevo a análisis y cálculo.

Dilución de la muestra con concentración alta (> 100 U/L)

Las muestras que presenten valores mayores de 100 U/L deberán diluirse con el LIAISON[®] Thymidine Kinase Specimen Diluent. Una dilución recomendable sería 200 µl de diluyente + 100 µl de muestra clínica. Mezcle bien la dilución, repita el análisis y calcule la concentración final multiplicando por el factor de dilución.

Sustancias interferentes:

Los estudios controlados sobre la interferencia de otras sustancias demuestran que el resultado del ensayo no se ve afectado por colesterol (hasta 500 mg/dl), hemólisis (hasta 500 mg/dl), bilirrubina (hasta 20 mg/dl) ni triglicéridos (hasta 3000 mg/dl).

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Para asegurar el resultado correcto del ensayo, siga estrictamente las instrucciones de funcionamiento del LIAISON[®] Analyzer. Cada parámetro del ensayo se identifica con un código de barras en el integrador de reactivos. Si se produce un fallo de funcionamiento en el lector de código de barras, los datos pueden introducirse manualmente.

Las operaciones del analizador son las siguientes:

1. Dispensar 50µl de la muestra, el calibrador o el control en el módulo de reacción.
2. Dispensar amortiguador de ensayo 1, amortiguador de ensayo 2 y partículas magnéticas en el módulo de reacción.
3. Incubar durante 40 minutos.



4. Dispensar el conjugado en el módulo de reacción.
5. Incubar durante 20 minutos.
6. Lavar con líquido de lavado/sistema.
7. Agregar los reactivos iniciadores y medir la emisión de luz.

El LIAISON[®] Analyzer calcula automáticamente la concentración de TK en la muestra. Esta concentración se expresa en U/L (Unidades/Litro).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Para obtener resultados fiables son imprescindibles una técnica experta y el estricto cumplimiento de las instrucciones. La contaminación bacteriana de las muestras o los ciclos repetidos de congelación-descongelación pueden afectar los resultados del ensayo. Los resultados del ensayo deben utilizarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar al médico a decidir qué tratamiento aplicar a cada paciente.

VALORES ESPERADOS

Con el procedimiento LIAISON[®] Thymidine Kinase se analizaron por duplicado muestras de suero de 98 individuos aparentemente sanos.

Cuadro 2: Límites obtenidos a partir del procedimiento LIAISON[®] Thymidine Kinase en una población sana

Población (N)	Media TK	5-95% rango observado
sana (n=98)	4,3 U/L	2,0 – 7,5 U/L

Estos límites deben considerarse meramente orientativos. Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia.



Cuadro 3: Pacientes con neoplasias hematológicas

Población (N)	Media TK	5-95% rango observado
Linfoma No Hodgkin		
Total (n =172)	24,8 U/L	0,9 – 101 U/L
Indolente (n=33)	9,9 U/L	1,5 – 26,0 U/L
Agresivo (n=54)	38,4 U/L	<0,5 –227 U/L
Mieloma (n=95)	20,5 U/L	<0,5 – 104 U/L
MGUS (n=17)	2,6 U/L	<0,5 – 6,9 U/L
Linfoma Hodgkin (n=23)	12,8 U/L	3,3 – 45,9 U/L
Infecciones benignas (n=43)	7,3 U/L	2,9 – 17,9 U/L
Enfermedades benignas (n=20)	5,3 U/L	1,1 – 10,8 U/L

MGUS: gammapatía monoclonal de importancia indeterminada.

Estos límites deben considerarse meramente orientativos. Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica, definida como la concentración mínima detectable que puede distinguirse de cero con 2 desviaciones estándar, es de $\leq 0,5$ U/L.

Sensibilidad funcional

La sensibilidad funcional se define como la concentración a la que el % CV excede del 20%. La sensibilidad funcional derivada del análisis de regresión del perfil de precisión es de ≤ 5 U/L.



Precisión

La precisión se evaluó según el procedimiento EP5-A2 de CLSI. Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo (es decir, la variabilidad intra e interensayo), se analizaron por duplicado diez muestras, con concentraciones diferentes de analito, dos veces al día durante veinte días de trabajo. Las razones por las que se debe cuantificar la actividad de la enzima Timidina Kinasa son muy variadas, entre ellas como ya se mencionó anteriormente la TK participa en la síntesis de ADN y cataliza la fosforilación de la Timidina en monofosfato de Timidina.⁶¹

TIMIDINA KINASA EN SUERO

En el suero o plasma es muy baja la concentración es por eso que se determina la actividad enzimática. Según el kit LIAISON[®] Thymidine Kinase la media de TK en una población sana es de 4.3 U/L. Sin embargo un gran número de estudios clínicos han indicado que los niveles de TK en suero están elevados en diversas neoplasias tienen un alto riesgo de progresión de la enfermedad como es el caso del Linfoma no Hodgkin y en la leucemia crónica. Las determinaciones de TK en suero ayudan a distinguir entre pacientes con mieloma múltiple o pacientes con gammapatía monoclonal, de igual manera la determinación de la actividad de TK en suero proporciona información pronóstica.³⁷

TIMIDINA KINASA EN TEJIDO

La TK se ha determinado en muestras de tejido después de su extracción. No existe un método estándar para la extracción o para el ensayo. Por lo que no se cuenta con un valor clínico. Los niveles de TKI en tejidos fetales son aún mayores que en distintos tejidos. Ciertas enfermedades también elevan a la TK en células y tejidos como en los linfocitos periféricos y en médula ósea en la anemia perniciosa. La TKI se encuentra presente durante la división celular, por lo que es razonable suponer que su actividad en tejido maligno debe ser mayor que en el tejido normal. Diversos estudios confirman que hay mayor actividad de la Timidina Kinasa en neoplasias hematológicas, cáncer de colon, cáncer de mama²⁴, cáncer de pulmón³⁹, cáncer gástrico, cáncer de ovario³⁴ así como en los tumores de la tiroides.



RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE TIMIDINA KINASA EN DIFERENTES INVESTIGACIONES:

Los resultados obtenidos en los últimos 5 años de las aplicaciones de TK como marcador de proliferación celular en cáncer, como enzima activa en los antirretrovirales y sus aplicaciones en trabajos experimentales permiten clasificar de la siguiente manera:

- A. TK en leucemias
- B. TK en Linfoma no Hodgkin
- C. TK en tumores sólidos
 - C.I TK en cáncer de tiroides
 - C.II TK en cáncer de mama
 - C.III TK en cáncer de pulmón
 - C.IV TK en cáncer de ovario
- D. TK y los medicamentos
- E. TK en experimentos

El instituto Nacional de Cancerología en México describe que el cáncer engloba a una familia compleja de enfermedades cuya característica principal es la alteración del control de la proliferación celular. Las células malignas experimentan cambios en su estructura y aspecto, y al multiplicarse dan origen a unas colonias de células diferentes que se reproducen rápidamente invadiendo y destruyendo los tejidos normales.



TIMIDINA KINASA EN LEUCEMIAS

La leucemia es un grupo de enfermedades malignas de la médula ósea, que provoca un aumento incontrolado de leucocitos en la misma, inicia en la medula ósea, y se extiende a la sangre periférica, los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, el sistema nervioso central (el cerebro y la medula espinal), los testículos u otros órganos.

Dicho padecimiento es catalogado como agudo (que progresa con mayor número de células inmaduras cancerosas) o crónico (que progresa con células leucémicas de apariencia más madura).⁷⁸

Clasificación de las leucemias agudas propuestas por la OMS.

Leucemias mieloides agudas.

Las células madre mieloides generalmente se convierten en un tipo de glóbulos blancos inmaduros llamado mieloblastos (o blastocitos mieloides). Los mieloblastos o células leucémicas de la LMA son anormales y no se convierten en glóbulos blancos normales. Las células leucémicas se acumulan en la sangre y en la médula ósea de modo que hay menos lugar para los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las plaquetas saludables.⁹³

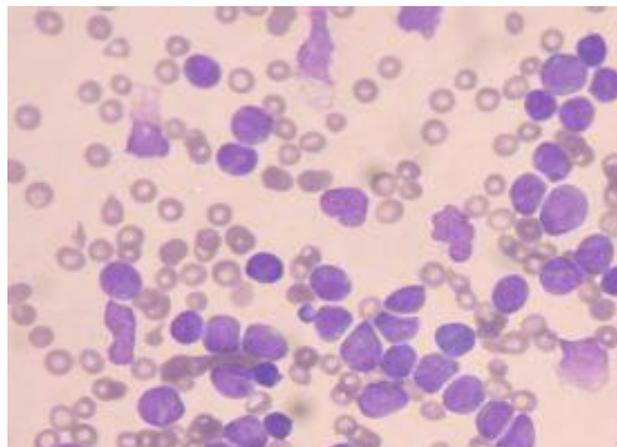


Figura 4: Sangre periférica con LMA



Clasificación:

- Leucemias mieloides agudas con anomalías citogenéticas recurrentes.
- Leucemias mieloides agudas con rasgos mielodisplásicos severos multilínea previos a toda terapéutica.
- Leucemias mieloides agudas relacionadas con la terapéutica.
- Leucemias mieloides agudas referidas en la clasificación FAB (M0 a M7) incluyendo la leucemia aguda a basófilos, la panmielosis con mielofibrosis y las leucemias agudas bifenotípicas.⁸⁸

Leucemias linfoides agudas.

Los linfoblastos en desarrollo se vuelven demasiado numerosos y no maduran. Estos linfocitos inmaduros invaden la sangre, la médula ósea y los tejidos linfáticos, favoreciendo la inflamación. También pueden invadir otros órganos, como los testículos o el sistema nervioso.⁸⁴

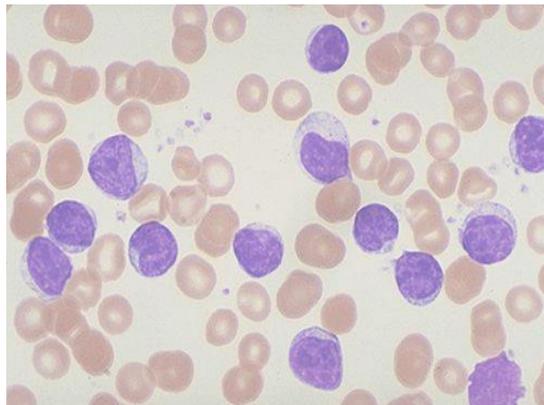


Figura 5: Células sanguíneas con LLA

Clasificación:

- Leucemia linfoblástica aguda de precursores de célula B.
- Leucemia linfoblástica aguda de precursores de célula T.
- Leucemia de Burkitt.⁷¹



Leucemia mieloide crónica.

La leucemia mieloide crónica (LMC), también conocida como leucemia mielógena crónica, es uno de los cuatro tipos más comunes de leucemia. Mundialmente, la LMC tiene una incidencia que va de uno a dos casos por cada 100,000 personas por año y es responsable del 15 % de los casos de leucemia en pacientes adultos. La LMC suele afectar a la población de edad media y la aparición de la enfermedad se da, en promedio, entre los 45 y 55 años. Cerca del 2 % de los casos diagnosticados se produce en la infancia.¹⁷

La LMC es una enfermedad hematológica maligna en la que los glóbulos blancos no alcanzan la madurez y se acumulan en grandes cantidades. La enfermedad se caracteriza por la presencia de una anomalía denominada cromosoma Filadelfia (Ph). El cromosoma Filadelfia se crea por un intercambio de material genético entre los cromosomas 9 y 22. Una porción pequeña del cromosoma 9 pasa al cromosoma 22, y una parte del cromosoma 22 pasa al cromosoma 9 en un fenómeno conocido con el nombre de ‘translocación’.⁸⁶

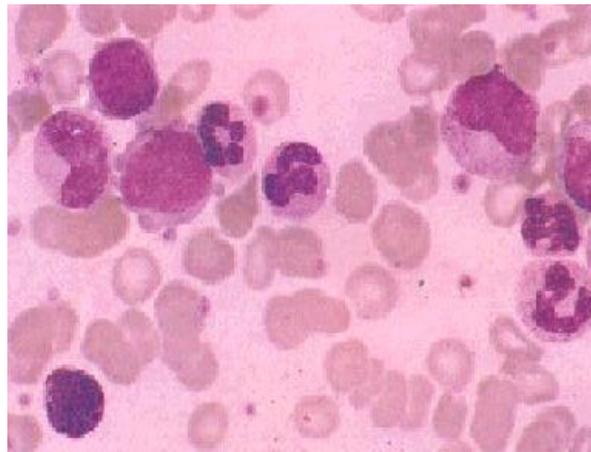


Figura 6: Leucemia Mieloide Crónica

Leucemia linfática crónica.

La leucemia linfática crónica (LLC) es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación clonal maligna de linfocitos B maduros. Es una enfermedad propia del anciano, con cierto predominio del varón sobre la mujer. Es la leucemia más frecuente en pacientes adultos en países.¹⁰⁰

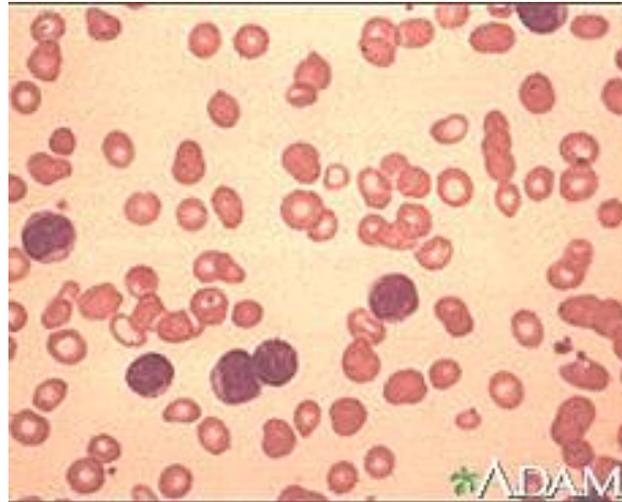


Figura 7: Frotis sanguíneo, LLC

En su conjunto las leucemias, agudas y crónicas, sólo constituyen el 5% de todos los cánceres. Pese a su relativa rareza las leucemias han sido muy estudiadas, debido a que tanto la sangre como la médula ósea son de fácil acceso para el diagnóstico y para observar los efectos terapéuticos.⁹²

Un estudio realizado en el Departamento de Hematología pediátrica en la Universidad de Pilsen en mayo del 2005⁶³, determinó los niveles séricos de la Timidina Kinasa utilizando un método de análisis radioreceptor (immunotech, Praga, Rep. Checa) de los cuales fueron analizados 38 niños, 34 con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y 4 con leucemia mieloide aguda (LMA).⁶⁷

Debido a que TK es considerado un marcador de proliferación celular, el objetivo fue observar el comportamiento de Timidina Kinasa en la leucemia y finalmente compararlo con otros marcadores de proliferación celular como son; lactato deshidrogenasa, Sedimentación globular, β -2 microglobulina y Ferritina.

La edad de los 38 pacientes fue de 6,5 años y el rango de edad fue de 1 a 15 años. El tiempo de observación de los pacientes fue de 46,7 meses con un rango de 3 a 95 meses.

Se analizaron los niveles de TK en el momento del diagnóstico a través del método radioreceptor. El ensayo consiste en la fosforilación enzimática de 5-[¹²⁵I]- desoxiuridina, que es catalizada por Timidina Kinasa contenida en la muestra. La 5-[¹²⁵I]- desoxiuridina es



transformada en 5-yododesoxiuridina monofosfato ($^{125}\text{Id-UMP}$). La $^{125}\text{Id-UMP}$ se separa de la mezcla de reacción por adsorción e intercambio iónico en resina. El adsorbente se lava y la radioactividad se determina en un contador gamma. La actividad enzimática de la Timidina Kinasa en la muestra se obtiene por interpolación en la curva estándar y es directamente proporcional a la radioactividad.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SAS (Statistical Analysis System), versión 8.02. La comparación de variables se realizó por medio de las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon. Las relaciones entre los parámetros se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

La enzima Timidina Kinasa ha sido comparada con otros parámetros que suelen ser probados en pacientes con hemoblastosis⁸⁹ que es la proliferación tumoral de las células hematopoyéticas que se produce durante una leucemia aguda, en la enfermedad de Hodgkin y en el linfoma, entre otras.

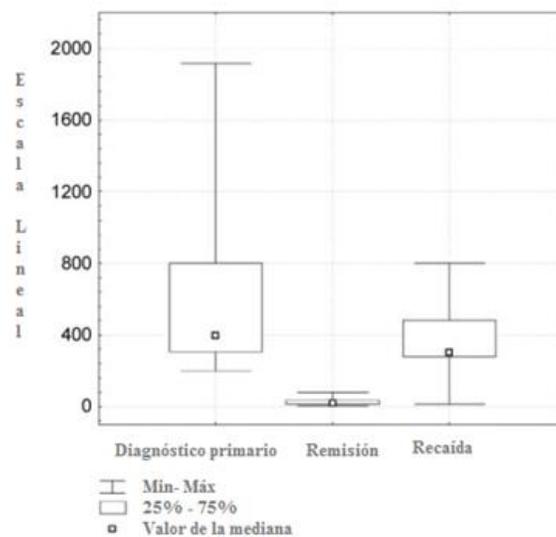


Figura 8: niveles de la Timidina Kinasa en el diagnóstico, durante la remisión y la recaída en la leucemia aguda

En la figura 8 se mostraran los diferentes niveles de Timidina Kinasa que tuvo antes de comenzar el tratamiento, durante la remisión y durante la recaída.



Se puede observar que los niveles de TK en el diagnóstico son muy altos (lo normal es de hasta 8 U/L). Los valores en la remisión son los más bajos y finalmente en la recaída se observa un aumento similar a los valores medios que se obtuvieron en el diagnóstico.

Figura 9: niveles de β -2 microglobulina el momento del diagnóstico, durante la remisión y en la recaída

Como se aprecia en la figura 9, en el diagnóstico se mostró un valor elevado de β -2 microglobulina, en la recaída vuelve a aumentar si se compara con la remisión.

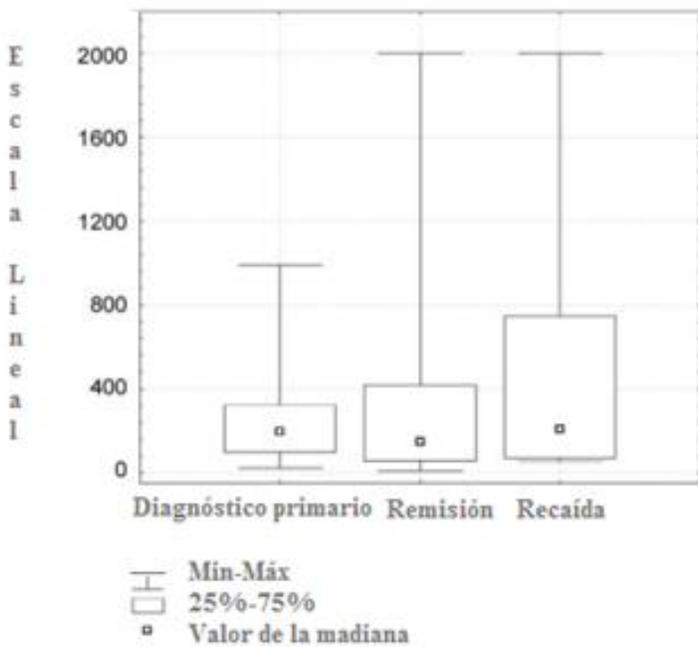
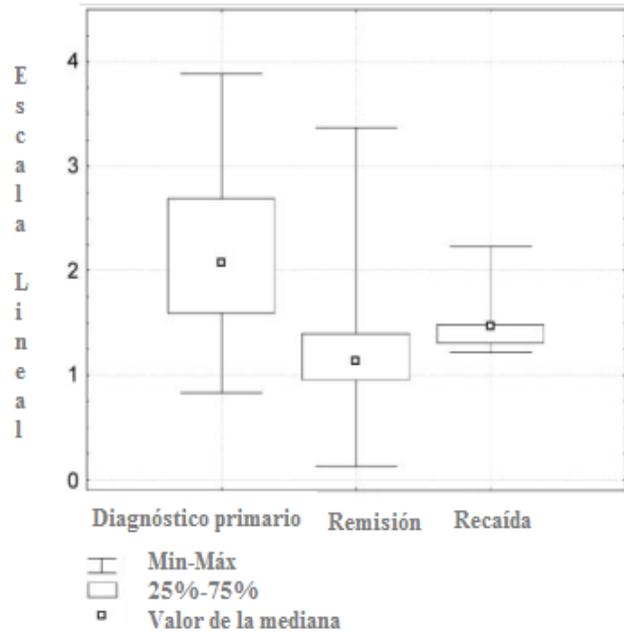


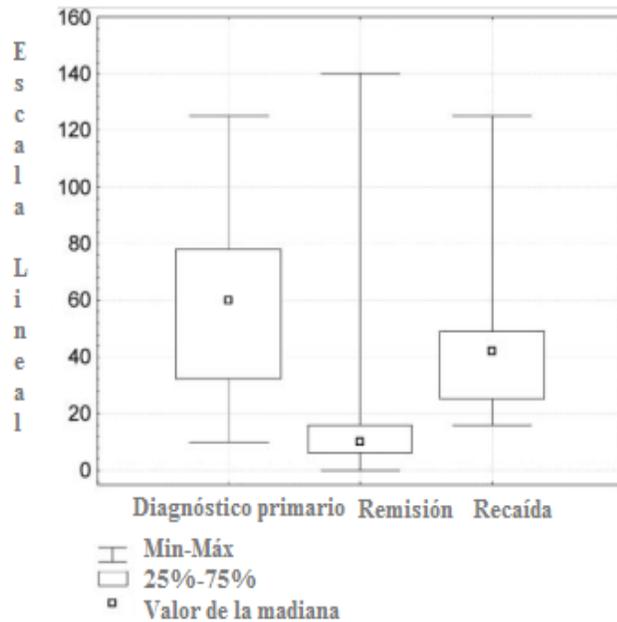
Figura 10: valores de ferritina en el diagnóstico, la remisión y durante la recaída

En la figura 10 donde se muestran los valores de ferritina, se observó que durante la remisión y la recaída los valores no mostraron cambios significativos, únicamente el diagnóstico muestra niveles más bajos.



Figura 11: velocidad de sedimentación globular (FW) en el diagnóstico, durante la remisión y en la recaída

En la figura 11 se analizaron los valores de la velocidad de sedimentación globular, en el diagnóstico como en la recaída los valores son muy semejantes casi no se aprecia una diferencia significativa, en comparación con la remisión los niveles se ven aumentados.



Para lograr entender el porqué se hizo una comparación de Timidina Kinasa con los demás parámetros lactato deshidrogenasa, Sedimentación globular, β -2 microglobulina y Ferritina, se realizó con la finalidad de saber cuál es el mejor marcador de proliferación celular a nivel de leucemias.

Lactato deshidrogenasa es un ejemplo claro de un marcador de proliferación celular que se encuentra prácticamente en todos los tejidos, pero en células tumorales su concentración se encuentra aumentada, posiblemente para marcar los mecanismos glucolíticos como fuente de energía para su proliferación, debido a su función en el proceso de glucólisis.¹⁰

La velocidad de sedimentación globular (VSG), es una medida indirecta de la variación de las proteínas de fase aguda, las de mayor concentración y, en particular, el fibrinógeno. Este parámetro está muy influenciado por el número, el tamaño y la forma de los hematíes y por otros constituyentes del plasma como las inmunoglobulinas. Así, la VSG aumenta tardíamente y refleja con retraso las variaciones del estado del paciente. Mantiene su interés como un “indicador vulgar” de una modificación plasmática o eritrocitaria, pero siendo la determinación de las proteínas de fase aguda más específica. Las proteínas de fase aguda se definen por una variación de más del 25% de su concentración plasmática en los 7 días siguientes al principio de un proceso inflamatorio agudo.⁹



Los niveles de β -2 microglobulina conocido por sus siglas en inglés como B2M, se elevan con el mieloma múltiple, la leucemia linfocítica crónica (LLC) y algunos linfomas. También los niveles pueden ser más altos con algunas afecciones no cancerosas, como la insuficiencia renal (enfermedad del riñón) y hepatitis. Los niveles normales por lo general están por debajo de 2.5 mg/l.

La B2M es útil en la predicción de la perspectiva de supervivencia a largo plazo (prognosis) en algunos de estos cánceres. Los pacientes con niveles más altos de B2M por lo general tienen resultados menos favorables. La B2M también es revisada durante el tratamiento contra el mieloma múltiple para saber qué tan bien está funcionando el tratamiento.⁹⁵

Finalmente la Ferritina es una proteína importante no solo en enfermedades que involucran el transporte, captación y almacenamiento de hierro, sino también en enfermedades inflamatorias, infecciones y pacientes con cáncer³⁰. Se observan niveles elevados en pacientes con enfermedades neoplásicas en ausencia de sobrecarga de hierro (leucemia mielocítica aguda, teratoblastoma y carcinoma de células escamosas de cuello, entre otras.) Existe una correlación positiva entre los niveles de ferritina sérica y los estadios avanzados de cáncer en: cáncer de mama, ovario, pulmón, colon y esófago.⁸²

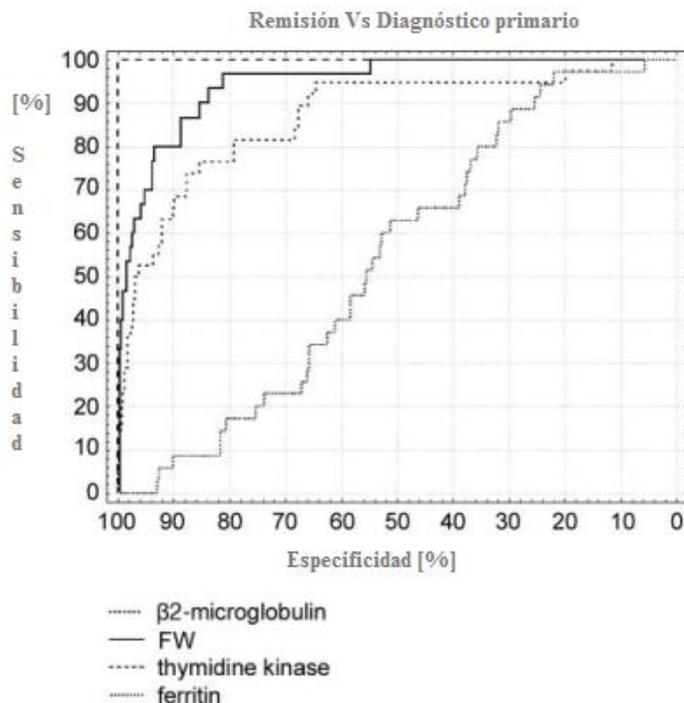


Figura 12: comparación de las características (especificidad y sensibilidad) para los parámetros investigados

En base a los resultados de la determinación de los niveles de Timidina Kinasa en el diagnóstico, en la remisión y en la recaída, se demostró que es un buen parámetro para el monitorio del progreso hemato-oncológico de la enfermedad. En comparación con



otros marcadores tumorales, la enzima TK es la más adecuada para el monitorio a largo plazo y el seguimiento. Sin embargo los niveles de TK y otros parámetros no fueron capaces de demostrar la capacidad pronóstica en el diagnóstico con la continuación clínica de la enfermedad.

A pesar de que los niveles de Timidina Kinasa mostraron una actividad en el proceso de leucemias, no son adecuados para la clasificación de los pacientes con leucemias agudas en categorías de riesgo.

En pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) los niveles de TK pueden proporcionar información pronóstica independiente de la etapa y de otros factores pronósticos, sin embargo lo que aun no es claro es la predicción de respuesta al tratamiento y duración de la supervivencia¹². En la leucemia linfocítica crónica, los niveles de TK no solo se relacionan con la etapa Rai de la enfermedad sino también con el estado, que a su vez permite la distinción entre agresiva e indolente.

Para saber si realmente el nivel de la TK serviría para predecir la respuesta y la supervivencia en pacientes con LLC se realizó un estudio en la Universidad de Texas M.D. Anderson Cancer Center donde se dispusieron de 188 pacientes tratados con fludarabina sola o combinada con prednisona. La edad media de los pacientes fue de 63,5 años, la distribución de poblaciones se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo *National Cancer Institute*⁷ donde se incluyeron pacientes con enfermedad avanzada (fase II, III o IV) y enfermedades con etapas activas en la primera etapa (etapa Rai 0 o I). No se incluyeron pacientes con enfermedad indolente.

El tiempo medio de tratamiento fue de 43 meses. Cincuenta de los pacientes fueron tratados; 138 pacientes habían recibido de 1 a 10 tratamientos. Los niveles de TK se determinaron justo antes del tratamiento con fludarabina. El tratamiento consistió de la siguiente manera; 130 de los pacientes recibieron fludarabina y prednisona (30mg/m²/día) de cada uno durante un periodo de cinco días. Once pacientes recibieron únicamente fludarabina (30mg/m²/día) durante 5 días, 7 pacientes más recibieron el mismo tratamiento pero solamente por tres días y 40 pacientes lo tomaron por semana.



La respuesta fue evaluada de acuerdo a las directrices del *National Cancer Institute*. Los niveles séricos de TK se midieron por el método radiorreceptor que consiste en la fosforilación enzimática de 5-[125I]- desoxiuridina, que es catalizada por Timidina Kinasa contenida en la muestra. Mismo que se utilizó para (LLA). TK fue expresó por arriba de 5U/L del nivel superior en pacientes sanos.

La evaluación estadística de la distribución de los niveles de TK por etapa de la enfermedad u otras características se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, las curvas de tiempo de progresión y supervivencia se estimaron mediante el método Kaplan-Meier. Las asociaciones entre los niveles de TK y el intervalo de progresión y supervivencia global se evaluaron mediante la prueba de log-rank.

En los resultados en los niveles de TK de 188 pacientes, 173 tuvieron un nivel sérico mayor a >5U/L. La mediana del nivel de TK para toda la población fue de 17U/L y el promedio fue de 28U/L. Los pacientes que no fueron tratados obtuvieron significativamente un nivel de TK menor (mediana 9.4U/L) y para los pacientes que recibieron uno o varios tratamientos se obtuvieron un nivel medio o promedio de TK de 19U/L.

Los niveles de TK están directamente relacionados con la etapa de la enfermedad, comparando las diferentes clasificaciones entre Binet y Rai. En la siguiente tabla se observan las diferencias entre cada una.

Cuadro 4: Relación nivel TK & estadificación de la enfermedad

Niveles de TK en relación con la etapa de la enfermedad

	Etapa Rai					Etapa Binet		
	0	I	II	III	IV	A	B	C
Numero de pacientes	13	37	40	40	58	49	56	83
Niveles medios de TK (U/l)	17.4	13.9	24.8	32	30.2	13.5	25.1	32.5
Desviación estándar	34.7	9.4	30.3	28.5	31.8	18.9	27.9	31.3
Mediana de TK (U/l) a	7.1	10.4	11.5	20	21.8	8.3	16.8	22.2

a < 0.01 Para el sistema de estadificación



Se observa en el cuadro 4 que hubo una correlación entre los niveles de TK y la estadificación Rai, en tanto que la linfocitosis fue más severa de acuerdo a la clasificación, también los niveles de TK fueron aumentando. De la misma manera en el sistema de clasificación Binet entre más fuera el número de tejidos afectados mayor fue el nivel de TK en suero.

El nivel de Timidina Kinasa también se asoció con otros parámetros, que se muestran en la siguiente tabla; en donde se observó: el número de plaquetas, de hemoglobina, recuento de glóbulos blancos (WBC), recuento de linfocitos, linfocitos en médula ósea, lactato deshidrogenasa, β 2-microglobulina, IgA entre otros.

Cuadro 5: Correlación entre los niveles de TK y otros parámetros pronóstico

Indicador	Numero de pacientes	Nivel (U/l)	P- Valor
Plaquetas			
< $100 \times 10^9/l$	58	21.9	
$\geq 100 \times 10^9/l$	130	14.3	0.05
Hemoglobina			
< 11 g/dl	87	22	
≥ 11 g/dl	101	10.6	< 0.01
Conteo de glóbulos blancos			
< $50 \times 10^9/l$	90	14.4	
$\geq 50 \times 10^9/l$	98	18.4	0.03
Recuento de linfocitos			
< $21 \times 10^9/l$	62	14.6	
$21-76 \times 10^9/l$	64	16.3	0.02
$> 76 \times 10^9/l$	62	21	
Linfocitos en aspirado de médula ósea			
< 50%	34	9.0	
50%-84%	77	14.2	< 0.01
$> 84\%$	66	22.3	
Lactato deshidrogenasa			
< 350 IU/l	60	10.3	
> 350 IU/l	126	18.2	0.02
Beta 2- microglobulina			
< 3.5 mg/l	56	10.5	
3.5-5.25 mg/l	58	19.5	< 0.01
> 5.25 mg/l	51	22.6	
IgA			
< 75 mg/dl	121	19.7	
> 75 mg/dl	56	9.55	< 0.01
Estado funcional			
0	87	11.9	
1, 2, 3	98	21.15	0.02
Tratamiento previo			
0	50	9.4	
1-3	138	19	< 0.01



Si se analiza detalladamente el cuadro 5 se observa que a $>100 \times 10^9/L$ plaquetas se obtuvo un nivel de TK 14.3U/L, en cambio cuando es $<100 \times 10^9/L$ plaquetas, los niveles de TK aumentaron (21.9U/L).

Si la concentración de hemoglobina fue $>10g/dL$ el nivel de TK fue de 10.6U/L, a la inversa cuando la hemoglobina fue $<10g/dL$ el nivel de TK aumentó. El 20% de los pacientes con LLC presentaron anemia o plaquetopenia.

El conteo total linfocitario también se correlacionó con el nivel de TK, cuando es $<21 \times 10^9/L$ linfocitos, el nivel de TK fue de 14.6U/L, pero a medida que aumentó el nivel linfocitario se incrementó también el niveles de TK. La linfocitosis absoluta mayor a $10 \times 10^9/L$ en sangre periférica, persiste al menos por cuatro semanas.

La linfocitosis sanguínea y medular estuvieron directamente correlacionados, los pacientes con recuento absoluto de linfocitos periféricos con valores entre $5 \times 10^9/L$ y $10 \times 10^9/L$ presentaron menos de 30% de infiltración linfocitaria medular. En este caso a medida de que aumentaron los linfocitos medulares al igual que los periféricos los niveles de TK también fueron en progreso.

La Lactato deshidrogenasa como ya se mencionó anteriormente es un marcador de proliferación celular en tejidos tumorales, correlacionándolo con los niveles de TK en pacientes con LLC, entre más altos son los niveles de lactato deshidrogenasa $>350IU/L$ mayores son los niveles de TK (18.2U/L).

Otro de los marcadores tumorales que se mencionó es la $\beta 2$ -microglobulina que también se correlacionó con los niveles de TK, a medida de que aumentó el nivel de la $\beta 2$ -microglobulina también aumentó el de la Timidina Kinasa.

La inmunoglobulina A debido a que es un mecanismo de defensa se aumentó, y en este caso la Timidina se vio disminuida.

El estudio también hizo una comparativa entre el nivel de TK y la respuesta al tratamiento de acuerdo al estadio.



Cuadro 6: relación entre la TK y la respuesta al Tratamiento

Grupos de status	Nivel de TK (U/l)	Nº. de pacientes	Porcentaje de pacientes que responden			valor P
			CR	PR	Total	
Serie total	< 10	60	68	15	83	0.01
	≥ 10	128	30	15	45	
Pacientes sin tratar	< 10	27	85	11	96	0.02
	≥ 10	23	48	21	70	
Pacientes previamente tratados	< 10	33	55	18	73	0.01
	≥ 10	105	6	3	39	

Abreviaciones: CR- Respuesta completa;
PR- Respuesta parcial

Se utilizó el nivel de corte de 10U/L para Timidina Kinasa en la evaluación estadística, mismo que fue seleccionado en otros estudios de nivel de TK como un indicador pronóstico en el linfoma no Hodgkin y LLC. Analizando el cuadro en un total de pacientes con un nivel de TK <10U/L la respuesta al tratamiento con fludarabina fue significativamente mayor (CR + PR 83%) a la respuesta de los pacientes con nivel de TK >10U/L (CR + PR 45%).

Para el análisis de los pacientes no tratados, el 96% de los pacientes que tuvieron un nivel de TK <10U/L respondieron al tratamiento (CR + PR). El 70% de los pacientes no tratados con un nivel de TK >10U/L respondieron al tratamiento.

Para el análisis de los pacientes previamente tratados el 73% de ellos con un nivel de TK <10U/L respondieron al tratamiento. El 39% de los pacientes tratados previamente con el nivel de TK >10U/L respondieron al tratamiento (CR + PR). En concreto todos los pacientes con un nivel de TK <10U/L mostraron una respuesta superior al tratamiento (CR + PR) que los pacientes no tratados y tratados previamente.



También se comparó el nivel de TK de acuerdo a la etapa Binet, la siguiente imagen muestra que se tiene la misma tendencia que la tabla anterior. Se observó que los pacientes con un nivel de TK <10U/L responden mejor al tratamiento (CR + PR) en la etapa Binet, y los pacientes con un nivel de TK >10U/L fueron significativamente menores en la respuesta al tratamiento en la misma etapa Binet.

Cuadro 7: relación entre el nivel de TK y su respuesta de acuerdo al estadío Binet

Etapa Binet	Nivel de TK (U/l)	Número de pacientes	Porcentaje de pacientes que responden			P-valor
			CR	PR	Total	
A	< 10	31	77	12	90	0.02
	≥ 10	18	44	22	66	
B	< 10	18	72	16	88	0.02
	≥ 10	38	47	10	57	
C	< 10	11	36	18	54	0.17
	≥ 10	72	18	15	33	

Abreviaciones: CR- Respuesta completa;
PR- Respuesta parcial

El estudio confirmó que el nivel de TK <10U/L se asocia también con la supervivencia de los pacientes tratados y no tratados, además de que se asociaron los niveles de TK con la etapa Binet. Se encontró correlación entre los niveles de TK con diversos factores que apoyan al pronóstico y tratamiento de la Leucemia Linfocítica crónica como se describió, la carga tumoral, el recuento de leucocitos, hemoglobina, linfocitos, células de la médula ósea, así como otros marcadores tumorales como la β2-microglobulina entre otros.

El nivel de TK añadió información pronóstica para predecir la respuesta al tratamiento con fludarabina en pacientes tratados y no tratados, así como también la duración de la supervivencia de los pacientes y de ser utilizados en la planificación de nuevas estrategias terapéuticas.



TIMIDINA KINASA EN LINFOMA NO HODGKIN

El linfoma no Hodgkin (LNH) es una neoplasia que afecta al tejido linfoide de una forma característica, ya que la mayor parte de la tumoración está constituida por un número variable de células reactivas (linfocitos, granulocitos, histiocitos, células plasmáticas, entre otras.) entre las que se encuentran las células malignas denominadas células de “Reed-Stenberg” (RS) y sus variantes mononucleares.

Los LNH constituyen un grupo de neoplasias surgidas a partir de las células linfoides situadas en las diferentes áreas que existen en los nódulos linfáticos (folículos linfoides, zona de manto o perifolicular y zona interfolicular) o del sistema linfoide extra nodular.

La mayoría de estos linfomas presentan un grupo de neoplasias que tienen diversidad de antecedentes, manifestaciones, tratamiento y pronóstico, se originan en los ganglios linfáticos y generalmente se extienden a bazo, hígado y medula ósea y en casos muy avanzados puede llegar a órganos.⁴⁰

Los linfomas son una de las enfermedades cuya incidencia ha aumentado más en los últimos años. Un linfoma puede afectar a cualquier persona y aparecer a cualquier edad, aunque dependiendo del tipo hay algunas edades en las que el riesgo es mayor. Los pacientes diagnosticados por primera vez de LNH son, frecuentemente, adultos de edad avanzada con una edad media de 65 años.

No se conoce cuál es la causa de los LNH por lo que es difícil prevenir su aparición. Los posibles factores que podrían contribuir al desarrollo de un linfoma no Hodgkin son factores genéticos, desórdenes auto-inmunes y virus como el virus del sida (VIH).⁹⁰

En los casos en los que existe una asociación entre un agente infeccioso y un tipo de linfoma no Hodgkin es posible actuar de forma preventiva, o mejor dicho, detectarlo de forma precoz.

No existen condicionantes externos relacionados con hábitos de vida que influyan en la aparición de los linfomas no Hodgkin y por tanto no se puede prevenir su aparición.

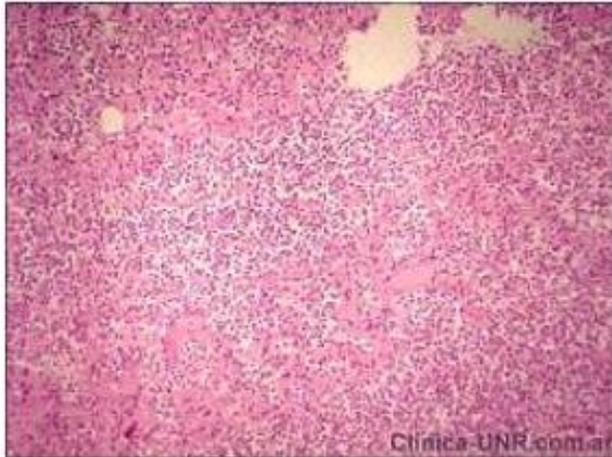


Figura 13: Linfoma no Hodgkin de linfocitos de núcleos pequeños y grandes que infiltra extensamente las meninges cerebrales, en múltiples focos peri vasculares y para ventriculares del cerebro.

La Timidina Kinasa parece ser un marcador útil en el Linfoma no Hodgkin, en los que se relaciona con la clasificación clínica y ofrece información pronóstica importante en su progresión.³⁵

En primer lugar para poder diagnosticar el LNH es necesario hacer una exploración física del paciente en donde se va a permitir en muchos casos diferenciar si el ganglio tiene las características malignas o no. Para eso se recurre a la biopsia que llevará a un diagnóstico definitivo.

Una vez confirmado el diagnóstico de LNH, el siguiente paso consiste en averiguar en qué sitio se localiza la enfermedad para determinar que tan extendida se encuentra. El procedimiento lleva el nombre de estadiaje y se averigua la localización, el tamaño de los ganglios y si otros órganos también se encuentran afectados ya sea hígado, o médula ósea, para poder llevarse a cabo el médico realiza una exploración física así como análisis y técnicas de imagen como son radiografías, tomografías, ecografías etc.

Recientemente se llevó a cabo un estudio donde se evaluó la importancia pronóstica de las isoenzimas de Timidina Kinasa en el Linfoma no Hodgkin en el adulto¹⁵, con el fin de evaluar la utilidad de los marcadores bioquímicos en este caso TKI y TKII en cuanto al comportamiento clínico y potencialmente para determinar el tratamiento adecuado.

El estudio realizado en el año de 2011 por The American Society of Hematology, se analizó el plasma y los linfocitos de 44 pacientes con LNH ya sea para TKI o para TKII. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a Rappaport⁹⁶ la cual se basó en el grado de



diferenciación del tumor y en el patrón de crecimiento fuese nodular o difuso. Sin embargo a pesar de la utilidad clínica de esta clasificación se dio lugar a la determinación de diversos parámetros de pronóstico tales como el volumen del tumor, la afectación de órganos específicos y las características inmunológicas de las células neoplásicas.

La Timidina Kinasa en plasma se midió en 44 pacientes y para linfocitos se llevó a cabo en 38 pacientes. De acuerdo con la clasificación Ann Arbor⁸³ que describe 4 estadios clínicos; los pacientes recibieron quimioterapia en combinación con ciclofosfamida, vincristina y prednisona, o los anteriores más adriamicina. Se llevó también un control para determinar la actividad enzimática. Se recolectaron plasma de sangre periférica y linfocitos de 32 individuos, 15 fueron trabajadores de laboratorios y 17 de pacientes hospitalizados con enfermedades no neoplásicas.

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera; primeramente se obtuvieron 10 ml de sangre venosa periférica heparinizada, se separaron los linfocitos por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Los linfocitos se ajustaron a 10^7 células/ml en 50mM Tris-HCl, posteriormente se lisaron por congelación y descongelación rápida en nitrógeno líquido. Los extractos celulares se centrifugaron a 10000 g a 4°C por 15 minutos y el sobrenadante se utilizó para el ensayo con Timidina Kinasa utilizando ^3H -thymidine como sustrato marcado radioactivamente. La actividad enzimática se expresó como nmol/hr/mg de proteína (ésta se determinó según el método de Lowry).

La actividad enzimática en plasma se determinó en un volumen de 0.1 ml. La mezcla de reacción contenía 100 mM Tris-HCl, pH 7,4. 5 mM de trifosfato de Adenosina, 10 mM de cloruro de magnesio, 10 mM de fluoruro de sodio, 5 μM de 6-3H-thymidine y 0.05 ml de plasma. Se incubó durante 30 minutos a 37°C la reacción terminó por ebullición en baño de agua durante 1 minuto. Se llevó a centrifugación a 10000 g por 10 minutos y se tomaron alícuotas de 50 μL se observaron en cuadros de papel Whatman DE-81. La actividad enzimática se expresó como se mencionó para linfocitos.

Las actividades de las isoenzimas de Timidina Kinasa fueron identificadas por comparación de sus propiedades bioquímicas. La isoenzima TKI tiene especificidad por el trifosfato de Adenosina (ATP) mientras que la TKII también utiliza el trifosfato de citidina (CTP).



Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Para el Control de plasma el valor medio de CTP/ATP fue de 0.75 con un rango (0.65-0.90) la actividad de TKII fue de 0.01 nmol/hr/ml con un rango de (0.005 a 0.02)

Para el Control de linfocitos el valor medio de CTP/ATP fue de 0.73 con un rango (0.63-0.85) la actividad de TKII fue de 0.18 nmol/hr/ml con un rango de (0.09-0.25).

En la siguiente imagen se muestra la actividad enzimática que tuvieron la TKI y TKII en plasma y en linfocitos, en los diversos grupos en los cuales se clasificaron los pacientes con LNH

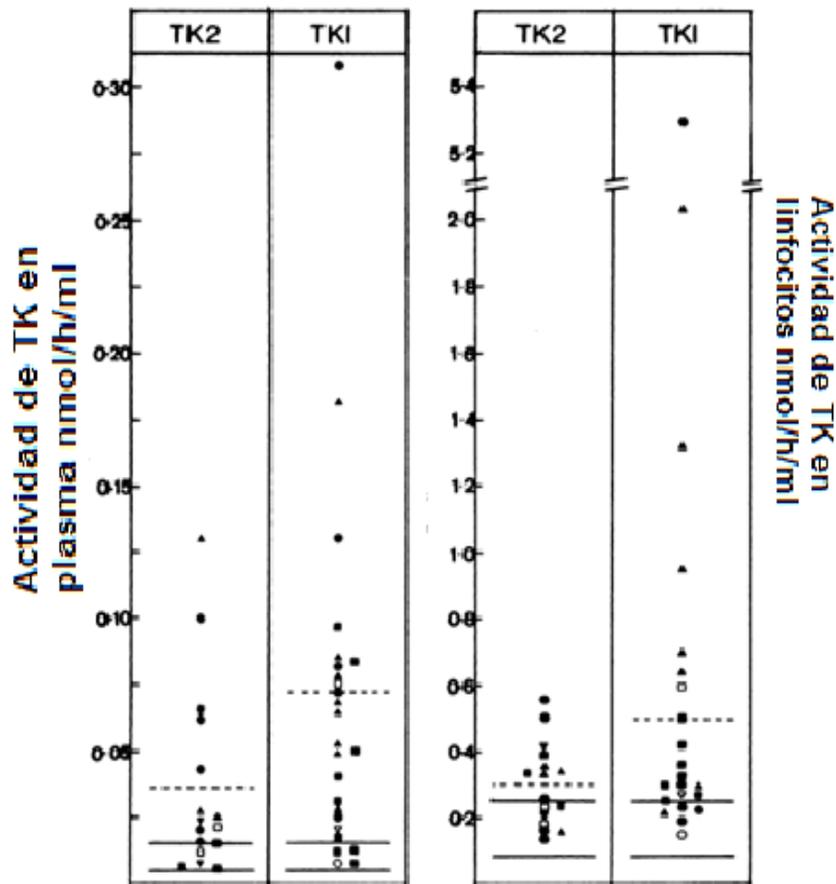


Figura 14: Actividad de las isoenzimas de TK en plasma de sangre periférica y linfocitos en los pacientes con linfoma no Hodgkin. NDPL (●), NM (▼), NH (○), DWDL (▽), Dli (□), DPDL (▲), DHL (■). Las líneas discontinuas indican los valores medios y las líneas continuas de la gama de actividades de control.



Cuadro 8: cuadro de la izquierda resultados clínico-patológicos en los pacientes con LNH según los resultados de la Timidina Kinasa en sangre periférica

	Estado Timidina Kinasa	
	TK2	TK1
Numero de pacientes	18	26
Edad (yr): Media	56 (20-72)‡	53 (19-75)
Sexo(M/F)	11/7	18/8
Estadio clínico *		
I-III	4	7
IV	14	19
Sintomas +	5	12
Linfocitos periféricos		
× 10 ⁹ /litro (medio)	2.1 (0.5-6)	1.8 (0.4-4)
Afectación de médula ósea	12	20
Histología		
Nodular	6	7
Difusa	12	19
Actividad plasmática de Timidina Kinasa (nmole/hr/ml)		
Pacientes	0.04 (0.06-0.13)	0.08 (0.05-0.30)
CTP/ATP§	0.72 (0.6-0.9)	0.25 (0.1-0.35)
Linfocitos de sangre periférica		
Timidina Kinasa (nmole/hr/mg)		
Pacientes	0.30 (0.13-0.56)	0.63 (0.15-5.3)
CTP/ATP	0.73 (0.60-0.85)	0.30 (0.15-0.35)

*De acuerdo con el sistema de clasificación de Ann Arbor +Fiebre, sudores nocturnos, o más del 10% de pérdida de peso en 6 mo.
 ‡ El valor medio, las cifras entre paréntesis indican el rango.
 § Relación de la actividad enzimática media con CTP a la obtenida con ATP

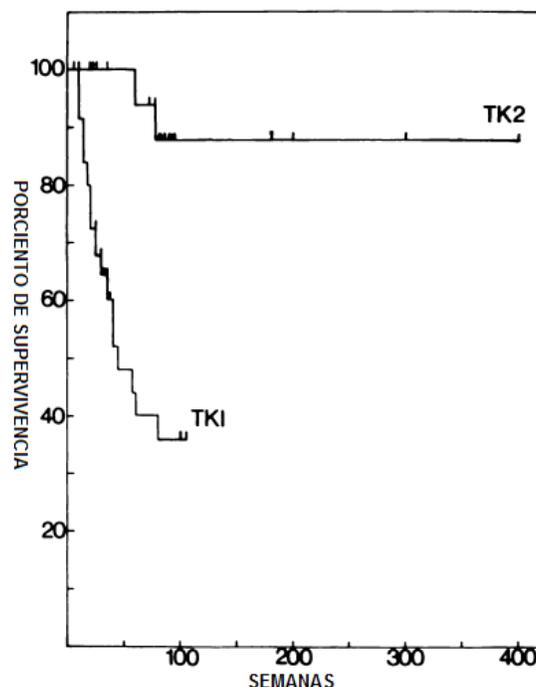


Figura 15: (Derecha) Curva de supervivencia para los pacientes con linfoma no-Hodgkin de acuerdo a las isoenzimas de Timidina Kinasa isoenzima (TK1. TK2)

Ambos grupos mostraron una actividad enzimática mayor en tanto en plasma como en linfocitos comparados con los controles y en cuanto a los niveles de TKI fue aproximadamente el doble, correspondiente a los valores de TKII como se visualiza en la imagen 19.

La comparación entre ambos grupos de los rangos de valores de plasma y de linfocitos para la actividad de la enzima Timidina Kinasa mostró una considerable superposición lo que indicó que el nivel de la actividad de la enzima no es un valor que discrimine entre las



isoenzimas TKI y TKII. Además en ambos grupos existió una variación considerable en la actividad de la enzima dentro de las categorías histológicas.

De acuerdo a la imagen 20 tampoco se observó una diferencia significativa entre los dos grupos en cuanto a la edad, sexo, resultados histológicos nodulares, difusos, etapa clínica, niveles de linfocitos en sangre periférica y médula ósea. Los métodos actuales para la clasificación de los linfomas no Hodgkin se basaron en características inmunológicas de células neoplásicas, marcadores de superficie entre otros. Estos métodos proporcionaron una buena información sobre el comportamiento del tumor, pero la heterogeneidad clínica de los LNH ha requerido de otros parámetros de relevancia clínica.

Las isoenzimas de Timidina Kinasa en sangre periférica, son un parámetro para la distinción de los tipos histológicos de linfoma no Hodgkin. En el estudio se observaron las enzimas TKI y TKII por separado en pacientes con LNH en dos grupos que parecían no tener diferencias significativas en los factores que influyen en la supervivencia: la histología difuso o nodular, estadio clínico, afectación de la médula, linfocitos de sangre periférica; se demostró la importancia de la isoenzima TKI.

La capacidad pronóstica independiente de las isoenzimas de la TK mostró una alta diferencia en la media de supervivencia para los pacientes con TKI en sangre periférica de 40 semanas frente a >200 semanas para TKII.

Los análisis resientes de las isoenzimas de la Timidina Kinasa en tejido linfoide mostraron el aumento gradual de la actividad de la TKI en pacientes con LNH y la des diferenciación celular de linfoma linfocítico. Los resultados en cuanto la actividad de la isoenzima TKI en plasma y en linfocitos refleja la proliferación agresiva del tumor o la difusión en sangre de células neoplásicas, en pacientes con leucemias, la forma diseminada del LNH y la LLC, podrían apoyarse para el pronóstico y tratamiento adecuando a estas patologías.

Recientemente se han desarrollado diversas técnicas para la cuantificación de Timidina Kinasa en suero, una de ella ha utilizando una enzima [¹²⁵I]-iododeoxyuridine como sustrato en pacientes con linfoma no Hodgkin²⁸. El estudio requirió de 155 pacientes y se distribuyeron de acuerdo a la clasificación de Ann Arbor⁷⁹ apoya en el estudio del linfoma,



se precisa de información de la historia clínica, exploración física, técnicas de diagnóstico por imagen, análisis de sangre, informe de la biopsia inicial y de la médula ósea. La histología del tumor se distribuyó de acuerdo a la clasificación de Keil⁷² la cual integró datos inmunológicos y la fisiología del tejido normal. La clasificación distingue dos grados (bajo y alto) y su valor distingue entre el origen de linfocitos T o B.

Cuadro 9: Distribución de los subgrupos histológicos según la clasificación de Kiel y el estadio de la enfermedad

	Abreviación	Estadio I	II	III	IV
"De alto grado "de malignidad					
linfoblástica	(LB)	1	1	0	3
inmunoblástico	(IB)	2	2	1	3
centrocítico	(CB)	13	3	2	21
Difusa centrocítico-centroblástico	(D CB – CC)	4	1	2	6
"Grado intermedio" malignidad					
Immunocítico	(IC)	9	3	0	21
centroblástico	(CC)	0	0	0	1
Folicular y difusa centroblásticas -centrocítico	(F + D CB – CC)	1	1	2	7
"Bajo grado" de malignidad					
linfocítica	(LC)	0	0	0	6
Folicular centrocítico-centroblástico	(F CB – CC)	8	2	6	11
Sin clasificar		3	0	1	8
Total		41	13	14	87

Por el uso de este método se pueden medir los valores de TK en suero de forma transitoria durante la fase aguda de convalecencia de las infecciones con Morbilli, rubeola y diferentes tipos de herpes. Niveles elevados de TK en suero también aporta características propias de la anemia perniciosa y de diferentes tumores malignos, tales como leucemia crónica granulocítica, aguda mieloide y leucemia linfoide, cáncer pulmonar de células pequeñas y en el Linfoma no Hodgkin.

El propósito de correlacionar los niveles de TK en pacientes con linfoma no Hodgkin con otros parámetros en este caso; fue la dispersión de la enfermedad, el grado de malignidad y el efecto de la terapia.

El ensayo se realizó con la enzima [¹²⁵I]-iododeoxyuridine, se tomaron muestras de 155 pacientes no tratados pero diagnosticados con LNH. La media de las edades fue de 54 años con un rango de (16-83).



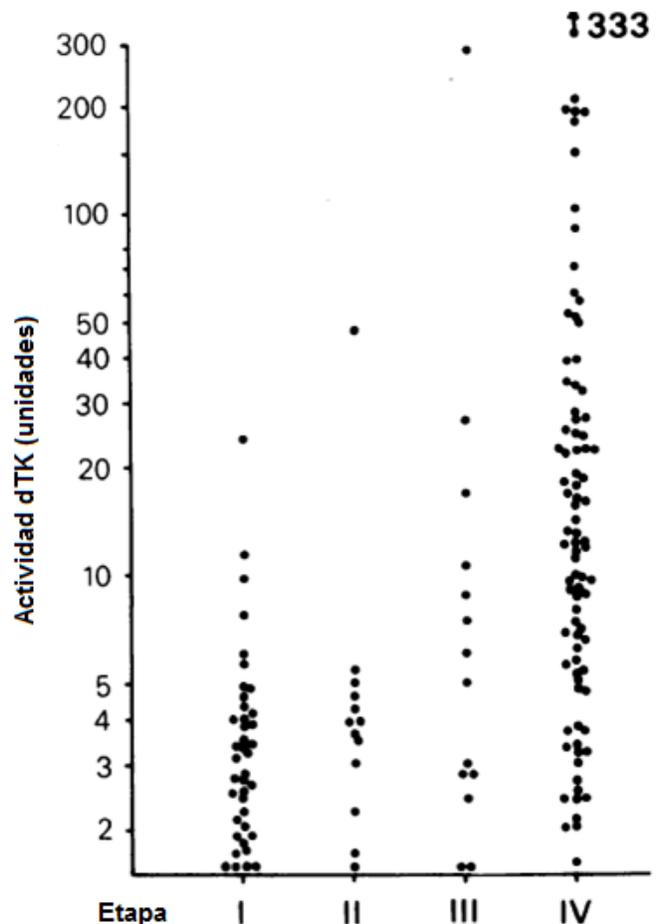
Los pacientes en los estadios I y II fueron irradiados con 40 a 45Gy. Ocho de los pacientes se trataron con ciclofosfamida, vincristina y prednisona. Los 101 pacientes en estadios III y IV fueron tratados de diferente manera: CB, LB e IB fueron aleatoriamente tratados con los mismos tratamientos antes mencionados pero además con doxorubicina o con metotrexano, ciclofosfamida y vincristina.

Los pacientes con D CB-CC, M + D CB-CC, IC y los LC o F CB-CC que tuvieran enfermedad progresiva, fueron tratados con ciclofosfamida, vincristina, prednisona o prednimustine. Durante 6 meses, en cada tratamiento se suspendía o se administraba más tratamiento. Fueron seguidos desde el ingreso hasta la muerte o su finalización del tratamiento.

Los resultados obtenidos fueron muy convincentes; el nivel de TK en suero en el pretratamiento en relación con la etapa de la enfermedad. Para los estadios I y II fue de 4.7 unidades. En los estadios III y IV fue de 32 unidades. La diferencia fue altamente significativa.

Figura 16: TK en suero de 155 pacientes no tratados con linfoma no Hodgkin con el estadio de la enfermedad.

Como se puede observar en la figura 16 los niveles de TK en suero se correlacionaron con la propagación de la enfermedad, es decir; la mayoría de los pacientes en estadios I y II tuvieron valores normales de TK, mientras que en los estadios III y IV los niveles fueron hasta 100 veces mayores a los normales.



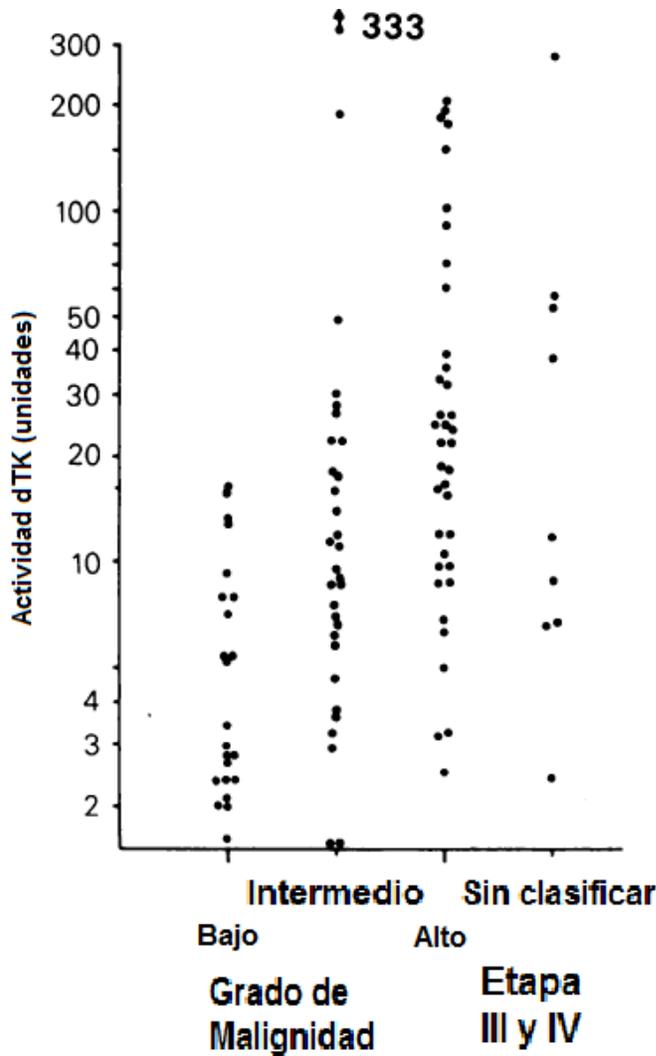


Figura 17: TK en suero de 101 pacientes con LNH tratados, divididos en estadio III-IV de acuerdo al grado de malignidad.

En esta gráfica se muestran los niveles encontrados de TK en pacientes con estadio III y IV distribuidos de acuerdo al grado de malignidad.

Se observa que los resultados se correlacionaron, el nivel de malignidad con un valor promedio de 4.6 unidades para el “grado bajo”, 28.8 u para el “grado medio” y 45.0 u para el “grado alto”

En cuanto a la relación entre el nivel de TK en suero con la recaída de los pacientes en estadio I y II, 8 recibieron quimioterapia, además de la radioterapia local y los restantes 46 solo recibieron la radioterapia local.

En este último grupo 8 pacientes tuvieron >5 unidades de TK en suero, y 6 de ellos recayeron en un año. De los 38 restantes únicamente 8 pacientes tuvieron una recurrencia en el mismo tiempo. Los pacientes que tuvieron niveles altos de TK, 45.4 y 32.3 unidades indicaron una extensión rápida, por lo que se tuvo que revalorar el tratamiento.



Cuadro 10: Los datos clínicos de 19 pacientes con linfoma no Hodgkin que fueron seguidos longitudinalmente, con mediciones seriadas de TK.

Datos clínicos de pacientes con LNH seguidos con mediciones de s-dTK

Paciente	Sexo/Edad	Histología	Etap	Tratamiento inicial	Respuesta a tratamiento inicial	Tratamiento de Recaída
BB	M 36	F + D CB – CC	IV	Esplenectomía		
AJ	F 77	IC	IV	Esplenectomía		
KA	F 31	IB	I	RT	CR	MEV
MO	M 70	IC	II	RT	CR	Prednimustine
HH	M 68	LB	II	RT	CR	CHOP
LJ	F 77	IB	IV	COP	PD	
AM	F 61	D CB – CC	IV	Prednimustine + COP	PD	
AT	F 61	CB	IV	CHOP	PD	
CJ	F 50	CC	IV	COP	PR	
KL	M 71	F CB – CC	IV	COP	PR	
LD	F 55	F CB – CC	IV	Prednimustine	CR	
KE	F 60	CB	IV	CHOP	CR	
LH	F 74	CB	III	MEV	CR	
GT	M 63	IB	IV	MEV	CR	
OE	M 55	CB	IV	MEV + CHOP	PD	
EM	M 62	Unclass.	IV	Prednimustine + COP	PD	
AH	M 36	CB	IV	CHOP	PR	COMLA
EL	F 69	Unclass.	IV	COP	PR	CHOP
GE	M 68	F + D CB – CC	IV	COP	CR	CHOP

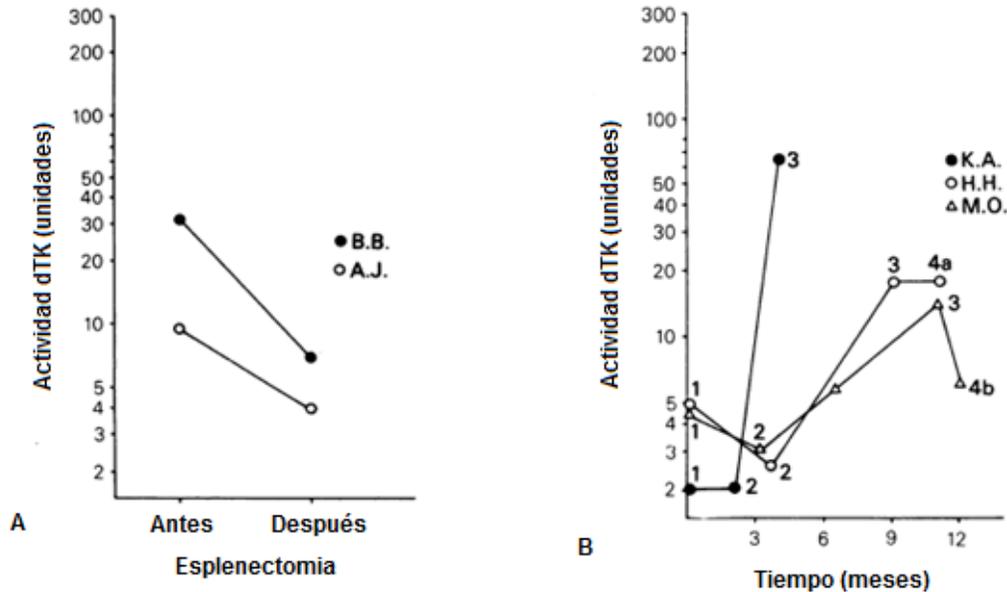
Abreviaturas

COP	<i>Ciclofosfamida, vincristina, prednisona</i>
MEV	<i>= El metotrexato, ciclofosfamida, vincristina</i>
CHOP	<i>= Ciclofosfamida, Adriamycine, vincristina, prednisona</i>
COMLA	<i>= Ciclofosfamida, vincristina, metotrexato con rescate de leucovorina, citarabina</i>
Prednimustine	<i>= A clórambucil éster de prednisona</i>
RT	<i>= Radioterapia</i>
CR	<i>= La remisión completa</i>
PR	<i>= La remisión parcial</i>
SD	<i>= Enfermedad estacionaria</i>
PD	<i>= Enfermedad progresiva</i>
F	<i>= folicular</i>
D	<i>= difusa</i>
CB	<i>= centrocítico</i>
IB	<i>= inmunoblástico</i>
CC	<i>= centroblastico</i>

Los estudios longitudinales en pacientes con linfoma no Hodgkin estuvieron relacionados con el tratamiento y el desarrollo de la enfermedad. Los datos clínicos de los 19 pacientes son; edad, sexo, histología tumoral, estado de admisión, tratamiento inicial y terapia de recaída.



En cuanto a los estudios longitudinales de pacientes tratados con alto o bajo nivel de TK reflejaron la actividad de la enfermedad, es decir durante la regresión del tumor



disminuyeron los títulos de la enzima y aumentaban durante la progresión tumoral.

Figura 18: (A) Actividad de TK en dos pacientes con LNH después de la esplenectomía. (B) Imagen de 3 pacientes con NHL con actividad TK (estadios I y II), y que tuvieron una recaída. 1). Antes de la radioterapia local 2). Después de la radioterapia local 3). En la recaída sistémica 4). Después del primer tratamiento con quimioterapia. M.O respondió al Tx. H.H no tuvo respuesta.

En estas gráficas se muestra que de los 18 pacientes con linfoma no Hodgkin, la de la izquierda mostró la recaída de la TK en suero de dos pacientes después de la esplenectomía, en la gráfica de la derecha mostró a tres pacientes que recibieron quimioterapia durante la recaída, uno de ellos respondió al tratamiento, otro tuvo una recaída sistémica y finalmente el último no respondió al tratamiento.

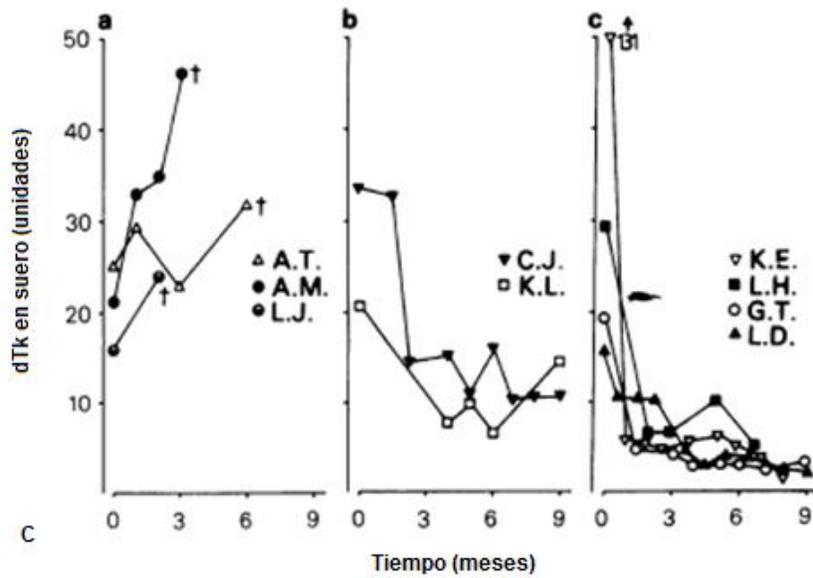


Figura 19: Pacientes con LNH y actividad de TK en suero (a) pacientes con enfermedad progresiva, (b) dos remisión parcial (c) cuatro pacientes tratados con remisión completa

En esta gráfica se observa en la sección a) que se trató de una enfermedad progresiva en la cual los niveles de TK aumentaron. En la parte b) consistió en una remisión parcial donde se observó la disminución de la enzima en suero; y finalmente en la sección c) se trató de una remisión completa donde 4 de ellos bajaron sus niveles de TK.

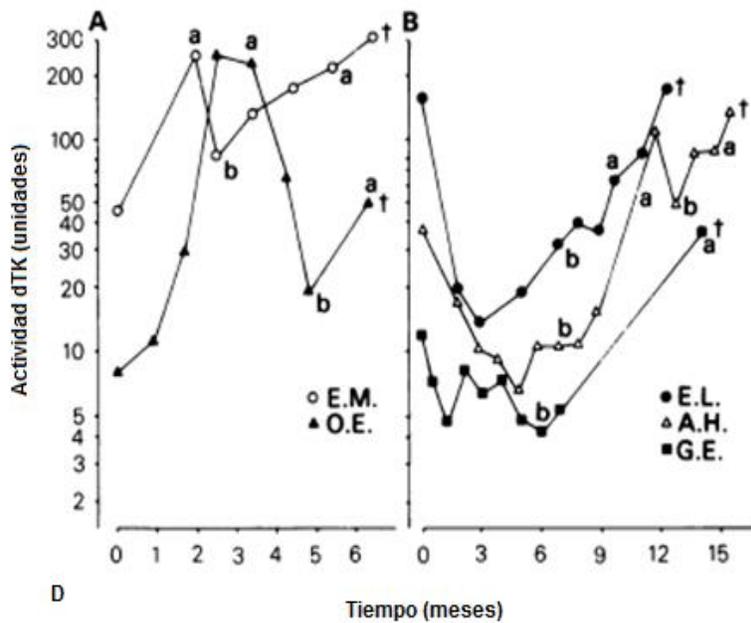




Figura 20: Seguimiento longitudinal de TK en suero de los pacientes, tanto en enfermedad progresiva como en la remisión (A) y (B). (a) y (b) enfermedad progresiva y además remisión.

Finalmente en esta última gráfica la sección A) se refirió a la enfermedad progresiva y la B) a la remisión; la sección a) consistió en ambos procesos tanto progresión de la enfermedad como la remisión.

Dos pacientes con enfermedad progresiva fueron tratados para remisión parcial, pero la enfermedad progreso de nuevo E.M. y O.E. Los otros tres pacientes pertenecientes hasta la remisión, dos de ellos tuvieron remisión parcial E.L. y A.H., y solo uno remisión total G.E. Posteriormente todos tuvieron recaídas, pero solo A.H. respondió a una terapia adicional.

De esta manera pacientes con tratamientos que son resistentes a la enfermedad o que solo respondieron parcialmente tuvieron una elevación persistente de TK en suero; es por ello que la medición previa de TK apoyó en la detección de recaídas.

La utilización de la liberación de TK en suero como un marcador directo comprobó la eficacia terapéutica en estudios anteriores de cultivos celulares.

La enorme variación de la TK en suero encontrado en pacientes con linfoma no Hodgkin teniendo aun el mismo cuadro clínico, el origen de la elevación de TK aun no se conoce pero es muy probable que la enzima se libere en el suero después de la muerte celular o en una fase de proliferación, es por ello que es un acontecimiento raro en los pacientes sanos. Un estudio buscó la correlación entre TK en suero y TK en células, pero los resultados fueron que no existe correlación significativa ya que las muestras de pacientes con LNH tenían tanto alto como bajo niveles de TK en suero como en células, por lo que determinar TK celular no arrojaría información pronóstica para el paciente.

El hallazgo de que los valores de TK celular sean mayores en pacientes con tumores pequeños o medianos que en pacientes con mayor tamaño, probablemente se debe a que los tumores que proliferen más rápidamente se vuelven sintomáticos mucho antes de que proliferen de manera lenta.

Por lo tanto, los altos niveles de TK en suero refleja en gran medida el número de células que han muerto en la proliferación celular, aunque la liberación de TK en la proliferación



en “pacientes sanos” no puede ser del todo excluida²⁹. El aumento de la TK en suero también puede deberse a infecciones con virus o en la anemia perniciosa es por ello que se requiere de otros parámetros longitudinales para poder llegar a un diagnóstico o en tal caso como el del linfoma no Hodgkin la detección de recaídas, el tiempo de vida y la respuesta de los pacientes al tratamiento.

TIMIDINA KINASA EN TUMORES SÓLIDOS

Los Linfomas corresponden a la infiltración por células neoplásicas del tejido linfoide. Los tumores sólidos corresponden a la presencia de una masa sólida formada por células neoplásicas, ubicada en cualquier sitio anatómico y de diferentes tipos histológicos. A los linfomas también se les llama tumores sólidos hematológicos para diferenciarlos de las leucemias.³¹

Algunos ejemplos de tumores incluyen el cáncer de pulmón, vejiga, riñones, colon y tiroides. En los tumores sólidos, como el cáncer de pulmón, hay posibilidades de que el cáncer avance y se disemine en hueso. En el cáncer de pulmón, del 33% al 75% de las recurrencias del cáncer son en los huesos.⁶⁰

CÁNCER DE TIROIDES

El cáncer de tiroides es la malignidad más frecuente de todo el aparato endocrino del cuerpo humano, este representa casi el 2% de todos los tumores malignos que se presentan en el humano.⁵⁴

La clasificación del cáncer de tiroides es la siguiente:

- ⊗ **Cáncer papilar de la tiroides.** Es el tipo más común, constituyendo aproximadamente el 70% al 80% de todos los cánceres de tiroides. El cáncer papilar de la tiroides tiende a crecer lentamente y a extenderse primeramente a los ganglios linfáticos del cuello.
- ⊗ **Cáncer folicular de tiroides.** El cáncer folicular tiene la tendencia a crecer, con más frecuencia que el cáncer papilar, en los vasos sanguíneos y desde ahí



extenderse a áreas distantes, particularmente los pulmones y los huesos. Es más frecuente en adultos mayores.

- Ⓢ **Cáncer medular de tiroides.** Es responsable del 5% al 10% de todos los cánceres de tiroides, suele estar asociado con otros problemas endocrinológicos. El cáncer medular de tiroides es el único cáncer de tiroides que puede ser diagnosticado por pruebas genéticas de las células sanguíneas. En los familiares de una persona afectada, una prueba positiva del protooncogen RET puede conducir al diagnóstico temprano de cáncer medular de tiroides y en consecuencia a cirugía que resultará en su curación
- Ⓢ **Cáncer anaplástico de tiroides.** Es el cáncer de tiroides más avanzado y agresivo, y el que tienen menores probabilidades de responder al tratamiento. Afortunadamente, el cáncer anaplástico de tiroides es raro y se encuentra en menos del 5% de los pacientes con cáncer de tiroides.⁷⁶

El cáncer de tiroides se presenta más frecuentemente en mujeres que en hombres y con mayor predilección entre los 25 y 65 años de edad.

La determinación de Timidina Kinasa en cáncer de tiroides no ha sido documentada, pues no existen suficientes estudios acerca de este tema. Sin embargo un estudio realizado por el departamento de Cirugía Oncológica, centro de oncología, Instituto Memorial Sklodowska-Curie y en la División de cirugía, el Hospital de la Sagrada familia municipal Lodz, Polonia, fundamenta que el incremento de la expresión de ARNm , para tres enzimas; TKI, desoxicitidina Kinasa (dCK) y Timidina fosforilaza (dThdPase) en humanos con carcinoma papilar de tiroides y solo dCK en humanos con carcinoma medular de tiroides esta correlacionada con el aumento de los genes de la enzima o con sus actividades en otros tumores malignos.³⁸

Las expresiones de ARNm para las tres enzimas examinadas fueron significativamente mayores en los tejidos cancerosos en comparación a los tejidos controles. La expresión del ARNm específico para TKI fue significativamente mayor en humanos con carcinoma papilar de tiroides que los controles como se muestra en la siguiente imagen:

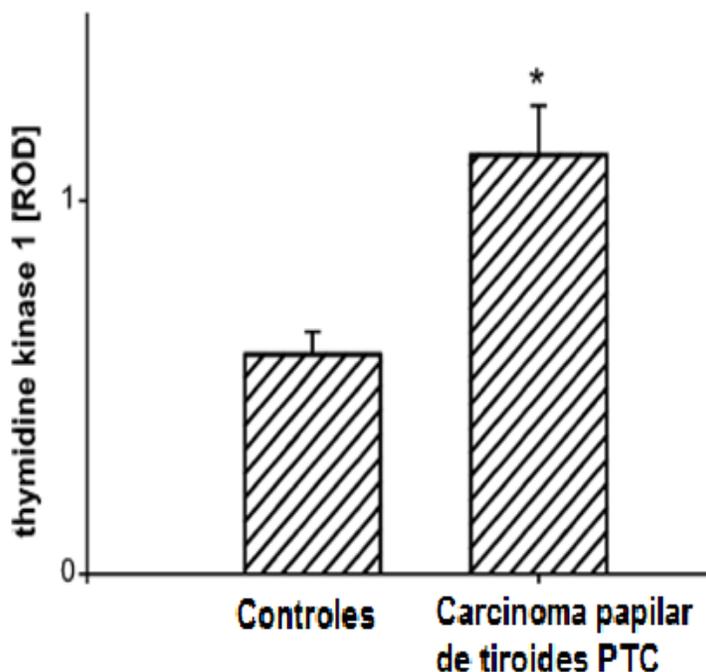


Figura 21: expresión de ARNm de TKI para pacientes con carcinoma papilar tiroideo (PTC)

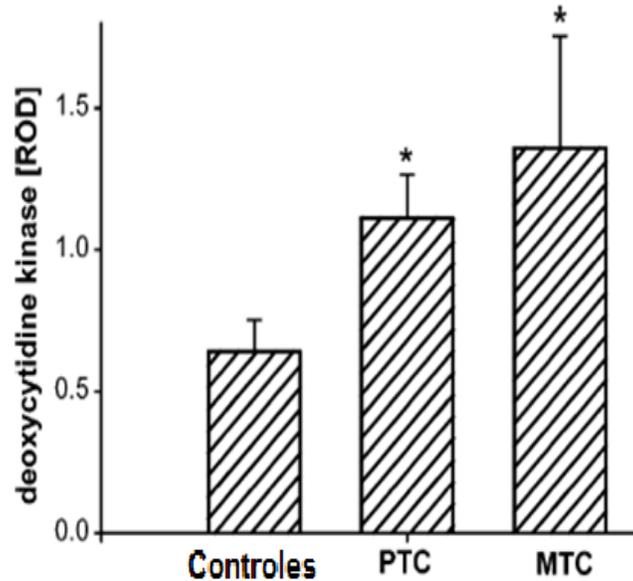
Para realizar este estudio se ocuparon 15 muestras de tejido tiroideo macroscópicamente sin cambios el cual fue el control y 15 muestras de pacientes con carcinoma papilar de tiroides.

La extracción de ARN total fue extraída a partir de tejido de tiroides (100-150ng) en isotiocianato de guanidinio, por medio de un kit comercial [Total RNA Prep Plus (AandA BIOTECHNOLOGY, Gdynia, Poland). Las muestras de tejido se almacenaron a -70°C . Finalmente la purificación y concentración de ARN finales se cuantificaron por espectrofotometría a una absorbancia de 280nm (Ultraspec 2000UV/ Visible Spectrophotometer Pharmacia Biotech, Suecia). Posteriormente se realizó una prueba de PCR transcriptasa reversa.

La expresión de ARNm para desoxicitidina Kinasa (dCK) también mostró la misma tendencia de TKI, tanto en pacientes con papilar de tiroides como pacientes con carcinoma medular de tiroides.



Figura 22: Expresión de ARNm de desoxicitidina (dCK) Kinasa en pacientes con ambos carcinomas de tiroides PTC y MTC



Como se muestra en la figura 22 se puede observar que la expresión de ARN es mayor en los pacientes con carcinoma papilar tiroideo en comparación con el control y aun mayor fue la expresión de ARN de desoxicitidina Kinasa en pacientes con carcinoma medular de tiroides comparado con (PTC) y el control.

Para la realización de este estudio se requirió de 11 muestras de tejido tiroideo macroscópicamente sin cambio que se ocuparon como control, 14 muestras de pacientes con PTC y 5 muestras de pacientes con MTC.

Finalmente la expresión de ARNm para Timidina fosforilasa (dThdPase) tuvo un incremento considerable en pacientes con PTC en comparación con el control.

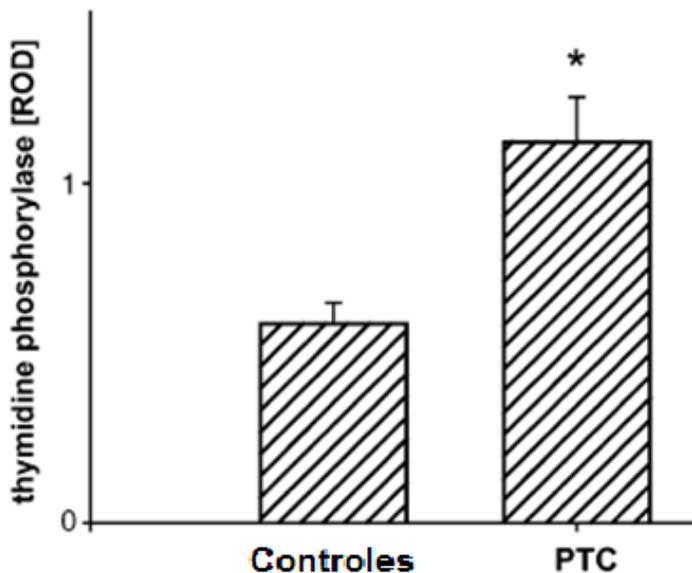


Figura 23: Expresión de ARNm de Timidina fosforilasa (dThdPase) en pacientes con PTC



Para este último estudio se requirió de 7 muestras de tejido tiroideo macroscópicamente sin cambios y 6 muestras de pacientes con carcinoma papilar tiroideo.

Como se observó en las anteriores enzimas, esta última tuvo la misma tendencia. Las tres enzimas mostraron un incremento en la expresión de ARNm en ambos carcinomas. El aumento en la actividad de Timidina Kinasa mostrado en tejido de cáncer de tiroides, también estuvo en menor medida en pacientes con adenomas, bocio nodular no tóxico y enfermedad de Graves describiendo un aumento de 2 a 3 veces la actividad de TKI en el adenocarcinoma de tiroides humano en comparación con el tejido tiroideo normal.⁴⁴

El mecanismo de aumento de ARNm de las expresiones de las enzimas TKI, dCK y dThdPase en el cáncer de tiroides en humanos es complejo, sin embargo el que se asocie con una mayor síntesis de ADN en tejido canceroso tiene un valor crucial. Como ya se estuvo observando en estudios anteriores la determinación de la actividad de Timidina Kinasa en tejidos cancerosos se puede deber como resultado de cambios en el ARNm. Por lo tanto el aumento de ARNm específico para TKI, dCK y dThd se encuentran involucrados en procesos neoplásicos de tiroides humanos, es decir la patogénesis del carcinoma papilar tiroideo y del carcinoma medular tiroideo.

Gracias a este estudio se pueden utilizar estas enzimas como nuevas dianas terapéuticas para fármacos con la finalidad de controlar mejor los niveles de ARNm específico para estas enzimas, además de que el cáncer de tiroides es una indicación de tratamiento quirúrgico radical seguido por tiroidectomía, en ese caso la aplicación de yodo radiactivo u otros tipos de tratamientos pueden ser útiles en esta enfermedad metastásica.



CÁNCER DE MAMA

Es una enfermedad maligna en donde la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células pertenecientes a distintos tejidos de la glándula mamaria forman un tumor que invade los tejidos vecinos y produce metástasis a órganos distantes del cuerpo. Como otros tumores malignos, el cáncer de mama es consecuencia de alteraciones en la estructura y función de los genes. Los carcinomas de mama suponen más de 90% de los tumores malignos

El cáncer de mama es un problema de salud pública mundial. De acuerdo con las estimaciones del año 2002 se presentaron 1,151,298 casos nuevos de cáncer de mama y 410,712 defunciones y más de 4,4 millones de mujeres viven con este tipo de cáncer de mama alrededor del mundo. En México se diagnosticaron 11,656 casos y se presentaron 3,919 muertes en el año 2002 y constituye la primera causa de diagnóstico de carcinoma invasor en la mujer seguido por el cáncer cervicouterino.⁷⁴

La mayoría de los cánceres de mama se detectan en mujeres mayores de 55 a 59 años. La incidencia y la mortalidad por cáncer de mama es mucho mayor en los países occidentales que en los países asiáticos o africanos.

TK1 no es liberado por las células en la división normal, sólo después de la interrupción de la membrana celular, es decir, durante el desarrollo de la proliferación del cáncer. El análisis univariado de pacientes con cáncer de mama, presentó un alto nivel de Timidina Kinasa que a su vez se vio asociado con una menor supervivencia global, y en un análisis multivariado de TK el estado de Timidina Kinasa fue un factor pronóstico independiente de supervivencia libre.¹⁶

Se ha establecido previamente que los niveles de TK en los sueros de pacientes con cáncer de mama demuestran en los estudios clínicos que se correlacionan positivamente con el estadio tumoral. El seguimiento de las muestras de suero en serie también ha demostrado tener un valor pronóstico para predecir la respuesta a la terapia. La medición de los



diferentes niveles de TK es una utilidad principal que ha demostrado ser un predictor de recurrencia tumoral.

A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama sigue siendo una causa muy frecuente de mortalidad por cáncer en mujeres. La realización de exámenes para el cáncer de mama ha reducido su mortalidad, pero incluso los tumores más detectables por la mamografía, la metástasis se presenta con frecuencia. Es por ello que un diagnóstico de cáncer de mama parece reducir significativamente la mortalidad por esta enfermedad.⁵⁰

Existe una correlación estrecha entre el riesgo de tener cáncer de mama y los antecedentes familiares, la edad y el estado reproductivo (menstruación, parto, menopausia). Uno de los principales problemas del manejo del cáncer de mama es que es uno de los tumores más agresivos y por lo tanto más susceptible de repetirse.

La supervivencia y el intervalo libre de la enfermedad están estrechamente relacionados con la etapa del cáncer. Los sistemas de estadificación clínica (como la clasificación TNM y el índice pronóstico de Nottingham) son los sistemas que más se aplican para las predicciones de pronóstico.

Los análisis de los niveles de Timidina Kinasa en el cáncer de mama elevados se correlacionaron directamente con la etapa del cáncer. El aumento de los niveles séricos de TK se encontró relacionado con la edad del paciente. Investigaciones adicionales mostraron que hay diferencia significativa entre los pacientes sin cáncer, los pacientes con cáncer primario y los niveles de TK en pacientes con cáncer de mama avanzado.

En pacientes con terapia hormonal primaria, los niveles de TK disminuyeron significativamente, mientras que los niveles de TK en pacientes que demostraron progresión de cáncer, siguió en aumento. En un estudio reciente en el 2001 se evaluó la actividad de la Timidilato sintasa (TS) que es crucial para el 5-fluorouracilo (5-FU) en la vía de Novo de la síntesis de pirimidina, lo cual es necesario para la síntesis de ADN y Timidina Kinasa que se determinó en 257 tumores de mama primarios en pacientes que



recibieron tamoxifeno como terapia de primera línea sistémica después del diagnóstico de la enfermedad avanzada.

Concluyendo que en pacientes positivos de cáncer de mama que recibieron quimioterapia adyuvante que incluyó 5-FU, el TS sugirió una respuesta favorable de los 13 pacientes con baja actividad de TS en tumor solo el 1% respondió, el 46% con actividad de TS intermedia y el 73% con actividad de TS alta respondieron a la quimioterapia.

Mientras tanto los niveles de Timidina Kinasa pueden ser liberados por el tumor en suero y se ha demostrado que en pacientes con cáncer de mama avanzados que fueron tratados con terapia endocrina, los niveles de TK se redujeron significativamente, mientras que los pacientes que progresaron en la enfermedad, los niveles séricos de TK siguieron aumentando.²⁰

Existen resultados similares importantes para el diagnóstico de TK en cáncer de mama. TKI en suero es mayor en cáncer de mama sistémico que en cáncer de mama primario operable.⁵¹ Se realizó un estudio en donde fueron estudiados los niveles séricos de Timidina Kinasa en 60 pacientes con cáncer de mama primario, y 20 pacientes con cáncer de mama sistémica y un grupo control no cancerígeno pero con trastornos gastrointestinales los cuales fueron 20 pacientes más.

Cuadro 11: Niveles de TK en suero en los diferentes grupos de pacientes con cáncer de mama

Grupo de pacientes	Número de pacientes	Edad media (± s.d.)	Pre-tratamiento media total de TK en suero
Controles	20	49.55 (± 12.05)	4.22 (± 1.08)
Operables	60	50.93 (± 10.25)	6.22 (± 2.24)
Cáncer de mama			
Buen Pronóstico	20	49.50 (± 10.89)	6.32 (± 2.48)
Moderado Pronóstico	20	50.90 (± 10.01)	6.21 (± 1.88)
Mal pronóstico	20	52.40 (± 10.15)	5.95 (± 2.40)
Sistémico cancer de mama	20	59.55 (± 12.14)	9.79 (± 7.56)
Análisis de varianza			P < 0.005



Las concentraciones séricas de Timidina Kinasa se elevaron en pacientes con cáncer de mama en comparación con los controles.

Los 60 pacientes con cáncer de mama operable fueron divididos en tres grupos pronósticos (bueno, regular y malo) basados en el índice pronóstico de Nottingham, con bases de mortalidad anual del 3%, 7% y 30% respectivamente.

Cuadro 12: niveles de TK en subgrupos de cáncer de mama

	<i>n</i>	<i>Edad Media (años)</i>	<i>Media del total de TK en suero (± s.d.)</i>	
Controles	10	57.4	3.87	(± 0.95)
Operable	30	57.1	6.27	(± 2.17)
Cáncer de mama Sistémico	10	56.8	7.92	(± 4.07)
Análisis de varianza		<i>P = 0.9611</i>	<i>P < 0.003</i>	

Los niveles más altos se encontraron en los pacientes con cáncer de mama sistémica que como grupo fueron mayores que los controles y los de cáncer de mama operable.

El análisis de subgrupos teniendo la misma edad, los niveles de TK en suero fueron todavía más elevados que los pacientes de cáncer de mama sistémica.

Este estudio demostró que TK fue significativamente elevada en sueros de pacientes con cáncer de mama en comparación con los controles normales. Los niveles séricos de Timidina Kinasa fueron significativamente mayores en comparación con pacientes con cáncer de mama primario operable. Se intuyó que el factor edad no tuvo nada que ver en la elevación de TK sérico en pacientes con cáncer sistémica; el nivel de TK fue significativamente mayor en pacientes con enfermedad operable en comparación con los grupos controles a pesar de haber tenido una edad similar en ambos grupos.



El análisis los tres subgrupos teniendo la misma edad, el cáncer avanzado mostró que los niveles séricos de TK siguen elevándose de acuerdo a la etapa de la enfermedad por lo que se confirmó que la edad no tuvo ningún efecto en los niveles séricos de Timidina Kinasa.

Timidina Kinasa tuvo una alta sensibilidad la cual se usó como herramienta de diagnóstico principal. También presentó una alta sensibilidad durante el periodo de seguimiento de cáncer de mama, para la predicción de la recaída en el momento del diagnóstico primario y además en la recaída.⁵⁹

Los niveles séricos de Timidina Kinasa se midieron en 732 pacientes con tumores sólidos. Las muestras fueron tomadas una vez por la mañana de la vena cubital y se almacenaron a -20°C. Los pacientes con cáncer de mama fueron monitoreados de manera sistemática durante el periodo de seguimiento de 3 a 5 meses. La importancia predictiva de TK se evaluó de forma retrospectiva en 68 pacientes con cáncer de mama con la progresión de la enfermedad. Se evaluó de forma retrospectiva la sensibilidad para el diagnóstico de la progresión antes de las manifestaciones clínicas.

Cuadro 13: niveles de TK en diferentes tumores sólidos

TK	Cáncer de mama N=300	Cáncer correctal N=300	Cáncer de pulmón (NSCLC) N=35	Cáncer de cuello uterino N=97
Mediana (IU/L)	13	8	9	14
Serie (IU/L)	4.8-56	3.2-24	4.5-19	6-22
Sensibilidad (%)	35	18	23	48



Cuadro 14: TK sérica y 95% de sensibilidad de progresión predictiva antes de los signos clínicos

Niveles de TK en suero de acuerdo al tiempo de progresión en el cáncer de mama

TK	Meses			
	9	6	3	0
Mediana (IU/L)	4.3	11	18	24
Serie (IU/L)	2-11	4-23	5-24	17-46
Sensibilidad (%)	5	34	47	69

En el cuadro 13 describe los valores preoperatorios de los diferentes tumores sólidos, además de las evaluaciones individuales antes de la operación de TK así como su vigilancia sistemática que se llevó a cabo durante un periodo de seguimiento. En el cuadro 14 solo muestra los valores y la sensibilidad para la predicción de la progresión a los 9, 6, 3 y 0 meses antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad del cáncer de mama.

Se describe la correlación que hubo entre los niveles de TK y el estadio de la enfermedad en el cáncer de mama. Demostró la importancia de la evaluación de TK durante el periodo de seguimiento. Finalmente se concluyó que este marcador se correlacionó bien con la gravedad de la enfermedad. Se trató de un marcador de tumor difícil de predicción para el seguimiento de la evolución de la enfermedad. TK permitió la predicción de una recaída de la enfermedad por lo menos 3 meses antes de su manifestación clínica, en algunos casos hasta 6 o 9 meses antes. Esto pareció ser una ventaja a pesar de que este marcador ofrece una especificidad en órganos muy bajas, en contraste con otros marcadores tumorales, éste parece ser un marcador de proliferación celular tradicional. En los carcinomas de mama, los niveles altos de TK se han observado y se han vinculado principalmente a la síntesis de la isoenzima TKI. Al igual que Timidina Kinasa, la fracción S de fase (SPF) obtenidos a partir de DNA de los histogramas es una referencia para el análisis de la cinética celular. Varios estudios han demostrado que el SPF es un parámetro pronóstico independiente en la etapa del cáncer de mama.⁵⁶



CÁNCER DE PULMÓN

Según la clasificación de la OMS de 2004, el cáncer de pulmón (CP) agrupa a todos los tumores primitivos epiteliales malignos de pulmón excluyendo tumores pleomórficos, sarcomatoides, carcinoides y los derivados de glándula salivar. Es la neoplasia más frecuente y con mayor mortalidad en ambos sexos en los países desarrollados. Su pronóstico global es malo con una supervivencia total a los 5 años del 15 %.

El carcinoma de células no pequeñas de pulmón (CNCP) supone el 80-85 % de los CP incluye fundamentalmente, los siguientes tipos histológicos: epidermoide, adenocarcinoma y de células grandes. A su presentación sólo el 25% son estadios localizados, y un 35% son estadios localmente avanzados (estadio III o IV). Aproximadamente el 80% de los pacientes con CNCP presentan enfermedad metastásica en alguna de sus fases evolutivas: 30-40 % al diagnóstico, 50 % por recidiva de los estadios I-II y 80 % por progresión o recaída de los estadios III, y su supervivencia es muy pobre.

El carcinoma de células pequeñas de pulmón (CCP) constituye aproximadamente el 15-20% de las neoplasias pulmonares. Aproximadamente el 60-70 % de los pacientes tienen enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico.⁸⁰

Con la finalidad de saber si Timidina Kinasa es un buen indicador de malignidad en cáncer de pulmón se realizó un estudio con 24 pacientes con tumores malignos de pulmón; todos los casos fueron diagnosticados histopatológicamente como tumor primario de pulmón, y consta de 14 carcinomas, 8 carcinomas de células escamosas, un carcinoma de células grandes y un leiomioma.

La actividad enzimática se midió por el método modificado de Breitman y se expresó como pmol/mg proteína/ h y se realizaron mediciones por triplicado. La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Lowry.

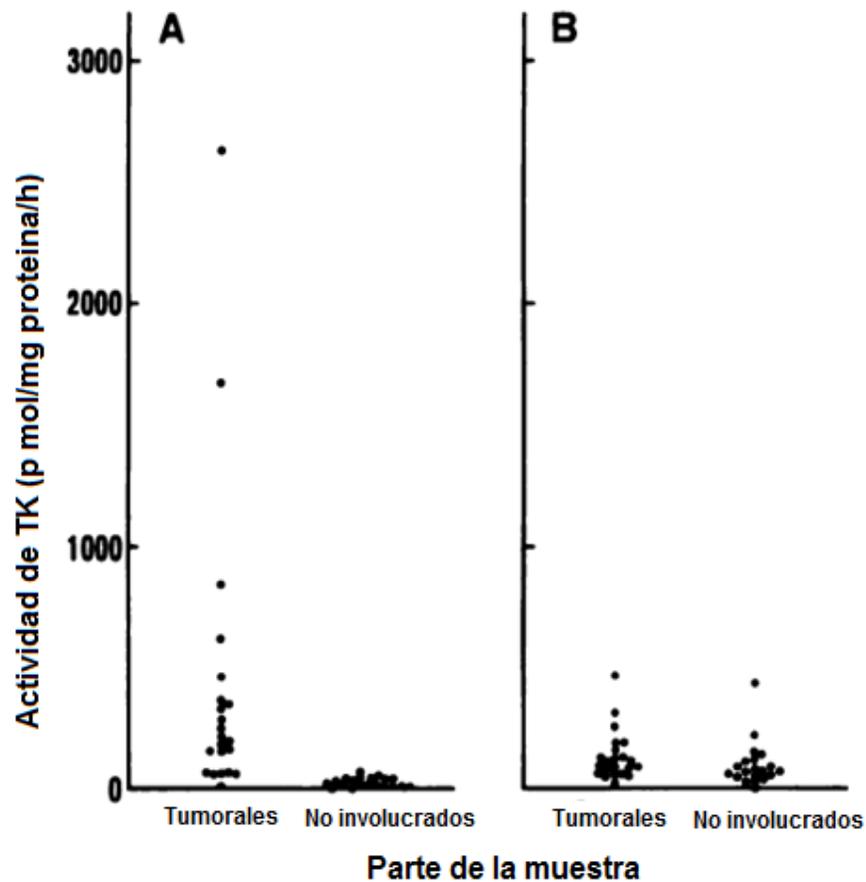


Figura 24: Actividad de TK citoplasmática (A) y mitocondrial (B) en muestras tumorales y no tumorales

Como se puede ver en las gráficas (figura 24) la actividad de TKI o citoplasmática varió de 0 a 2640 pmol/ mg proteína/h en las muestras de 24 ejemplares tumorales de pulmón. Sin embargo la actividad de TKII o mitocondrial fue bastante constante con un valor relativamente menor con un promedio de $135,1 \pm 21,1$ pmol/ mg proteína/ h.

Para la actividad de TK citoplasmática los niveles fueron muy variados pero más altos que los controles. No se observaron diferencias significativas en la actividad de la enzima TK mitocondrial. Estas observaciones pareció indicar que la actividad de Timidina Kínasa citoplasmática reflejó las propiedades malignas del tumor de pulmón y no la actividad de la TK mitocondrial.

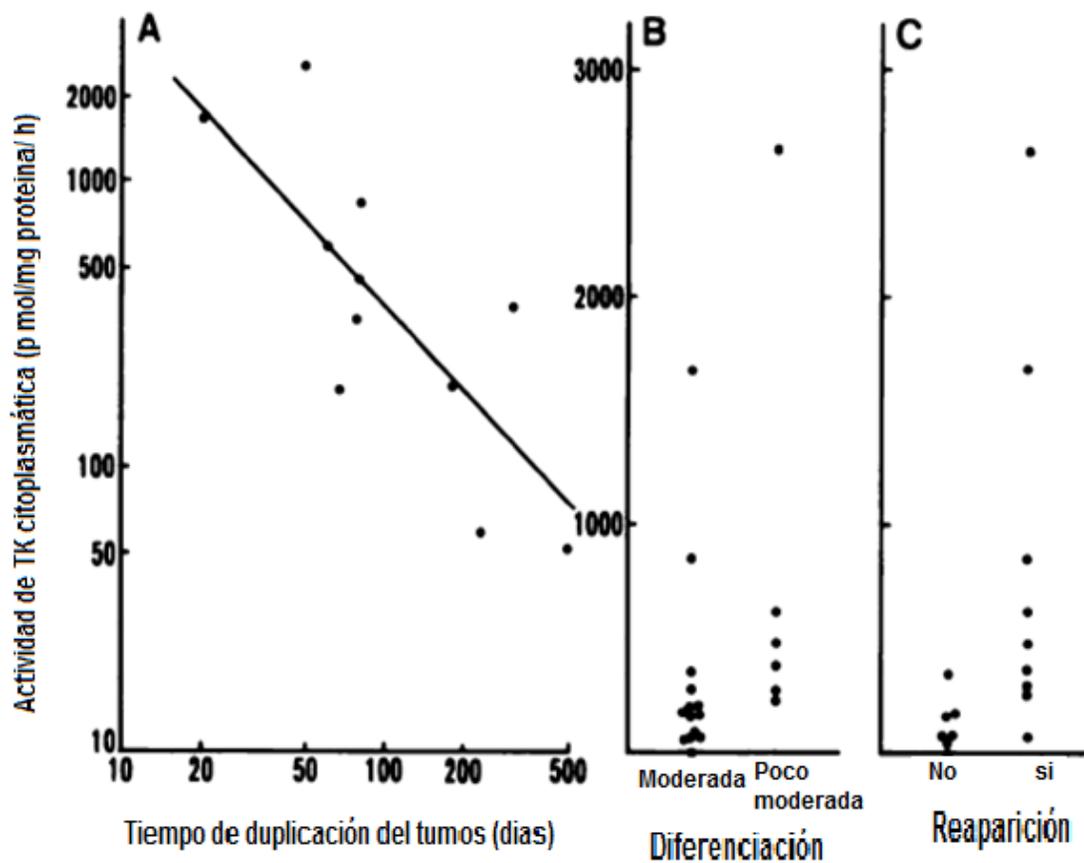


Figura 25: Actividad de TKI en zonas tumorales de acuerdo a características clínico-patológicas clasificadas en tres grupos; (A) tiempo de duplicación tumoral, (B) grado de diferenciación de muestras de adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas. (C) recurrencia de tumor.

Como se muestra en las gráficas (figura 25) existió diferencia significativa de actividad elevada de TKI en los casos de rápido crecimiento o duplicación tumoral, grado de diferenciación o recurrencia del tumor. Esto significó que la actividad de Timidina Kinasa citoplasmática pudo servir como un parámetro adicional útil para estimar el grado de malignidad de tumor de pulmón humano y también para que se pudiera predecir la posibilidad de recurrencia del tumor después de la resección.

El desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico nos serviría para la identificación del cáncer de pulmón. Recientemente se determinan varias moléculas en el suero que son útiles como marcadores de la enfermedad que incluyen: la cromogranina A (CgA), pro-peptido



liberador de gastrina (ProGRP) y enolasa neuronal específica (NSE). Los marcadores tumorales tienen gran importancia en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de pulmón.⁶²

La cromogranina A es una proteína que se encuentra presente en tejidos neuroendocrinos, sirve como marcador en circulación de neoplasias de origen neuroendocrino. La liberación de esta enzima secretora en el suero de pacientes que sufren cáncer de pulmón de células pequeñas es adecuada por su determinación diagnóstica. La CgA es un marcador útil en suero y tejido de tumores neuroendocrinos, incluyendo feocromocitomas, neuroblastomas, carcinoides, y carcinoma de tiroides; la concentración de CgA está aumentada en pacientes con adenomas no secretores y en algunos adenomas hipofisarios secretores. Se ha demostrado que el ensayo de CgA no se ve afectado por la hemólisis por lo que es confiable en el diagnóstico de cáncer de pulmón. Informes recientes muestran la expresión de determinados marcadores neuroendocrinos como la CgA que confirma el origen neuroendocrino de la (CCP) ya que también se encuentra contenida en dos citoquinas antineoplásicas; IL-2 y IL-12 en el momento del diagnóstico puede presentar un factor pronóstico de supervivencia en CCP.⁶⁶

El péptido liberador de gastrina (GRP) es una hormona de estómago que se encuentra presente en las fibras nerviosas, cerebro y células neuroendocrinas en el pulmón fetal, pero a pesar de los elevados niveles en plasma en los pacientes que sufren CCP su uso regular como marcador de diagnósticos no es preferido debido a su naturaleza inestable. Diversos estudios han demostrado que ProGRP es superior a la de los otros marcadores debido a su capacidad para diferenciar entre CCP y CNCP. En cuanto a la NSE, el ensayo cuenta con solo el 57% de sensibilidad por lo que es muy limitado en la enfermedad.

La disponibilidad de marcadores tumorales como CgA, GRP y proGRP son determinantes en la enfermedad CNCP ya que puede mejorar el pronóstico general. Sin embargo estos marcadores no prometen una detección temprana, por lo tanto una prueba de diagnóstico precoz de CNCP salvaría muchas vidas de pacientes que sufren esta enfermedad devastadora.



CÁNCER DE OVARIO

El cáncer ovárico es aquel que se origina en los ovarios⁷⁵. El cáncer ovárico, cuya causa se desconoce, es el quinto cáncer más común entre las mujeres y provoca más muertes que cualquier otro cáncer del aparato reproductor.⁷⁷

Los tumores ováricos se denominan según el tipo de células de las que se originó el tumor, y si el tumor es benigno o canceroso. Existen tres tipos principales de tumores ováricos: tumores de células germinales que se originan a partir de las células que producen los óvulos; tumores estromales que se originan en las células del tejido conectivo que sostienen el ovario; y tumores epiteliales que se originan de las células que cubren la superficie externa del ovario.⁵⁷

En Estados Unidos, el cáncer de ovario representa la primera causa de muerte por cáncer ginecológico y es la cuarta por cáncer en las mujeres. En 2004 se reportaron 25,580 casos nuevos y 16,090 decesos. A este respecto, México ocupa el quinto lugar de las neoplasias en la población femenina, con 2,681 casos nuevos, según el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas 2002 y causó 1,334 fallecimientos.⁵

Para el cáncer de ovario el valor de Timidina Kinasa en suero aún no está estudiado ampliamente. Sin embargo se ha realizado en el año de 1997 un estudio que determinó los niveles de TK en suero de 14 pacientes con cáncer de ovario avanzado, debido a fluctuaciones diurnas en los niveles de TK en suero se realizaron determinaciones repetidas en un lapso de 48 horas. Todos los pacientes tenían la enfermedad activa y tuvieron que ser hospitalizados para recibir quimioterapia.

Las muestras de sangre se obtuvieron cada 4 horas en un lapso de 24 a 48 horas. La hora de inicio de muestreo de sangre varió para cada paciente, pero para el periodo de estudio debía de ser de al menos 24 horas. Durante el estudio ninguno de los pacientes recibió radioterapia y quimioterapia.⁶⁸

Para comprobar la relevancia de Timidina Kinasa en suero en este estudio se comparó con un marcador establecido en pacientes con cáncer de ovario llamado CA-125.



El CA-125 es una glucoproteína de alto peso molecular que se encuentra altamente expresada en la superficie celular del epitelio celómico durante el desarrollo embrionario y en las células epiteliales de muchas malignidades ováricas.⁹⁴

Las concentraciones elevadas en suero de CA-125 se encuentran en el 80% de las mujeres con carcinoma de ovario, el 26% en mujeres con tumores ováricos benignos y el 66% en pacientes con condiciones no neoplásicas incluyendo estados como el primer trimestre del embarazo, menstruación, endometriosis, adenomiosis, fibrosis uterina, enfermedades hepáticas entre otras. El suero de CA-125 se determinó por EIA (Abbott Diagnostic, Rungis Francia). Su valor normal es de 35U/ml. La prueba de TK se llevó a cabo mediante el ensayo Prolifigen® (Byk-Sangtec Dreieich, Germany).

Nº de paciente	CA 125					TK				
	Valor máximo (U/ml)	Por valores (U/ml)	Tiempo máximo (h)	Máximo canal de diferencia (U/ml)	Máximo canal de diferencia (%) [*]	Valor máximo (U/l)	Por valores (U/l)	Tiempo máximo (h)	Máximo canal de diferencia (U/l)	Máximo canal de diferencia (%) [*]
1	284	209	12:00	75	36	13.0	5.0	20:00	8.0	160
2	260	211	16:00	49	23	12.0	5.4	16:00	6.6	122
3	20	10	04:00	10	100	5.1	4.4	20:00	0.7	16
4	49	38	20:00	11	29	5.0	3.7	08:00	1.3	35
5	31	27	10:00	4	15	6.6	5.0	18:00	1.6	32
6	44	35	00:00	9	26	3.6	2.6	00:00	1.0	39
7	104	83	10:00	21	25	2.0	1.9	14:00	0.1	5
8	11	6	06:00	5	83	3.3	2.9	06:00	0.4	14
9	152	99	10:00	53	54	3.8	1.9	10:00	1.9	100
10	27	14	16:00	13	93	7.0	1.9	02:00	1.9	100
11	61	50	20:00	11	22	6.6	5.1	16:00	5.1	268
12	259	226	14:00	37	15	9.7	7.0	00:00	1.5	29
13	242	175	04:00	67	38	7.0	4.4	14:00	2.7	39
14	140	120	14:00	20	17	7.0	4.4	16:00	2.6	60
14	140	120	14:00	20	17	14.0	5.5	10:00	8.5	155
Control subject										
1						4.1	3.2		0.9	28
2						2.5	2.0		0.5	25
3						4.2	3.7		0.5	14
4						2.9	2.3		0.6	26
5						3.3	2.7		0.6	18

*100 × (peak-trough)/trough.

el tiempo se da como la hora local en horas: minutos

Figura 26: Valores extremos y diferencias de pico en suero de CA-125 y TK en pacientes con cáncer de ovario y cinco pacientes control.



El límite superior normal para Timidina Kinasa en suero de acuerdo a la literatura es 5U/L. Los valores controles de TK en suero se determinaron en 22 adultos jóvenes sanos (10:00am) obteniéndose un valor de $3.8 \pm 0.9U/L$. Para el estudio se consideró $\leq 4.7U/L$ como nivel normal. El límite de determinación más bajo fue de 1.85U/L. Se encontró que los niveles séricos de TK estuvieron elevados en pacientes con cáncer de ovario y se correlacionaron con los niveles de CA-125 en suero

Como se observa en la figura 26 se determinaron varias veces los niveles séricos de TK y CA-125 durante 24 a 48 horas. Durante el periodo 10 pacientes presentaron niveles elevados tanto de TK como de CA-125 en suero. Tres de los pacientes (n° 6, 7 y 9) obtuvieron niveles normales de TK sobre la observación periódica pero se presentaron niveles elevados de CA-125. Otros tres de los pacientes (n° 3,5 y 10) obtuvieron niveles de CA-125 normales pero niveles altos de TK en suero. En el paciente numero 8 tanto en CA-125 como en TK los niveles en suero fueron normales durante todo el estudio. Los restantes 7 pacientes obtuvieron por lo menos una elevación de los parámetros durante el estudio.

Los estudios mostraron una correlación entre estos dos parámetros, indicando la asociación de niveles altos de CA-125 con niveles altos de TK en la mayoría de los pacientes. Los niveles séricos de Timidina Kinasa mostraron un considerable cambio diurno en pacientes con cáncer de ovario. Los perfiles diurnos de cada uno de los pacientes no mostraron un patrón común; por el contrario se encontraron fuertes diferencias. La comparación de estos intercambios a corto plazo de TK en suero en pacientes sanos mostró niveles por debajo de 4.7U/L (imagen 37, C).

En contraste con los pacientes con cáncer de ovario mostró niveles de TK en suero muy variado en un lapso de 24 horas. Por lo que se tuvieron que separar en dos grupos. El primer grupo (imagen 37, A) obtuvo valores de TK de máximo de 5U/L y el segundo grupo (imagen 37, B) obtuvo valores de TK de hasta 14U/L.

Los valores medios de todos los pacientes en diferentes horas del reloj no se encontraron variaciones circadianas estadísticamente significativas (datos no mostrados) detectados por análisis ANOVA y del mismo modo se obtuvieron resultados similares con CA-125 que tampoco mostraron una variación circadiana significativa

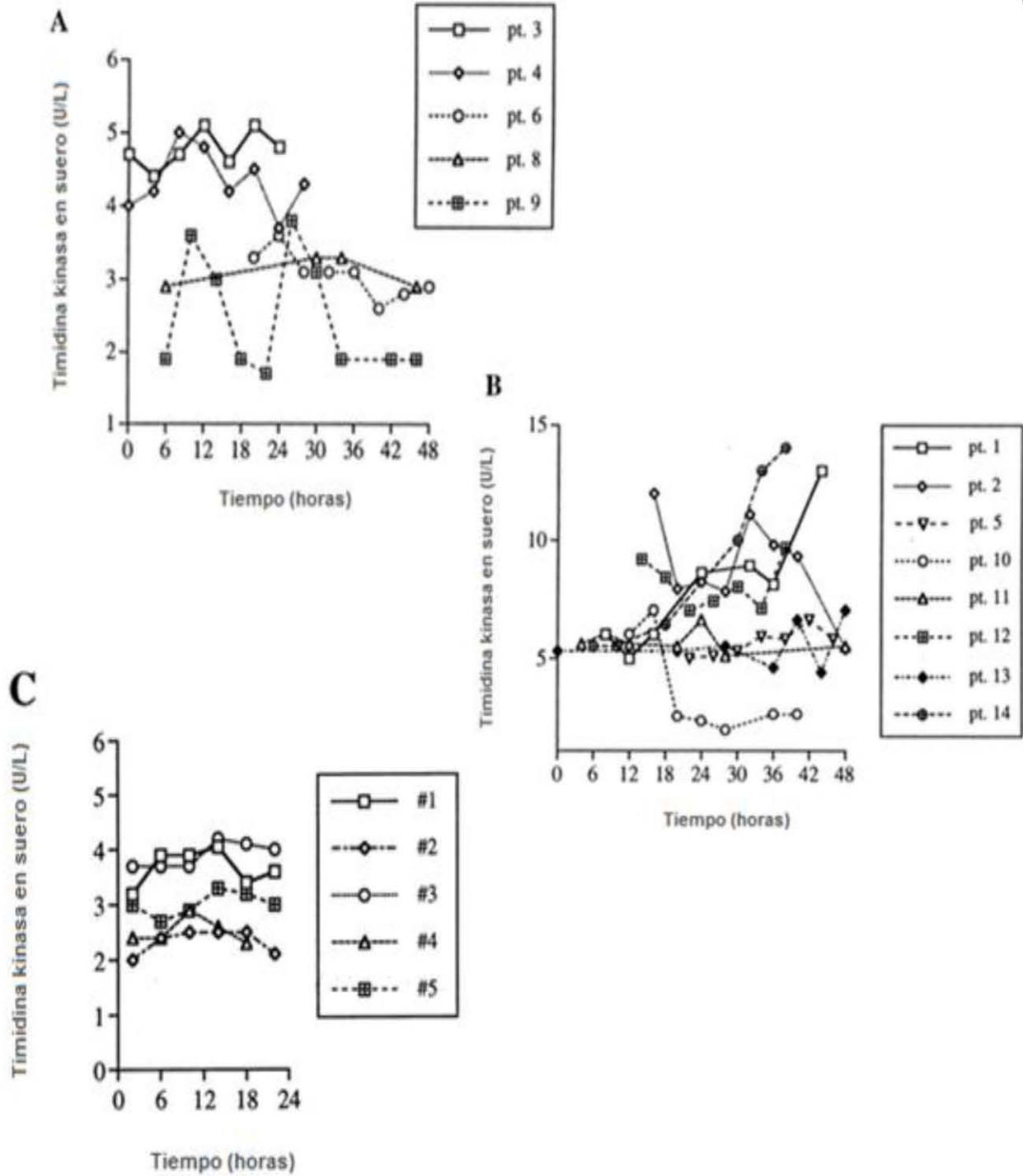


Figura 27: (A) cinco pacientes con cáncer de ovario con niveles de TK en suero por debajo de 6U/L. (B) 8 pacientes con niveles de TK de hasta 14U/L y (C) cinco testigos sanos.



Timidina Kinasa es un marcador tumoral que parece reflejar la actividad proliferativa de los tejidos malignos. El estudio mostró que los niveles de TK en suero en pacientes con cáncer de ovario se pudieron elevar en la mayoría de los casos.

Debido al número limitado de pacientes estudiados no se puede concluir la relación entre TK en suero y el estadio de la enfermedad, los tratamientos previos y otros factores pronósticos. El marcador CA-125 se elevó en 10 casos de 14. Las determinaciones de Timidina Kinasa y CA-125 pudieron ser complementarias ya que los niveles séricos de TK se elevaron en algunos pacientes con nivel normal de CA-125 y viceversa.

En los pacientes individuales las determinaciones de niveles de TK en suero mostraron variaciones diurnas sin pruebas de ningún tipo de periodicidad regular. El estudio confirmó que los perfiles diurnos de los niveles de los marcadores tumorales en pacientes con cáncer de ovario no siguió un ritmo circadiano normal, ya que tendió a ser irregular.

Con este estudio se podrían seguir investigando la relación entre los niveles de TK en suero y la malignidad del tumor independientemente de las variaciones diurnas.



TIMIDINA KINASA Y LOS MEDICAMENTOS

Timidina Kinasa como se ha venido mencionando, contiene dos isoenzimas TKI citoplasmática, TKII mitocondrial y por último TK viral en esta última se incluyen a una superfamilia que la contiene: Timidina Kinasa del virus del herpes y algunos vertebrados, bacterias, bacteriófago T4, virus de la viruela y el virus de la peste porcina africana (VPPA).⁴

TK se utiliza como marcador de proliferación celular en diversas neoplasias, sin embargo TK también tiene la utilidad de servir como gen suicida junto con el Ganciclovir en el tratamiento contra el cáncer.

GANCICLOVIR

Es un análogo sintético de la 2'-desoxiguanosina que primero debe ser fosforilada a trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), un sustrato que inhibe competitivamente la incorporación de dGTP por la DNA polimerasa viral que resulta de la terminación de elongación del DNA viral.

Es de 10 a 50 veces más potente contra la infección por citomegalovirus (CMV) que el aciclovir, aunque los dos fármacos (in vitro) tienen una potencia similar contra las especies de herpes (HSV-1, HSV-2). También es eficaz en el tratamiento del virus de Epstein-Barr (VEB) que está implicado en el desarrollo de la enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (PTLD).

El proceso de fosforilación del ganciclovir se inicia por una quinasa codificada por el gen UL97 y es completado por quinasa celulares. La resistencia a los medicamentos puede estar relacionado con la selección de cepas mutantes con el gen alterado UL96 o una DNA polimerasa con baja afinidad por el ganciclovir fosforilado.⁸⁵



TERAPIA GÉNICA

Esta es una técnica innovadora que implica la incorporación de material genético exógeno (natural o recombinante) humano o no, con el fin de lograr modificar una expresión fenotípica con objetivos terapéuticos o como la transferencia de material genético a células de un individuo, dando como resultado el beneficio terapéutico del mismo.

Para poder realizar este proceso es necesario identificar cual es el gen o los genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad, para así intentar modificar la expresión del mismo.

La incorporación del material genético exógeno es una de las principales, dificultades existentes al llevar la terapia génica a la práctica. Existen diferentes mecanismos por los cuales se puede incorporar el material genético exógeno al paciente, a través de técnicas *ex vivo* o *in vivo*.

La terapia *ex vivo* consiste en la incorporación del material genético sobre un grupo de células que son extraídas y modificadas, para luego ser incorporadas al paciente. La terapia *in vivo* consiste en la incorporación del material genético directamente sobre las células del paciente.

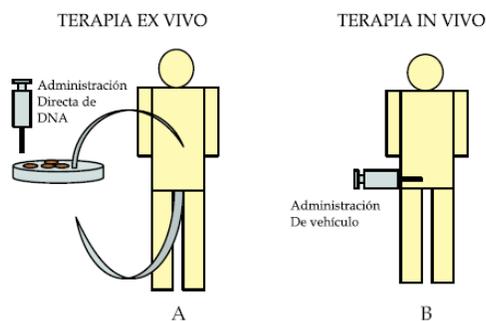


Figura 28: terapia *ex vivo* e *in vivo*

En la terapia génica *ex vivo* las células de interés son extraídas mediante técnicas de laboratorio con el fin de incorporar el gen de interés de manera directa sobre un grupo de células en cultivo. Una vez son modificadas estas células, se introducen nuevamente en el paciente (A). En la terapia *in vivo* el gen de interés es introducido mediante un vehículo o vector para así lograr la transfección de la célula afectada (B).



Los vectores son los vehículos por los que se transfiere el material genético, utilizados más frecuentemente, en la terapia génica *in vivo*. Existen diferentes tipos de vectores los cuales podemos clasificar como: virales o no virales.

Los vectores no virales, pueden ser clasificados en específicos y no específicos. Entre los específicos se encuentran los inmunoliposomas y los mediados por receptores. Los no específicos tienen grandes desventajas frente a sus homólogos específicos, siendo actualmente empleados solamente en técnicas *ex vivo* o *in vivo*, si el tejido a tratar es de fácil acceso, encontrando en este grupo el DNA desnudo y los complejos DNA-liposomas.

Los vectores virales son actualmente los más usados en terapia *in vivo* por su alta tasa de transfección, comparada con los no virales. Estos se pueden dividir a su vez en: Adenovirus, Retrovirus y Virus adenoasociados, los cuales tienen características diferentes entre sí y que son tenidas en cuenta en el momento de seleccionar un tipo en particular de terapia génica.

Existen diferentes opciones de terapia génica. En el caso particular de las enfermedades monogénicas la corrección de la alteración se logra mediante la incorporación del gen afectado. En enfermedades como el cáncer en donde son varios los genes alterados, por disminución o sobre expresión, la selección del gen o los genes blancos es más compleja.⁶⁵

Estrategias en terapia génica del cáncer

En el cáncer, no se trata de corregir un defecto genético como ocurre en las enfermedades monogénicas, sino de utilizar la manipulación génica para dotar de una nueva propiedad a las células, que permite aprovecharlas en algún aspecto de la patología oncológica con fines terapéuticos.

En la actualidad, se han desarrollado distintas estrategias en terapia génica del cáncer, y se están realizando diversos ensayos clínicos para tratar diferentes tipos de cáncer: de mama, ovario, cabeza y cuello, pulmón, próstata, células renales, tumor cerebral, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas, melanoma, mieloma múltiple y neuroblastoma.⁹⁹



Existen diferentes estrategias aplicadas en los ensayos clínicos realizados en terapia génica del cáncer:

- ⊕ Aumentar la actividad antitumoral de células inmunes por medio de citoquinas (interleucinas, factores de necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias o interferones).
- ⊕ Aumentar la inmunogenicidad del tumor introduciendo antígenos foráneos (“vacunas tumorales”).
- ⊕ Introducir un gen “suicida” o de sensibilidad aumentada a determinados fármacos. Se transduce el gen de una enzima (Timidina Kinasa) que activa selectivamente un profármaco (aciclovir) o ganciclovir.
- ⊕ Bloquear la expresión de oncogenes mediante terapia anti sentido.
- ⊕ Introducir genes supresores de tumores (p53).
- ⊕ Eliminación de las células tumorales mediante adenovirus oncolíticos.
- ⊕ Transferencia de genes con efecto antiangiogénico, para inhibir la formación de vasos sanguíneos inducidos por el propio tumor.
- ⊕ Introducir genes de resistencia a fármacos para reducir la toxicidad de la quimioterapia, particularmente sobre la médula ósea.

De las estrategias que se mencionaron la que es de mayor interés en esta tesis es la introducción del gen “suicida” o de sensibilidad aumentada a determinados fármacos en donde se transduce el gen de la enzima Timidina Kinasa que activa selectivamente al aciclovir o ganciclovir.

Se hizo referencia a algunos de los estudios donde se ocupó esta estrategia con la utilización de la Timidina Kinasa en diferentes neoplasias. Se mencionó la utilidad que tiene el virus Herpes simple y porque se utilizó en la terapia génica.



VIRUS HERPES SIMPLE

Los virus herpes poseen varias propiedades biológicas interesantes, incluyendo la capacidad de causar una variedad de infecciones clínicas, permanecer latentes en tejidos específicos y de ser reactivados en el sitio de infección original. Hay más de 80 miembros de la familia herpes virus que incluyen el virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1), tipo 2 (VHS-2) y varicela-zóster. La mayoría de los vectores para terapia génica han sido desarrollados de cadenas de VHS-1. Este es un virus encapsulado de doble cadena de ADN con un genoma de 152 Kb que codifica para más de 80 genes.

Una de las propiedades de estos virus que los hace útiles para la terapia génica es la expresión de la enzima Timidina Kinasa (TK). Esta enzima monofosforila a la prodroga ganciclovir (GCV), que luego continua siendo monofosforilada por las enzimas celulares a GCV trifosfato, el metabolito activo que inhibe la síntesis de ADN. El GCV es una prodroga no tóxica para las células de los mamíferos, a menos que estas expresen al gen TK del VHS-1.

La transfección de genes "suicidas" VHS1-TK dentro de las células tumorales seguido por el tratamiento con esta prodroga, es otra de las estrategias usadas para el tratamiento de tumores endocrinos.

El VHS-1 expresa a la enzima TK durante su ciclo replicativo y permite la actividad antitumoral tras la adición de GCV. Esta terapia "suicida" tiene otra característica que la convierte en una opción interesante al momento de elegir un vector y es el hecho del denominado "efecto espectador" (*bystander effect*), por el cual aún las células tumorales vecinas que no fueron transfectadas con el virus mueren tras la administración del GCV.

La exposición a esta droga, luego de la transducción celular con el gen VHS1-TK resulta en la monofosforilación en células que expresan el gen viral. En contraste, la TK endógena no fosforila al GCV. La exposición de las células huésped a esta droga conduce a su muerte y el transporte de los metabolitos tóxicos de la prodroga a través de las uniones estrechas, resulta en la muerte de células adyacentes mediada por el "efecto espectador".

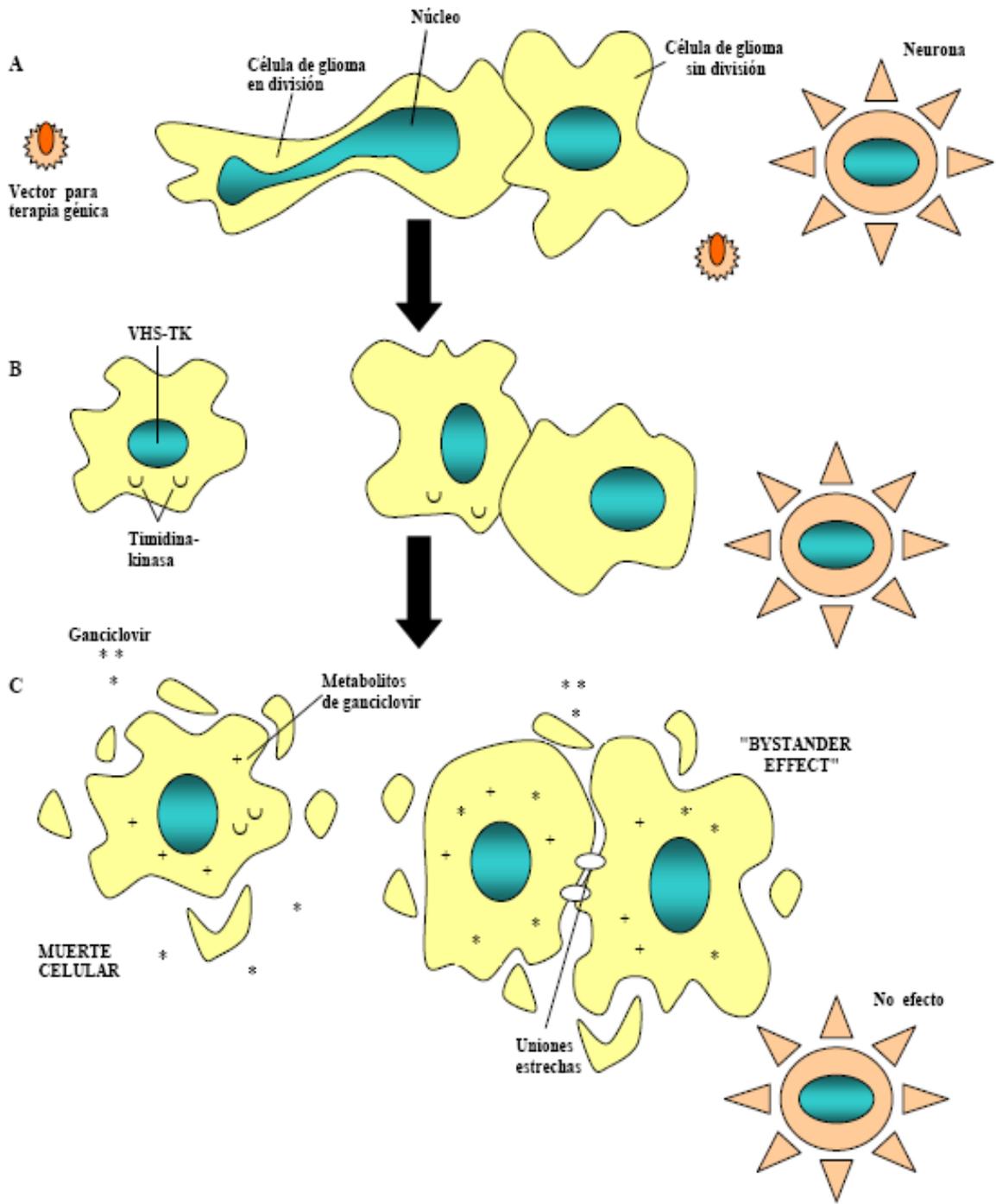


Figura 29: Terapia génica "suicida". (A) Las células tumorales son trasducidas con un vector que transporta al gen de la Timidina Kinasa del virus herpes simplex (VHS-TK). (B) La expresión transgénica en las células afectadas resulta en la síntesis de la enzima Timidina Kinasa, una Kinasa exógena con alta afinidad para la droga ganciclovir. (C) La exposición de las células huéspedes al ganciclovir conduce a la fosforilación de la droga, dando origen a varios metabolitos tóxicos en las células que expresan el gen HSV-TK, determinando la muerte celular. El transporte de los metabolitos fosforilados tóxicos a través de las uniones estrechas conduce a la muerte celular de las células adyacentes por el efecto espectador ("*bystander effect*")



Por otro lado, la clave para lograr una terapia génica "suicida" exitosa es restringir la expresión del gen a determinadas poblaciones celulares a través del uso de promotores específicos. Esto es muy importante, ya sea, en el tratamiento de una enfermedad sistémica, como por ejemplo el cáncer metastático, y en el tratamiento local, evitando la expresión de la enzima TK al mínimo en las células no tumorales.

Varios tipos específicos celulares se han explorado usando este enfoque, incluyendo el uso de antígeno carcinoembrionario para el cáncer de colon, el antígeno prostático específico para el cáncer de próstata, el DF3/MUC1 en el carcinoma de mama, la scc/11Bhidroxilasa en carcinoma adrenal, y el promotor de TG en cáncer tiroideo.

Todas estas propiedades biológicas del VHS1-TK, así como el potencial para poder planear distintos enfoques según el tipo tumoral, hacen de este virus un vector ideal para la terapia génica.⁹⁸

HSV-TK/GCV en Leucemias

Un estudio evaluó el efecto terapéutico que tenía el virus del herpes simple- Timidina Kinasa (HSV-TK)/ganciclovir (GCV) en el linfoma de células de manto (MCL), leucemia de células pilosas (HCL) y leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) in vitro.⁴²

Los resultados fueron los siguientes; eliminación del tumor debido a la terapia génica donde se contaron con 16 pacientes, 6 con LCM, 1 con HCL y 9 con LLC. De los 16 pacientes, 8 son hombres y 8 son mujeres. La edad varió de entre 40 a 80 años.

Se observó que la administración después del GCV eliminó al tumor en un 47.2% como máximo en la LLC. Para la MCL el efecto de la terapia génica fue de un 14.7%. En HCL la eliminación del tumor fue de un 29.0% y debido a que no fue muy frecuente no se pudo probar más de dos casos. La eficacia en la eliminación del tumor pareció ser la más prometedora en LLC y HCL que en MCL.



Cuadro 15: Características de los pacientes y los resultados de la destrucción de los tumores

Nº. de paciente	Edad/ género	Enfermedad	WBC (porcentaje de células anormales)	Porcentaje promedio de eliminación de tumor (n= 3-5)
1	65/M	MCL	17680 (58)	14.7
2	41/M	MCL	12500 (62)	13.7
3	60/F	MCL	30110 (84)	7.8
4	61/F	MCL	82600 (63)	7.5
5	73/M	MCL	15490 (76)	6.5
6	53/M	MCL	25510 (93)	1.7
Media ± S.D.				8.7 ± 4.4
7	78/F	HCL	83120 (93)	29
8	42/M	B-CLL	28030 (74)	47.2
9	76/M	B-CLL	27000 (95)	26.4
10	65/F	B-CLL	84310 (99)	24.4
11	63/F	B-CLL	40870 (99)	15
12	60/F	B-CLL	54000 (85)	13.2
13	82/F	B-CLL	68930 (96)	10.4
14	55/M	B-CLL	23000 (88)	7.3
15	50/F	B-CLL	45900 (96)	6.6
16	52/M	B-CLL	68290 (93)	3.1
Media ± S.D.				7.1 ± 13.8

Debido a los resultados obtenidos se puede considerar que la terapia génica pudo ser la más adecuada para la mejora de los regímenes convencionales de tratamiento contra la leucemia de células B malignas. El tratamiento en las leucemias es muy riesgoso, y la aplicación clínica de la correspondiente HSV-TK/GCV puede cambiar el pronóstico de la enfermedad.

Con este estudio se ha demostrado que el vector de HSV-1 es capaz de matar células B leucémicas in vitro. Es difícil tratar leucemias de células B malignas, lo que sería apropiado combinar terapias donde se incluyeran quimioterapias, radioterapias, inmunoterapias y la terapia de genes diana en la clínica. Los datos estadísticos fueron normalizados por la eficacia en la muerte del tumor por ciento; es decir 100% menos el porcentaje de viabilidad celular en la presencia de tres veces la multiplicidad de infección (MOI) sin GCV. Los datos se agruparon y se compararon mediante la prueba de t de Student.



HSV-TK/GCV en cáncer de pulmón

En este estudio se mostró que el cáncer de pulmón no microcítico fue altamente invasivo y tumorigénico y las células portadoras del gen mutado p53 se infectaron con el virus del herpes simple- Timidina Kinasa y además fueron susceptible al ganciclovir.⁸

El cáncer de pulmón no microcítico tiene una letalidad de casi el 90 %, es por ello que se ha desarrollado la terapia génica que conduce a la citotoxicidad de la célula a través de transferencia ectópica de genes que codifican enzimas que convierten los profármacos no tóxicos en toxinas celulares.

Para llevar esta estrategia de tratamiento a cabo, se requiere de un modelo de gen en el virus del herpes simple tipo I Timidina Kinasa que refleja la sensibilidad al ganciclovir (9-1,3- dihidroxi-2-propoxy-metil)-guanina; GCV). El producto transgénico de la Timidina Kinasa fosforila el GCV y termina con la formación de la cadena de DNA. La potencia del método logra la muerte celular amplificada (apoptosis) mediante la transferencia del nucleótido GCV denominado “Bystander” La eficacia mostró que el estudio en el retroceso del tumor a través de la transferencia del gen HSV-TK y posteriormente el tratamiento con GCV confirmó que las células de cáncer de pulmón no microcítico tienen el gen p53 mutado.

Para este estudio se requirió de células de pulmón no microcíticas H1437 cultivadas en medio RPMI-1640. Posteriormente a esta línea celular de células de pulmón no microcíticas se transfectaron con un microorganismo recombinante pcDNA-HVS-TK (gen in vitro). Se realizó la detección de HSV-TK cDNA incorporado en el ADN genómico y de expresión. El DNA genómico total fue aislado y amplificado por PCR. Para determinar la expresión de HSV-TK, el ARN celular fue aislado con reactivo RNazol (gen in vitro).

También se analizó la distribución del ciclo celular en un citómetro de flujo FACCCalibur (Beckton-Dickinson, Mansfield, MA). Para que se realizará el crecimiento del tumor in vivo, las células H1437/HSV-TK se inyectaron vía subcutánea en la zona dorsal en ratones hembras de 5 a 6 semanas de edad compuesto por 5 ratones cada grupo. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50mm³ del xenoinjerto después de la inoculación, los



ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 25mg/kg de GCV durante 4 días. El volumen del tumor se midió mediante un calibre calculado según la ecuación: volumen = $(A \times B^2) / 2$, donde A es el diámetro mayor y B el diámetro más pequeño del tumor implantado. Se utilizó la prueba ANOVA de comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos.

Finalmente los resultados arrojaron que el GCV indujo la supresión del crecimiento celular, y para que se determinará su efecto se construyó la codificación de la secuencia completa de HSV-TK cDNA regulada por el promotor de citomegalovirus transfectadas en células H1437. Los clones resistentes a G418 fueron aislados y se confirmó la incorporación de HSV-TK cDNA.

También se determinó el efecto Bystander en células transfectantes H1437/HVS-TK al mezclarse con las células H1437. Para ello se mezclaron células parentales H1437 y células H1437/HSV-TK en proporciones de 1:0, 1:1, 4:1, 16:1, 64:1, 128:1 y 0:1 respectivamente.

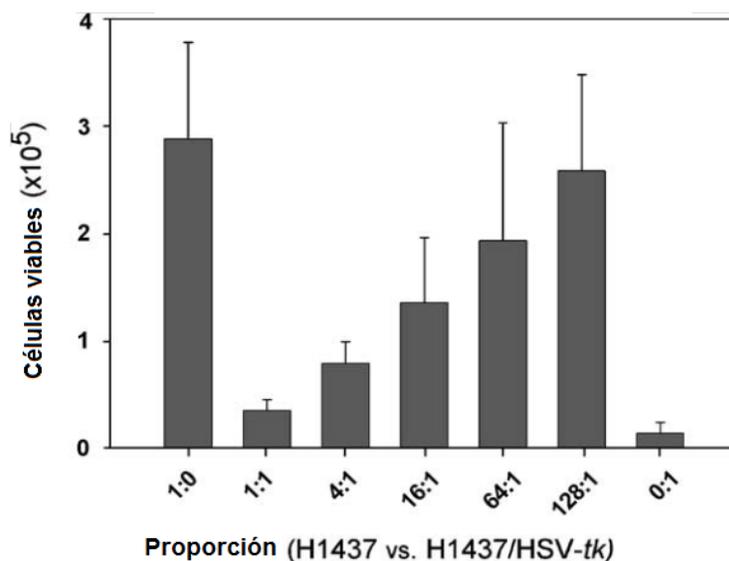


Figura 30: Diferencia entre el efecto *bystander* de células parentales H1437 mezcladas con H1437/HSV-tk #11 en diferentes proporciones.

Las mezclas de células fueron expuestas a GCV y 6 días después se probó el efecto bystander donde la GCV indujo que la proliferación celular se redujera a la mitad, con aproximadamente el 6% de H1437/HSV-TK en la mezcla.



En la imagen 42 se muestra el “efecto espectador” en la mezcla de células parentales H1437 con el clon H1437/HSV-TK # 11 en diferentes proporciones. Un total de 2×10^4 células en diferentes proporciones se cultivaron en placas de 12 pocillos. El crecimiento de tumor que fueron trasplantados por vía cutánea en ratones inmunodeficientes establecidos por H1437/HVS-TH pudieron ser efectivamente suprimidos por el tratamiento con GCV, mientras que el volumen del tumor aumento significativamente en el grupo control.

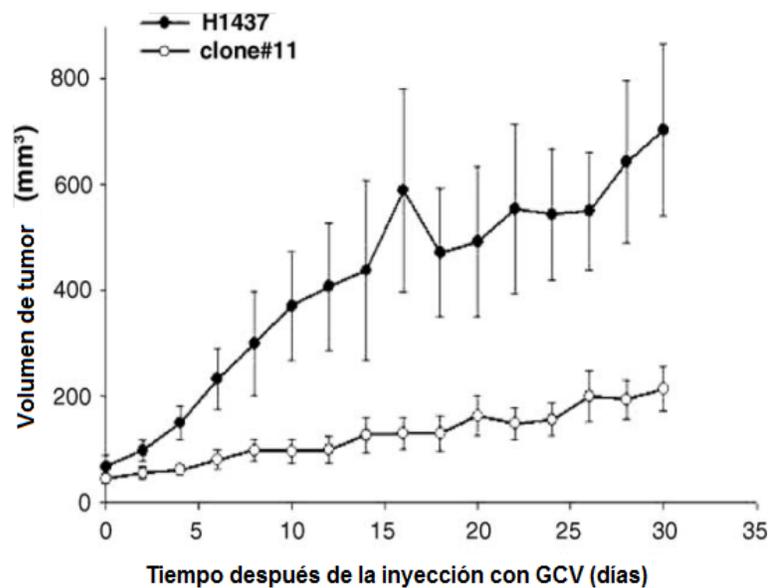


Figura 31: Inyección con GCV Vs volumen del tumor

No se encontró diferencia significativa en los volúmenes de tumor entre los grupos de células parentales con la inducción de GCV y las células H1437/HSV-TK con el control del vehículo solo.

Sin embargo, la progresión de la supresión del crecimiento en los tumores trasplantados de H1437 / HSV-TK células se hizo visible 2 días después de la inyección final de GCV en comparación con los tumores de las células parentales, lo que indicó la importancia de la expresión ectópica de HSV-TK cDNA en el altamente invasiva las células

Muchos tumores humanos CNCP llevan a la pérdida alélica y/o mutaciones en el gen p53 y son susceptibles a múltiples etapas de la carcinogénesis. Como p53 se encuentra mutado en la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón, los mutantes pueden tener importancia



clínica, ya que estos tumores son relativamente más resistentes a la quimioterapia. La entrega de HSV-TK cDNA en un vector retroviral y la administración de ganciclovir posterior proporcionó una eficacia terapéutica con “efecto bystander” eficiente en células humanas de cáncer de pulmón. La terapia génica de HSV-TK/GCV parece ser un tratamiento eficaz para CNCP en humanos y los resultados preliminares son prometedores, ya que las células tumorales fueron modificadas genéticamente, de modo que la carga tumoral puede ser reducida con tratamiento de GCV.

El modelo resultó eficaz para generar apoptosis de las células en forma dosis-dependiente en las células metastásicas humanas CNCP después de la transferencia ectópica de HSV-TK cDNA. El enfoque fue probado con éxito en células primarias de cáncer de pulmón. Este estudio ofreció información valiosa en cuanto a la mejora de la terapia del cáncer que contengan la condición de p53 diferentes, ampliando así su potencial terapéutico hacia la erradicación del cáncer de pulmón.

Existen diversos estudios que involucran a HSV-TK/GCV en la terapia génica, como ya se mencionó en leucemias, en el cáncer de pulmón, en el cáncer de mama³², cáncer de colon (murino)²² neoplasia correctal (humanos)⁴⁸, cáncer de ovario³⁶, carcinoma de tiroides²³, hepatocarcinomas⁴⁶, entre otros.

La expresión del gen de Timidina Kinasa del herpes virus (HSV-TK) vuelve a las células susceptibles a la droga antiherpética ganciclovir (GCV), llevando así a la muerte no solo de las células modificadas, sino también de las células vecinas que no expresan el gen suicida. El efecto bystander es importante debido a la baja deficiencia de transducción in vivo de tumores con los vectores utilizados actualmente.²

Diferentes hipótesis pretenden explicar el mecanismo de dicho efecto, incluyendo la transferencia de metabolitos tóxicos de GCV y la fagocitosis de vesículas apoptóticas liberadas por células muertas debido a la GCV.

En conclusión si se implementara esta estrategia en el tratamiento contra el cáncer mejorarían el pronóstico, la supervivencia e inclusive la posible erradicación de las células tumorales.



TIMIDINA KINASA EN EXPERIMENTOS

Para finalizar esta revisión sobre la importancia de la Timidina Kinasa en la medicina, tanto en enfermedades hematológicas como en la terapia, se mostró la importancia que tiene la TK pero en diferentes estudios no tanto involucrados en el cáncer sino en nuevas estrategias que involucran la utilización de esta enzima.

Uno de los estudios hizo referencia de la importancia de la Timidina Kinasa y las consecuencias fenotípicas de su deficiencia in vivo.¹⁴

Muchas de las reacciones enzimáticas implicadas en las vías de Novo y las vías de recuperación son reguladas por retroalimentación negativa para mantener el equilibrio entre los sustratos y los productos, además de la expresión de algunos genes que codifican enzimas es la síntesis de nucleótidos del ciclo celular dependiente.

El gen de TK es prescindible, siempre y cuando la vía de Novo siga siendo funcional. Esta propiedad de la Timidina Kinasa es aprovechada en modelos para la detección de mutación in vitro en el gen endógeno autosómico TK.

En las células heterocigotos para el gen de la TK, la copia funcional del gen actúa como objetivo para la mutagénesis. Las células deficientes de TK, en el que se inactiva la copia funcional del gen como resultado de una mutación, puede ser ampliado de forma selectiva en presencia de análogos tóxicos de la Timidina como trifluorotimidina o 5-bromodesoxiuridina. .

Si se inactivara el gen de TK citoplasmático perturbaría el metabolismo de nucleótidos de Timidina y aumentaría la mutación del gen endógeno.

También se puede agotar la reserva intracelular de la metil-folato carrier- N5, N10-metileno tetrahidrofolato por no reciclar la Timidina con su grupo metilo, que a su vez puede causar hipometilación del ADN, desequilibrio de nucleótidos de purina, mayor rompimiento del ADN, desarrollo precoz de cáncer y teratogénesis.



El presente estudio utilizó ratones como animales de experimentación donde los resultados arrojados fueron muy concretos; los ratones deficientes de TK desarrollaron esclerosis de los glomérulos renales además murieron antes de un año de edad por la insuficiencia renal. Se observaron cambios en los animales como la consistente secreción mucosa principalmente en las glándulas salivales.

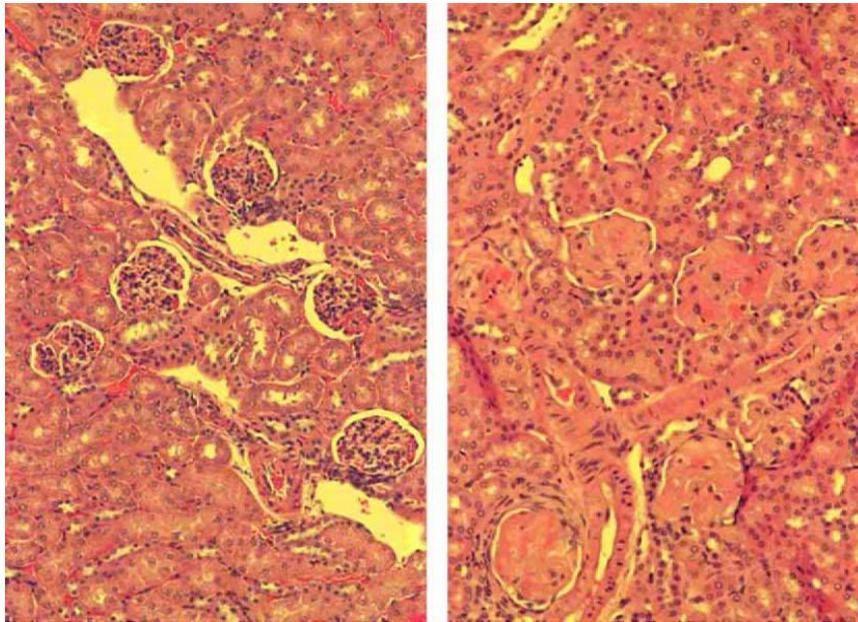


Figura 32: Histopatología de Riñón de rato. Lado izquierdo células glomerulares normales. Lado derecho células glomerulares reducidas drásticamente, tejidos cicatrizales cubren la mayor parte de cada glomérulo

Presentan también inflamación de las arterias, anomalías en los linfocitos y el bazo por lo que se pudo sugerir un sistema inmunitario anormal. Estas alteraciones de la TK indicaron que la vía de recuperación de nucleótidos de pirimidina es indispensable.

Se comprobó que la falta de Timidina Kinasa en los ratones induce el desarrollo de una enfermedad renal fatal para el animal.

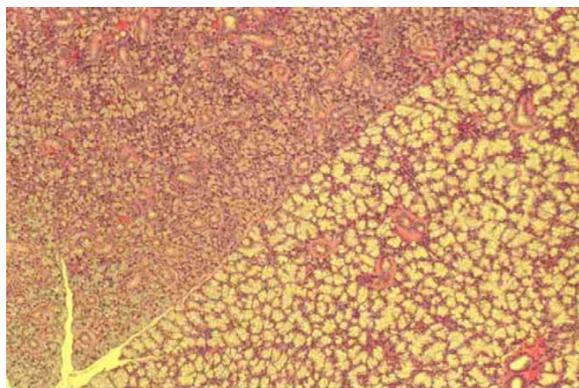


Figura 33: (izquierda) cambio de secreción de glándulas salivales de ratón de 3 meses de edad. Imagen superior derecha: Sublingual y superior izquierda: Submaxilar.

Secreción de moco en glándula sublingual (aspecto espumoso) y secreciones de las glándulas submaxilares (serosas y mucosas). Parte inferior glándula sublingual alterada contiene poca secreción mucosa, la glándula submaxilar no cambio

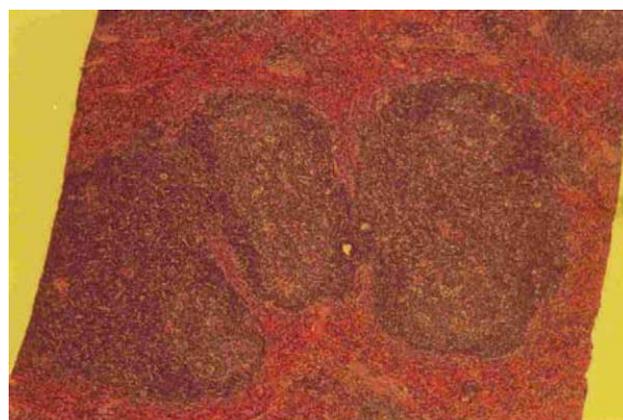
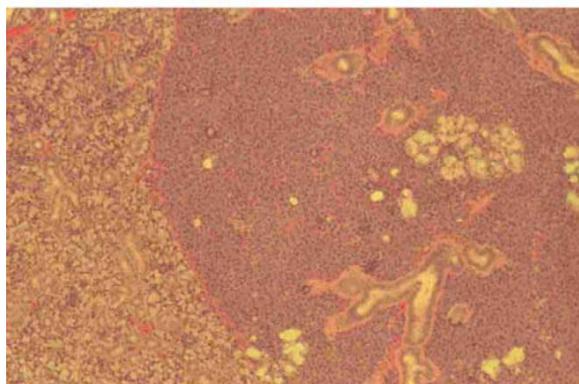


Figura 34: (derecha) histopatología del bazo en ratones. Parte superior normal y parte inferior alterada



Microscópicamente, el bazo de los animales refleja alteraciones inmunológicas y hematológicas, principalmente la atrofia linfoide. Esto sugirió la destrucción prematura de los eritrocitos. El bazo de los ratones fueron de tamaño pequeño y el rendimiento de los linfocitos del bazo se redujo en comparación con los controles.



Como se observaron en las imágenes anteriores la inactivación selectiva del gen TK tuvo un profundo efecto en el ratón, entonces se concluye que la enzima Timidina Kinasa si influye en la síntesis de ADN tanto en la división rápida de tejidos así como las células del feto en el desarrollo. Por lo tanto Timidina Kinasa no solo es indispensable como un marcador tumoral en las enfermedades como el cáncer, sino que también es requerido para el desarrollo de las células.

Timidina Kinasa es una enzima muy interesante en la medicina clínica sobre todo para los humanos; pero también es excelente para su uso en la veterinaria.

Tal es el caso de un estudio retrospectivo donde ha sido evaluada la actividad sérica en perros que presentaban hemoabdomen; indicado por un líquido con un hematocrito mayor o igual al 10-15% que por lo usual es resultado de traumatismos (ruptura hepática o esplénica), neoplasias sangrantes, o coagulopatía (intoxicación con raticidas)⁸⁷; y una masa en el bazo.

Se utilizó azidotimidina como sustrato para evaluar la actividad de la TK1 en 62 perros con hemoabdomen y otros 15 perros sanos utilizados como control. La actividad sérica de la TK1 fue significativamente mayor en perros con hemangiosarcoma que en los perros sanos. Teniendo en cuenta una línea de corte de 6,55 U/L, la actividad de la Timidina Kinasa demostró una sensibilidad de 0,52, especificidad de 0,93, valor predictivo positivo de 0,94 y un valor predictivo negativo de 0,48 para distinguir animales con hemangiosarcoma de perros sanos.

Los autores concluyeron que el análisis de la actividad sérica de la TK1 pudo apoyar a la hora de distinguir entre perros que sufren una enfermedad benigna o hemangiosarcoma, cuando presentasen hemoabdomen y una masa en el bazo. Sin embargo no ayudó a diferenciar entre hemangiosarcoma y otros tumores.⁶⁴

Para la detección de leucosis bovina también se utilizó la determinación de Timidina Kinasa sérica; el valor de discriminación de la actividad de TK fue de 5,4U/L. En un grupo de vacas clínicamente sanas 2 de 83 vacas (2.4%) presentaron actividad sérica elevada con



respecto al valor de discriminación. En contraste 19 de 20 vacas (95%) diagnosticadas con leucosis bovina mostraron actividad de TK mayor del valor de discriminación.

La leucosis bovina es una de las enfermedades neoplásicas más comunes del ganado vacuno; el diagnóstico definitivo puede ser difícil en el ganado, sin signos típicos de la especie bovina, además no hay cura para la enfermedad, y la muerte ocurre 2-3 semanas después de la enfermedad clínica y el desarrollo de neoplasias.

Cuadro 16: hallazgos hematológicos y resultados de inmunohistoquímica en el ganado bovino

N°. de Caso	Raza	Sexo	Edad	Hallazgos hematológicos			BLV	Anticuerpo CD3/BLA36
				WBC (por μ l)	Linfocitos (por μ l)	TK (U/l)		
1	HF	F	5y7m	20,300	6,496	5.4	+	-/+
2	HF	F	10y2m	27,200	17,680	22.0	+	-/+
3	F1	F	1y8m	216,000	203,040	5.5	+	NT
4	HF	F	8y5m	12,700	4,826	69.0	+	-/+
5	HF	F	1y11m	5,600	1,512	30.0	+	-/+
6	HF	F	3y	12,400	8,928	38.0	-	NT
7	HF	F	2y10m	11,600	8,120	32.0	-	+/-
8	HF	F	7y10m	12,900	6,579	51.0	+	-/+
9	HF	F	1y5m	8,200	4,346	28.0	-	+/-
10	HF	F	3y6m	34,800	32,016	22.0	+	-/+
11	HF	F	7y4m	21,600	15,768	11.0	+	-/+
12	HF	F	5y7m	17,100	2,736	8.2	-	+/-
13	HF	F	8m	5,900	4,425	2.7	-	-/+
14	HF	F	10y9m	20,800	11,440	41.0	+	-/+
15	HF	F	5y11m	12,200	3,172	83.0	-	NT
16	HF	F	3y8m	10,600	3,286	44.0	+	NT
17	HF	F	4m	29,700	26,136	270.0	-	-/+
18	HF	F	7y5m	269,700	261,609	>1,000.0	+	NT
19	HF	F	6y6m	15,100	1,963	240.0	+	-/+
20	HF	F	5y5m	14,600	7,884	39.0	-	NT

* WBC= conteo de glóbulos blancos; TK= Timidina kinasa; CD3= grupo de diferenciación 3; BLA36= Linfocitos B antígeno 36; HF= Holstein-Friesian, F= femenino; y= años; m= meses; += positivo; -= negativo, F1= Japón Negro 3-Holstein-Friesian; NT= no probado.

La determinación de TK se realizó con un kit de ensayo radioenzimático comercial con ¹²⁵I-iododeoxyuridine.



Estos resultados indicaron que la actividad sérica de Timidina Kinasa pudo ser un marcador para la detección de leucosis bovina. Solo 1 de cada 20 vacas con leucosis bovina (n=13) mostró actividad sérica por debajo de la normal. Este fue un caso atípico; la vaca contenía una masa de células b neoplásicas que comprimió su medula espinal y le causo ataxia. De las 7 vacas con leucosis bovina atípica, 6 presentaron actividad mayor de TK por lo que sería útil en el diagnóstico de casos atípicos de la leucosis bovina.

Además dado que la actividad sérica de TK elevada se produjo independientemente de los inmunofenotipos y los anticuerpos anti-VLB (anticuerpos contra leucosis bovina), esta puede ser un marcador potencial para ambos tipos de leucosis, ya sea la leucosis bovina enzootica y la leucosis bovina esporádica.⁵⁸

Debido a la limitación de este estudio, se tendría que requerir una investigación más amplia para aclarar la especificidad de la actividad de Timidina Kinasa en el ganado. Sin embargo el estudio aportó datos importantes del uso de TK en el ámbito veterinario.



CONCLUSIONES

A través de esta recopilación de datos sobre la enzima en estudio Timidina Kinasa se citaron los resultados que apoyaron a diferentes objetivos a través de su uso en el ámbito médico y clínico.

El objetivo primordial de esta tesis; se cumplió ya que se recopiló la mayor información relacionada con la enzima Timidina Kinasa en la medicina clínica como marcador bioquímico por medio de una revisión biblio-hemerográfica-electrónica con el propósito de su utilización en el diagnóstico pronóstico y seguimiento de enfermedades hematológicas, se consultaron básicamente revistas científicas publicadas en la web específicamente a través del buscador SCIENCE DIREC, así como tesis, y páginas científicas.

Los objetivos particulares también se llevaron a cabo ya que se revisó la importancia de la enzima Timidina Kinasa en pacientes con leucemias, en donde se abarcaron: Leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide crónica y la leucemia linfática crónica, en donde se explicó a detalle la actividad de la enzima TK como marcador bioquímico, se presentaron gráficas donde se muestra su actividad en suero y la manera que favorece su determinación en estas enfermedades.

También se revisó la función de Timidina Kinasa en el linfoma no Hodgkin, presentando gráficamente su actividad, y por lo tanto su favorecimiento en su determinación en diferentes estados de la enfermedad.

Se abarcó también el efecto de la Timidina Kinasa en pacientes que presentaban tumores sólidos; como el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides y el cáncer de ovario. Se destacaron estos tipos de tumores porque es donde se pudo encontrar mayor información y porque son de los tumores más frecuentes entre las poblaciones.

Se revisó el método El LIAISON[®] Thymidine Kinase de DiaSorin que es un inmunoensayo cuantitativo para la determinación *in vitro* de la actividad de la timidinkinasa (TK) en suero o plasma.



Se mencionó su fundamento, la metodología y la forma de interpretación de los resultados. Este método se está utilizando en proyectos de investigación clínica en el Hospital Infantil de México Federico Gómez entre otros y se están obteniendo excelentes resultados que apoyan el seguimiento de leucemias en niños, cuantificar la TK en suero y demostrar su utilidad clínica en niños con leucemia permitirá proponer terapias anticipadas a la recaída, sin utilidad otros métodos de diagnóstico invasivos y con tecnología de alto costo.

Se recopiló información de la enzima Timidina Kinasa en la medicina; donde se abarcó básicamente la terapia génica, se explicó en qué consiste y las estrategias de la terapia contra el cáncer. La utilización del vector Virus herpes simplex 1 que expresa a la enzima TK durante su ciclo replicativo y permite la actividad antitumoral tras la adición del Ganciclovir. Como ejemplos de este tipo de terapias se incluyeron en el cáncer de pulmón y en las leucemias.

Finalmente la última sección de esta recopilación abarcó el estudio de la Timidina Kinasa en los experimentos; esta sección se generalizó de qué manera puede afectar la ausencia de la enzima a nivel in vivo utilizando animales de experimentación, en las cuales se encontraron problemas a nivel de riñón, de glándulas salivales, de bazo entre otros; básicamente es una recopilación que apoya a la veterinaria; algunos ejemplos son que la determinación de TK en suero de perros apoya con el hemoabdomen y para la diferenciación de las leucosis bovinas.

El estudio de la enzima Timidina Kinasa ha ido apoyando a través de los años como un marcador de proliferación celular; en cuanto al cáncer ayuda en el diagnóstico, pronóstico, seguimiento, supervivencia inclusive en el tratamiento. Sin embargo no es una enzima a la cual se le dé mucha importancia por eso la recopilación de esta información sobre Timidina Kinasa, también cumple la función de apoyar con nuevos proyectos y se utilice como medio de difusión para que se incluyan los métodos de determinación de TK para todas las leucemias y los tumores sólidos y de esa manera se siga investigando y encontrando mejores alternativas en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de este tipo de cáncer.



Además de sus múltiples cualidades para ser usada como marcador; es un recurso indispensable para el desarrollo de las células; y como se ha ido mencionando es requerido para la síntesis de ADN.

Diferentes investigaciones se incluyeron en esta tesis y todas fueron analizando detalladamente la actividad de la TK y su determinación en suero a través de distintas técnicas; aunque básicamente los niveles de referencias son los mismos (4,3- 4,5U/L), sin embargo con estos estudios se ha llegado a la conclusión que la determinación de la actividad de Timidina Kinasa en diferentes estados del desarrollo del cáncer apoya en cuanto al diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes; con grandes posibilidades de que si se determina a tempranas etapas de la enfermedad se pueda llegar a encontrar una cura o una mejor supervivencia del paciente.

En cuanto a la Timidina Kinasa en la medicina clínica apoya mucho con la terapia génica y esta forma de tratamiento puede ser eficaz y de gran utilidad tanto en leucemias como en tumores sólidos.

En los experimentos de campo es bastante amplio ya que Timidina Kinasa se encuentra en las células y su utilización puede ser muy variada, únicamente se abarco en el ámbito veterinario pero se encuentran de manera más amplia en la microbiología, virología⁴⁷, parasitología⁴⁵ y como fue el caso en la medicina clínica.

Finalmente este trabajo de tesis concluye que la Timidina Kinasa no solo es un marcador de proliferación celular, sino que también es pieza clave en las enfermedades sí se determina a tiempo, lo que permitirá a los clínicos utilizar terapias dirigidas en la recaída de algunos tipos de cáncer.



GLOSARIO

5-FU: El 5-fluorouracilo, fármaco que bloquea la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico

Ann Arbor: En la estadificación de los linfomas se utiliza la clasificación de Ann Arbor, que se desarrolló inicialmente para la enfermedad de Hodgkin. De esta forma, los linfomas se estadifican en 4 estadios. Para poder estudiar un linfoma se precisa de información de la historia clínica, exploración física, técnicas de diagnóstico por la imagen, análisis de sangre, informe de la biopsia inicial y de la médula ósea.

Analito: Especie química cuya concentración se desea conocer.

Anemia perniciosa: Es una disminución en los glóbulos rojos que ocurre cuando el cuerpo no puede absorber apropiadamente la vitamina B12 del tubo digestivo. Esta vitamina es necesaria para el desarrollo apropiado de los glóbulos rojos.

ANOVA: Herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de diferentes procedimientos, ya sea la comparación de múltiples columnas de datos y la estimación de los componentes de variación de un proceso.

Anticuerpo monoclonal: Moléculas de anticuerpos específicas a un único epítipo, originalmente producidas por una célula B y que comparten una secuencia idéntica.

Anticuerpo policlonal: Moléculas de anticuerpos que difieren en las características de su epítipo y en la secuencia de aminoácidos de su región de complementariedad, sin embargo compartiendo un objetivo específico común.

Antígeno: Molécula capaz de producir una respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de linfocitos

Antirretrovirales: Medicamentos activos frente a los virus del tipo retrovirus como el VIH.

Apoptosis: muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos.

Binet: Clasificación que se basa en el número de áreas ganglionares afectadas (ganglios cervicales, axilares o inguinales, hígado y bazo) y si hay presencia o ausencia de anemia o trombopenia.

Breitman: Método para la determinación de la actividad enzimática.

Bystander effect: Efecto espectador

CA-125: Glucoproteína de alto peso molecular que se encuentra altamente expresada en la superficie celular del epitelio celómico durante el desarrollo embrionario y en las células epiteliales de muchas malignidades ováricas.

Calibrador: Sustancia de concentración conocida que se toma como referencia para muestras problema en búsqueda de un analito.

Células progenitoras mieloides: Da lugar a eritrocitos, granulocitos, monocitos y megacariocitos

Células progenitoras linfoides: Da lugar a linfocitos T y linfocitos B



Citogenético: Concerniente a los caracteres histológicos de la herencia. Estudio, a nivel de la célula, de los caracteres particulares a la herencia, esencialmente de los cromosomas y de los genes.

Cofactor: Son sustancias de diferente naturaleza química, que participan en las reacciones enzimáticas debido a que las enzimas no poseen en su estructura todos los grupos funcionales necesarios para llevar a cabo la catálisis de todas las reacciones metabólicas; los cofactores no son componentes obligados de todas las reacciones.

Control: Sustancia de referencia que se utiliza para evaluar otra comparando sus propiedades.

Cromatografía: Conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Cromosoma: Estructura física, que consiste en una molécula de ADN también organizada en genes y mantenida por proteínas llamadas cromatina.

Cromosoma Filadelfia: Anormalidad genética asociada a la leucemia mieloide crónica.

Dot- Blot: Técnica de biología molecular para detectar biomoléculas.

Enfermedad heterogénea: Enfermedad que puede evolucionar e adquirir otras características. Está sujeta a mutaciones, por condiciones ambientales o la presencia de otras patologías.

Especificidad: Capacidad de un método o procedimiento para detectar personas sanas como negativos.

Estadificación: Describe la gravedad del cáncer que aqueja a una persona basándose en la extensión del tumor original (primario) y si el cáncer se ha diseminado en el cuerpo o no.

Fase G1: Es un estadio que se caracteriza por ser genéticamente activo, el ADN se transcribe y se traduce, dando lugar a proteínas necesarias para la vida celular y sintetizando las enzimas y la maquinaria necesaria para la síntesis del ADN.

Fase G2: Durante este período se termina la preparación de todos los componentes de la división celular, al final de esta fase, se produce una señal que dispara todo el proceso de la división celular.

Fase S: Fase en la cual se duplica por entero el material hereditario, el cromosoma pasa de tener un cromatidio a tener dos, cada uno de ellos compuesto por una doble hélice de ADN producto de la duplicación de la original, como la replicación del ADN es semiconservativa, las dos dobles hélices hijas serán exactamente iguales, y por tanto los cromatidios hermanos, genéticamente idénticos.

Ficoll- Hypaque: Separación de una suspensión celular a través de un medio de alta densidad por centrifugación a baja velocidad.

Fosforilación: Es la adición de un grupo fosfato inorgánico a cualquier otra molécula.

Gammapatías: Grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación de las células que sintetizan las inmunoglobulinas.

Gen autosómico: (dominante) describe un rasgo o patología cuyo fenotipo se expresa en los individuos que han heredado una sola copia de una mutación génica determinada (heterocigotos).



Gen P53: Pertenece a la familia de factores de transcripción, a la cual pertenecen también p63 y p73. Estas tres proteínas colaboran en una compleja red de interacciones que aún no se conoce en su totalidad. Sin embargo, p53 es ubicuo (se expresa en todos los tejidos).

Gy: Unidad que expresa la dosis absorbida de radiaciones ionizantes por un determinado material. Un gray es equivalente a la absorción de un joule de energía ionizante por un kilogramo de material irradiado.

H1437: línea celular para cáncer de pulmón.

Hemolisis: Desintegración de los eritrocitos. Este proceso está muy influido por la tonicidad del medio en el que se encuentran los eritrocitos o hematíes.

Inmunogenicidad: Capacidad de un antígeno para inducir una respuesta inmune.

IgA: Anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo como saliva, lágrimas, calostro, leche y secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias.

IgG: Inmunoglobulina predominante en los fluidos internos del cuerpo, como son la sangre, el líquido cefalorraquídeo y el líquido peritoneal. Esta proteína especializada es sintetizada por el organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus.

Isoenzimas: Proteínas con diferente estructura pero que catalizan la misma reacción.

Kaplan- Meier: Es un estimador no paramétrico de la función de supervivencia. En medicina se usa para medir la fracción de pacientes todavía vivos tiempo después de un tratamiento.

Keil: La clasificación de Kiel, integra datos inmunológicos y la fisiología del tejido linfóide normal. Distingue dos grados (bajo y alto) y su valor está en distinguir entre el origen T o B de los linfocitos lo que implica valoración pronóstica.

Kruskal- Wallis: Es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Intuitivamente, es idéntico al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. La prueba de Kruskal-Wallis no asume normalidad en los datos, en oposición al tradicional ANOVA. Sí asume, bajo la hipótesis nula, que los datos vienen de la misma distribución.

Leucemia de Burkitt: Tipo de leucemia poco frecuente de crecimiento rápido en el cual se forman demasiados glóbulos blancos (linfocitos B) en la sangre y la médula ósea.

Linfosarcoma: Nombre genérico con que se designaban los tumores malignos de los ganglios y tejido linfóide de diversos órganos.

Lipemia: Es una turbidez del suero o plasma causado por elevadas concentraciones de lipoproteínas y la cual es visible a simple vista.

Log- Rank: Esta prueba sirve para comparar dos curvas de supervivencia de forma global.

Lowry: Método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Mieloma: Es un cáncer en las células plasmáticas en la médula ósea.



MOI: Multiplicidad de infección se define como la cantidad de virus inoculado por célula del cultivo celular.

Mutación: Alteración en la secuencia de ADN. Puede implicar desde un pequeño evento como la alteración de un solo par de bases nucleotídicas hasta la ganancia o pérdida de cromosomas enteros.

NaN₃: Azida sódica. La forma aniónica de la azida es tóxica, es capaz de inhibir a la enzima citocromo c oxidasa formando un enlace irreversible con el cofactor hemo, en un proceso similar al realizado por el monóxido de carbono. Las sales de la azida son empleadas generalmente en bioquímica como elementos de mutagénesis.

Neoplasia: Masa anormal de tejido, producida por multiplicación de algún tipo de células.

Nottingham: Índice pronóstico Nottingham (IPN) es un índice derivado de un estudio multivariado retrospectivo, capaz de predecir la supervivencia en pacientes con cáncer de mama.

Oncogén bcr/abl: Es un gen anormal o activado que procede de la mutación o activación de un gen normal llamado protooncogén. El oncogén BCR-ABL se expresa en todas las etapas clínicas de la Leucemia mieloide crónica (LMC), por lo que, la proteína Bcr-Abl resultante representa un blanco ideal para el desarrollo de nuevas drogas en LMC.

Panmielosis: Afección que alcanza todos los elementos de la médula ósea formadores de glóbulos rojos, de leucocitos granulocitos, de plaquetas y de células reticuloendoteliales.

Papel Whatman DE-81: Son estándares de referencia mundial por su calidad y fiabilidad para la filtración en los laboratorios. El papel Whatman DE-81 se usa comúnmente en cromatografía.

Pellet: Denominación genérica, utilizada para referirse a pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido.

Profármacos: Sustancia farmacológica que se administra en forma inactiva o poco activa. Posteriormente, el profármaco es metabolizado in vivo hasta un metabolito activo. Una de las razones por las que se usan profármacos es la optimización de los mecanismos de absorción, distribución, metabolización y excreción.

Prognosis: En el ámbito médico, se define como el resultado que se espera de una enfermedad, su duración y las probabilidades de recuperación de ésta.

Protooncogen RET: Son genes cuyos productos promueven el crecimiento y la división de la célula. Las mutaciones del protooncogén RET se han identificado en el 90-95% de los carcinomas medulares familiares y en 5-10% de los esporádicos.

Quimioluminiscencia: Fenómeno que en algunas reacciones químicas la energía liberada se emite en forma de luz.

Rai: Estadaje que integra datos sobre la masa tumoral pero no predice la posibilidad de progresión. Las etapas de Rai se dividen en categorías de bajo riesgo, intermedio y alto. La etapa 0 es considerada de bajo riesgo, las etapas 1 y 2 de riesgo intermedio, y la 3 y la 4 como de alto riesgo.

Radiactividad: Se trata de procesos de desintegración espontánea de núcleos atómicos mediante la emisión de diferentes partículas subatómicas.



Rappaport: Clasificación que se basa exclusivamente en la histopatología del linfoma.

RS: (Reed- Stenberg) Son células gigantes malignas encontradas en biopsias de ganglios linfáticos de personas con un tipo de linfoma conocido como la enfermedad de Hodgkin. Se originan de linfocitos B.

SAS: (Statistical Analysys System). El paquete SAS comprende un conjunto de programas de computadora útiles en el análisis estadístico de datos, realizando diferentes tipos de trabajos como: almacenar y recuperar información, modificar la información existente, manejo de archivos, obtención de diferentes tipos de estadísticas de datos y análisis complejos de los mismos.

Sensibilidad: Capacidad del método para detectar a las personas enfermas como positivos.

Spearman: Coeficiente de correlación de Spearman, ρ (r_o) es una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias continuas. Para calcular ρ , los datos son ordenados y reemplazados por su respectivo orden.

Sustrato: Sustancia orgánica o inorgánica sobre las que actúan las enzimas produciendo su modificación en productos finales en una reacción.

Tampón (Buffer): Solución amortiguadora que tiene la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes.

Timina: Es una de las cuatro bases nitrogenadas en los ácidos Nucleicos de ADN que están representadas por las letras G-C-A-T.

Trazador: Elemento identificable que permite seguir el curso de una reacción. Son los isótopos radiactivos de elementos químicos comunes y estables que emiten débiles radiaciones que revelan su presencia.

Tris- HCl: (Hidroximetil) aminometano-HCl. La denominación Tris-HCl, que se usa habitualmente para los tampones, no indica que el tampón se haya preparado con el hidrocloreuro de Tris, sino que se puede haber preparado con Tris base y la cantidad precisa de ácido clorhídrico para ajustar el pH al valor deseado.

Wilconxon: Es una prueba no paramétrica para comparar la mediana de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Se utiliza como alternativa a la prueba t de Student cuando no se puede suponer la normalidad de dichas muestras.



REFERENCIAS

- ¹**Arce**, M.V., Catalina, F.P., Mallo, F. (2006). Metodologías en el laboratorio clínico: El inmunoensayo. Ed. Serizo de publicaciones. *Endocrinología*. Pp. 384. Obtenido el día 23/Mar/12
- ²**Berensteini**, M., Adris, S., Ledda, F., Wolfmann, C., Medina, J., Bravo, A., Mordoh. Et al. (1998) Terapia antigenica antitumoral mediante el uso de genes suicidas. *Medicina* Vol. 58, N°2.
- ³**Birringer**, S.M., Perezzo, R., Kut, E., Stillhart, C., Surber, W., et al. (2006). High-level expression and purification of human thymidine kinase 1: Quaternary structure, stability and kinetics. *Protein expression and Purification* 47. 506-515
- ⁴**Boyle**, D.B., Gibbs, A.J., Seigman, L.J., Both, G.W., Coupar, B.E. (1987). Fowlpox virus thymidine kinase: nucleotide sequence and relationships to other thymidine kinases. *Virology* 156 (2): 355–365.
- ⁵**Cáncer de ovario**; modelo biológico. (2006). *Gaceta Mexicana de Oncología*. Volumen 5, Suplemento 3, 2006.
- ⁶**Carlsson**. L., Larsson A., Lindman H. (2009). Elevated levels of thymidine kinase 1 peptide in serum from patients with breast cancer. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 114: 116-120
- ⁷**Cheson**, B.D., Bennett, J.M., Grever, M., Kay, N., Keating, M.J., O'Brien, S. and Rai, K.R. (2011) National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *The American Society of Hematology* 87: 4990-4997
- ⁸**Chiu**, C.C., Li, M.S, T.-S. Fuh BS, W.-L. Chen BS, C.-S. Huang MS. (2005) The suppressed proliferation and premature senescence by ganciclovir in p53-mutated human non-small-lung cancer cells acquiring herpes simplex virus-thymidine kinase cDNA. *Cancer Detection and Prevention* 29; 286–293
- ⁹**Couderc**, R., Mary, R., Veinberg, F. (2004) Marcadores de inflamación en pediatría. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 38 (4): 513-7
- ¹⁰**Cruz** T.P., Villegas, G.V., Ramírez, C.S., (2008). Fundamento biológico y aplicación clínica de los marcadores tumorales séricos. *Revista Ciencias de la Salud*. Vol. 6, numero 002
- ¹¹Crystal structure of a tetramer of thymidine kinase from urea plasma urea lyticum in complex with thymidine (2008). Obtenido el día 7/Sep/11
- ¹²**Di**, R., Giustolisi, F., Lerner, R., Cacciola, S., O'Brien, E. et al. (2001). Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Annals of Oncology* 12: 621-625.
- ¹³**Díaz**, L. T. (s.f.). *Valor predictivo positivo de los niveles de Timidina quinasa en el diagnostico y evolución clínica de pacientes con leucemia aguda linfoblástica*. Tesis de especialidad no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina.



- ¹⁴**Dobrovolsky**, N.V., Bucci, T., Heflich, R., desjardins, J., Richardson, C. (2003) Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 78; 1–10
- ¹⁵**Ellims**, P.H., Eng Gan, T., Medley, G., and Van Der Weyden, M.B. (2011). Prognostic relevance of thymidine kinase isozymes in adult non- Hodgkin's lymphoma. *The American Society of Hematology*, 58: 926-930
- ¹⁶**Eredita**, G.D. Giardina, C., Martellotta, M.,Natale, T., Ferrarese, F. (2001) Factores de pronostico en cancer de mama: valor predictivo del Indice Pronostico de Nottingham en pacientes con seguimiento a largo plazo, tratadas en una única institución. *European Journal of Cancer* (Ed. Espanola) ; 1: 401-406
- ¹⁷**Faderl** S; Talpaz M; Estrov Z; O'Brien S; Kurzrock R; Kantarjian HM. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 341(3):164-72. Obtenido el día 23/Mar/12
- ¹⁸**Fajardo** G. A., Mejía, A. J., Martínez, G. M., Bernáldez, R. R., Paredes, A. R., Flores, A. H. (2000) Incidencia de las leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. *Salud Pública de México / vol.42, no.5*. Obtenido el día 16/Ago/2011
- ¹⁹**Fajardo**, G. A., Mejía, A. J., Martínez, G. M., Hernández, C. L., Mendoza, S. H. Garduño, E. J., (1999) Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev. Panamá. Salud Publica/Pan Am J Public health* 6 (2).
- ²⁰**Foekens**, A.J., Romain, S., Look, P., Martin, P-M., Klijn, G.M.J. (2001) Thymidine kinase and thymidylate synthase in advanced breast cancer: Response to Tamoxifen and chemotherapy. *Cancer Research* 61, 1421-1425.
- ²¹**Galán** G. E., (2002). La Genética Médica: pasado, presente y futuro. *Revista Pediatría de Atención Primaria*. Volumen IV. Número 14. Obtenido el día 5/Sep/11
- ²²**Ghee** Young Kwon, Jaehoon Jeong, Jong Kyu Woo. (2003) Co-expression of bfl-1 enhances host response in the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303; 756–763
- ²³**Gómez**, J.M. (2005) Futuro del tratamiento del carcinoma de tiroides. *Endocrinol Nutr.* 52(Supl 1):45-50
- ²⁴**Greco**, S. Marsigliante, S., Leo, G., Storelli C. (2000). Co-expression of thymidine kinase and cathepsin D in 200 primary breast carcinomas. *Cancer Letters* 160, 13-19
- ²⁵**Gronowitz** J.S., Fischer L.N., Källander C.F.R. (s.f) Thymidine kinase: Biochemical Background and Clinical Applications. I. Background and Use in Gene Therapy. Biovica AB. Uppsala *Science Park*, S-751 83.
- ²⁶**Gronowitz** J.S., Fischer L.N., Källander C.F.R. (s.f.). Thymidine kinase: Biochemical Background and Clinical Applications. II. The Quantitative assay for TK and its clinical use. Biovica AB. *Uppsala Science Park*, S-751 83.



- ²⁷**Gronowitz, J. S., Fischer, L. N., Källander, C.F.R. (s.f.)** Thymidine kinase: Biochemical Background and Clinical Applications. III. Use of TK assay in serum, plasma and other body fluid. Biovica AB. *Uppsala Science Park, S-751 83*
- ²⁸**Gronowitz, J.S., Kallander, C.F.R., Simonsson, B., Hagberg1, H. (1983)** The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Cancer*, 47, 487-495
- ²⁹**Gronowitz, J.S., Killander, C.F.R., Rehn, S., Sundström, C., Glimelius, B. (1995)** Deoxythymidine kinase in the tumour cells and serum of patients with non-Hodgkin lymphomas. *British Journal of Cancer* 71,1099-1105
- ³⁰**Guber, R.S, Arias de Sandoval N., Ruiz de Martínez N., Soria de González, A. (2005).** Valores de referencia para marcadores tumorales séricos dosados por inmunoensayo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 39 (3): 315-22
- ³¹**Guía clínica linfoma y tumores sólidos en personas menores de 15 años. (2005) Ministerio de Salud.** 1st Ed. Santiago: Minsal.
- ³²**Haberkorn U., Khazaie K., Morr I., Altmann A., Müller M., Van Kaick G. (1998).** Ganciclovir uptake in human mammary carcinoma cells expressing herpes simplex virus thymidine kinase. *Nuclear Medicine & Biology*, Vol. 25, pp. 367–373.
- ³³**Hallek, M., Langenmayer I., Nerl, C., Knauf W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., Emmerich, B. (2011).** Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *The American Society of Hematology*. 1999 93: 1732-1737
- ³⁴**Hallek, M., Touitou, Y., Le´vi, F., Mechkouri, M., Bogdan, A., Bailleul, F., et al. (1997).** Serum thymidine kinase levels are elevated and exhibit diurnal variations in patients with advanced ovarian cancer. *Clinical Chimica Acta* 267, 155–166
- ³⁵**Hallek, M., Wanders, L., Strohmeyer, S. and Emmerich, B. (1995)** Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol* 65: 1-5.
- ³⁶**Hendy, A., Magliocco, M.A., Tweigeri, T., Braileanu, G., Creilin, N., Li, H., et al. (2000).** Ovarian cancer gene therapy: Repeated treatment with thymidine kinase in an adenovirus vector and ganciclovir improves survival in a novel immunocompetent murine model. *Am J Obstet Gynecol*. 182(3):553-9.
- ³⁷**Herzfeld, A. and Greengard, O. (1980).** Enzyme activities in human fetal and neoplastic tissues. *Cancer* 46:2047-2054, Obtenido el día 13/Sep/11
- ³⁸**Karbownik, M., Brzeziński, E., Lewinski, A. (2005)** Increased expression of mRNA specific for thymidine kinase, deoxycytidine kinase or thymidine phosphorylase in human papillary thyroid carcinoma. *Cancer Letters* 225, 267–273.
- ³⁹**Kuroiwa, N., Nakayama, M., Fukusa, T., Fukui, H., Ohwada, H. et al. (2001).** Specific recognition of cytosolic thymidine kinase in the human lung tumor by monoclonal antibodies raised against recombinant human thymidine kinase. *Journal of Immunological Methods* 253, 1–11



- ⁴⁰**Lambertini, P.A.**, Guerra, M., Tovar, V. (2007) Linfoma no Hodgkin (LNH) asociado a SIDA en la cavidad bucal.: Reporte de caso clínico. *Acta Odontológica Venezuela*, vol.45, no.1, pp.100-108. ISSN 0001-6365.
- ⁴¹**LIAISON**[®] Thymidine Kinase (310960). DiaSorin Inc 1951 Northwestern Ave-Stillwater, MN 55082 EE.UU.
- ⁴²**Misumi, M.**, Suzuki, T., Moriuchi, S., Glorioso, J.C., Bessho, M. (2003) *In vitro* thymidine kinase/ganciclovir-based suicide gene therapy using replication defective herpes simplex virus-1 against leukemic B cell malignancies (MCL, HCL, B-CLL). *Leukemia Research* 27; 695–699
- ⁴³**Munch-Petersen, B.**, Cloos L., Jensen H.K. Tyrsted G. (1995). Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Advan. Enzyme Regul.* Vol. 35, pp 69-89
- ⁴⁴**Murakami, S.** (1988) Thymidine kinase and its isozyme activities in human thyroid diseases. *Pubmed.* (6):921-30. Obtenido el día 4/Nov/11
- ⁴⁵**Muyombwe, A.**, Olivier, M., Ouellette, M., Papadopoulou, B. (1997) Selective Killing of Leishmania Amastigotes Expressing a Thymidine Kinase Suicide Gene. *Experimental Parasitology* 85, 35 42.
- ⁴⁶**Nagy, H.**, Panis, Y., Fabre, M., Perrin, H., Klatzmann, D., Houssin, D. (1998) Are hepatomas a good target for suicide gene therapy? An experimental study in rats using retroviral-mediated transfer of thymidine kinase gene. *Surgery* 123:19-24.
- ⁴⁷**Naranjo, D.**, Ramos, E., Espinosa, I., González, M., Vega, A., Martínez, S. (2005) Hibridación Dot-Blot para la detección del virus de la viruela aviar en monocapas de la línea celular qt35 infectadas. *Rev. Salud Anim.* Vol. 27 No. 1; 55-58
- ⁴⁸**O'Neill, K.L.**, Robertson, J.F.R., Thomas, W.M., McKenna, P.G., Hardcastle, J.D. (1995) Serum thymidine kinase in colorectal neoplasia. *European Journal of Surgical Oncology* 21: 632-634
- ⁴⁹**O'Neill, K.L.O.**, Zhang, F., Fuja, D.G. and Murray, B.K. (2007). Thymidine Kinase 1- A pronostic and diagnostic en ALL and AML patients. *Leukemia* 21, 560–563. doi:10.1038/sj.leu.2404536; Publisher online. Obtenido el día 10/Sep/11
- ⁵⁰**O'Neill, K.L.**, Grigsby, R. V., Fairbairn, D. W. (1995) Thymidine kinase: the future in breast cancer prognosis. *The Breast*; 4.7943
- ⁵¹**O'Neill, K.L.**, Robertson, J.R.F., Thomas, M.W., McKenna, P.G., Blamey, R.W.(1990) Thymidine kinase in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 62, 663-667
- ⁵²**Pardee A.B.** (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. Vol. 246 no. 4930 pp. 603-608. Obtenido el día 20/Ago/11
- ⁵³**Quero, H. A.**, Hernández, A. J., Socorro, L. Z., Pérez, B. A. (2006). Tumores del ovario en niñas y adolescentes en un hospital general. *Revista Mexicana de Pediatría*. Vol. 72 Núm. 4 pp. 174-178
- ⁵⁴**Rey, N.S.** (2007) *Cancer of thyroid: Emphasis on the histogenesis and anatomopathological aspects*. Tesis de licenciatura no publicada. Atlantic international university, Honolulu Hawaii U.S.A.



- ⁵⁵**Rizo, R. P.,** Sánchez, C. F., González, R. A., Betancour, C. M., Meneses, G. A., Mohar, A. Kuri, M. P. (2005). Mortalidad por leucemias en menores de 20 años México 1998-2002. *Medigrafic Artemisa en línea*. Vol. 62. Obtenido el día 20/Ago/11
- ⁵⁶**Romain, S.,** Bendahl, P., Guirou, O., Malmström, P. (2001) DNA -synthesizing enzymes in breast cancer (thymidine kinase, thymidylate synthase and thymidylate kinase): association with flow cytometric s-phase fraction and relative prognostic importance in node-negative premenopausal patients. *Int. j. Cancer* (pred. oncol.): 95, 56–61.
- ⁵⁷**Romero, G.G.,** Naves, S.J., Horna, L.A., Aspe, J.C., Molina, R.R., Ponce, P.A. (2005) Factores de riesgo asociados con cáncer de ovario. *Ginecol Obstet Mex*;73:611-7
- ⁵⁸**Sakamoto, L.,** Ohbayashi, T., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Inokumal, H. (2009) Serum thymidine kinase activity as a useful marker for bovine leukosis. *J Vet Diagn Invest* 21:871–874.
- ⁵⁹**Svobodova, S.,** Topolcan, O., Holubec, L., Treska, V., Sutnar, A., Rupert, K., Kormunda, S., Rousarova, M., Finek, J. (2007) Prognostic importance of thymidine kinase in colorectal and breast cancer. *Anticancer Research* 27: 1907-1910.
- ⁶⁰**Tarvider, K.,** Sharma, S.K. (2004) Markers of small cell lung cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 2:10.
- ⁶¹Timidine Kinase 1-A pronostic indicator in ALL and AML patients. (2007) *Leukemia* 21, 560–563. doi:10.1038/sj.leu.2404536
- ⁶²**Van der Gaast, A.,** Van Putten W.L.J., Oosterom, R., Cozijnsen, M., Hoekstra, R. (1991). Prognostic value of serum thymidine kinase, tissue polypeptide antigen and neuron specific enolase in patients with small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 64, 369-372
- ⁶³**Vassallo, J.A.;** Barrios, E. (2003). Las leucemias. *Actualización Ponderada de los Factores de Riesgo del Cáncer*. Obtenido el día 16/Ago/11
- ⁶⁴**Ventura, G. J.** (2011) El análisis de la actividad de la timidina quinasa en suero puede ayudar a discriminar entre enfermedad benigna y hemangiosarcoma en perros que presentan hemoabdomen y una masa en el bazo. *Portal Veterinaria Vargas*. Obtenido el día 14/Dic/11
- ⁶⁵**Vera, J.F.,** Zarante, M.I., Suárez, O.F. (s.f.) Perspectivas de la Terapia Génica para el manejo del Cáncer de Próstata en Colombia. Obtenido el día 24/Nov/11
- ⁶⁶**Vidal, N.,** Paules, Ma., Villabona, C., Gómez J., Ferrer, I. (2003) Cromogranina A en adenomas hipofisarios humanos. *Rev. Esp. Patol.*; Vol 36, n.º 2: 189-194
- ⁶⁷**Votava, T.,** Topolcan O., Holubec L. Cerna, Z., Sasek, L., Finek, J., Kormunda, S. (2007). Changes of serum thymidine kinase in children with acute leukemia. *Anticancer Research* 27: 1925-1928
- ⁶⁸**Wang, M.,** Rancourt, C., Navarro, J., Krisky, D., Marconi, P., Oligino, T. et al. (1998) High-efficacy thymidine kinase gene transfer to ovarian cancer cell lines mediated by herpes simplex virus type 1 vector. *Gynecologic Oncology* 71, 278-287.



⁶⁹Willecke K., Teber T., Kucherlapati RS., Ruddle F.H. (1977). **Human mitochondrial thymidine kinase is coded for by a gene on chromosome 16 of the nucleus.** *May*;3 (3):237-45. Obtenido el día 7/Sep/11

⁷⁰Yusa, T., Yamaguchi, Y., Ohwada, H. (1988) Activity of the Cytosolic Isozyme of Thymidine Kinase in Human Primary Lung Tumors with Reference to Malignancy. *Cancer Research*; 48:5001-5006

Páginas Electrónicas

⁷¹Almaguer, G.C., (s.f.) *Leucemia Linfocítica*. Obtenido el día 19/Ago/11 desde <http://ebookbrowse.com/gdoc.php?id=141015228&url=e56515d44232ec5a7284c3ef99ebb945>

⁷²Barroso, A.M^a., (s.f.) Linfomas no Hodgkin. *Instituto Nacional de Oncología y Radiología*. Obtenido el día 29/Sep/11 desde <http://fcmfajardo.sld.cu/jornada/conferencias/oncologia/nohdg.htm>

⁷³Bioquímica 1º de Medicina. (s.f.) Metabolismo de nucleótidos. Obtenido el día 5/Sep/11 desde http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica/material-de-clase-1/Tema28_Metabolismo_nucleotidos.pdf

⁷⁴*Cáncer de mama*. (2007) Núcleo de liderazgo en salud. Obtenido el día 8/Nov/11 desde <http://www.jalisco.gob.mx/wps/wcm/connect/e57bc6004f2e4e61a19bab4a32ff0230/PME+ca+de+mama.pdf?MOD=AJPERES>

⁷⁵Cáncer de ovario. (2012). *American Cancer Society*. Obtenido el día 22/Nov/11 desde <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002317-pdf.pdf>

⁷⁶Cáncer de Tiroides. (2005) *The American Thyroid Association*. Obtenido el día 3/Nov/11 desde <http://www.thyroid.org/patients/brochures/Spanish/SpanishCancerOfTheThyroid.pdf>

⁷⁷Cáncer ovárico. (s.f.) *Medline plus*. Obtenido el día 26/Mar/12 desde <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000889.htm>

⁷⁸*Capítulo 1 la Leucemia*. (s.f.) obtenido el día 16/Ago/2011 desde http://caterina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lco/dada_g_i/capitulo1.pdf

⁷⁹Carbonell, T., Anaya, P.A., Carbonell, A.C. (s.f.) Linfoma, generalidades y caso clínico. Obtenido el día 29/Sep/11 desde http://www.umivale.es/digitalAssets/100/100526_071108_Linfoma_Generalidades_Caso_cl_nico_Carbonell_Tatay_A_Anaya_P_Carbonell_Aznar_C_DUE_.pdf

⁸⁰*Diagnostico y tratamiento de cáncer de pulmón*. (2006) Fundación MM. Obtenido el día 14/Nov/11 desde http://seom.d107.dinaserver.com/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupocooperativo/2006/oncosur/guia_clinica_oncosur_cancerpulmon.pdf



- ⁸¹El cáncer aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. (2004). Instituto Nacional de Cancerología. Obtenido el día 16/Ago/11 desde <http://www.cancer.gov.co/documentos/Cartillas/Elcancer.pdf>
- ⁸²Fares, T.H., Gentili, M., Robin, A. (2010) Ferritina. *Biblioteca virtual*. Obtenido el día 14/Oct/11 desde <http://biodiagnostics.com.mx/187.php>
- ⁸³Fierro, A.F., López, A.F., García, G.R. (s.f.) *Clasificación por Estadíos del Linfoma Hodgkin. Ann Arbor*. Obtenido el día 26/Mar/12 desde http://www.sccp.org.co/plantilas/Libro%20SCCP/Lexias/tablas/oncologia/hodgkin_estadios.htm
- ⁸⁴Fundación Internacional Josep Carreras (2009). *Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) del adulto*. Obtenido el día 19/Ago/11 desde http://www.fcarreras.org/es/leucemia-linfobl%C3%A1stica-aguda-lla-del-adulto_24033
- ⁸⁵Ganciclovir. (2002) The Drug monitors. Obtenido el día 29/Nov/11 desde <http://www.thedrugmonitor.com/ganciclovir.html>
- ⁸⁶Gines, J., Husd, M.I. (s.f.) *Caso clínico: Leucemia mieloide crónica*. Obtenido el día 19/Ago/11 desde <http://es.scribd.com/doc/2582852/LMC-LEUCEMIA-MIELOIDE-CRONICA>
- ⁸⁷Gómez, F. (s.f.) Urgencias abdominales. Obtenido el día 14/Dic/11 desde http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=hemoabdomen%20&source=web&cd=3&ved=0CD AQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.campusveterinariosenweb.com%2Ffile.php%2F1%2Fmodd ata%2Fforum%2F14%2F13631%2FUrgencias_abdominales.doc&ei=D2jpTuf0CqS42QWVxfCaC Q&usg=AFQjCNH0CiZFCv11KKFKPjVVecjYCzhxwA
- ⁸⁸Gómez, G.A. (s.f.). *Leucemias agudas, clasificación, diagnóstico, tratamiento y aportación de las nuevas técnicas diagnósticas*. Obtenido el día 19/Ago/11 desde <http://www.aebm.org/jornadas/nino%20jesus/1.-%20Leucemias%20Agudas%20I.pdf>
- ⁸⁹Hemoblastosis: definición. (s.f.) *Diccionario médico*. Obtenido el día 14/Oct/11 desde <http://salud.doctissimo.es/diccionario-medico/hemoblastosis.html>
- ⁹⁰Información sobre Linfoma no Hodgkin. (s.f.) *Asociación linfoma mieloide y leucemia*. Obtenido el día 16/Ago/11 desde <http://www.aeal.es/diamundial2009/docs/Informaci%C3%B3n%20sobre%20linfoma%20no%20Hodgkin.pdf>
- ⁹¹Introducción a los inmunoensayos. (s.f.). *Inmunochimistry Diagnostic*. Obtenido el día 12/Sep/11 desde http://latinoamerica.abbottdiagnostics.com/ciencia/pdf/1_d.pdf
- ⁹²Leucemia linfocítica crónica. (2010). *Medline plus*. Obtenido el día 19/Ago/11 desde <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/chroniclymphocytic leukemia.html>
- ⁹³*Leucemia mieloide aguda infantil/otras malignidades mieloides: Tratamiento (PDQ®)*. (2011). Instituto Nacional del Cáncer. Obtenido el día 19/Ago/11 desde <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/LMAinfantil/Patient/page1>
- ⁹⁴Marcador Tumoral CA-125 en el Diagnóstico de Cáncer Ovárico. (2009) *Acontecer médico*. Obtenido el día 23/Nov/11 desde http://www.acontecermedico.com/index/index.php?option=com_content&view=article&id=212:ma



rcador-tumoral-ca-125-en-el-diagnostico-de-cancer-ovarico&catid=37:actualidades-en-medicina&Itemid=83

⁹⁵Marcadores tumorales. (2010). *American Cancer Society*. Obtenido el día 14/oct/2011 desde; <http://www.cancer.org/Espanol/servicios/Comocomprendersudiagnostico/fragmentado/marcadores-tumorales>

⁹⁶Martin, R. C., Ortega, M.L., (2003). Clasificación de los linfomas no Hodgkin. Obtenido el día 28/sep/11 desde <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=321787>

⁹⁷Ministerio de salud. (2007). Guía Clínica Leucemia del Adulto. Santiago: Minsal. Obtenido el día 16/Ago/11 desde <http://www.redsalud.gov.cl/archivos/guiasges/leucemia.pdf>

⁹⁸Pitoia, F. (s.f.) Terapia Génica en tumores endocrinos. Obtenido el día 29/Nov/11 desde http://scholar.google.com/scholar?q=terapia+genica+en+tumores+endocrinos&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart

⁹⁹Ronchera, C.L., González, J. M^a.(s.f.) Terapia Génica. Obtenido el día 24/Nov/11 desde <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/cap06.pdf>

¹⁰⁰Rosell, M.A., Juan, M.M^a., Rafecas, R.F., Valencia, P. (s.f.). *Leucemias*. Obtenido el día 19/Ago/11 desde <http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/Manual%20de%20urgencias%20y%20Emergencias/leucemia.pdf>



Referencias de figuras

- 1: Tomada y modificada [en línea] el día 5/sep/11 desde http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica/material-de-clase-1/Tema28_Metabolismo_nucleotidos.pdf
- 2: Tomada [en línea] el día 6/sep/11 desde <http://en.wikipedia.org/wiki/File:2B8T.png>
- 3: Tomada [en línea] el día 23/mar/11 desde http://latinoamerica.abbottdiagnostics.com/ciencia/pdf/1_d.pdf figura 1-8
- 4: Tomada [en línea] el día 19/ago/11 desde <http://www.aebm.org/jornadas/nino%20jesus/1.-%20Leucemias%20Agudas%20I.pdf> Leucemia aguda vista al m. óptico
- 5: Tomada [en línea] el día 19/ago/11 desde <http://ebookbrowse.com/gdoc.php?id=141015228&url=e56515d44232ec5a7284c3ef99ebb945> Leucemia Linfocítica
- 6: Tomada [en línea] el día 20/ago/11 desde <http://es.scribd.com/doc/2582852/LMC-LEUCEMIA-MIELOIDE-CRONICA>
- 7: Tomada [en línea] el día 19/ago/11 desde <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/chroniclymphocyticleukemia.html>
- 8: Tomada y modificada (“Votava T., 2007”)
- 9: Tomada y modificada (“Votava T., 2007”)
- 10: Tomada y modificada (“Votava T., 2007”)
- 11: Tomada y modificada (“Votava T., 2007”)
- 12: Tomada y modificada (“Votava T., 2007”)
- 13: Tomada [en línea] el día 22/sep/11 desde <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=56033&pagina=3>
- 14: Tomada y modificada (“Ellims, P.H., 2011”)
- 15: Tomada y modificada (“Ellims, P.H., 2011”)
- 16: Tomada y modificada (“Gronowitz, J.S., 1983”)
- 17: Tomada y modificada (“Gronowitz, J.S., 1983”)
- 18: Tomada y modificada (“Gronowitz, J.S., 1983”)
- 19: Tomada y modificada (“Gronowitz, J.S., 1983”)
- 20: Tomada y modificada (“Gronowitz, J.S., 1983”)
- 21: Tomada y modificada (“Karbownik, M., 2005”)
- 22: Tomada y modificada (“Karbownik, M., 2005”)
- 23: Tomada y modificada (“Karbownik, M., 2005”)
- 24: Tomada y modificada (“Yusa, T., 1988”)
- 25: Tomada y modificada (“Yusa, T., 1988”)
- 26: Tomada y modificada (“Hallek, M., 1997”)



- 27: Tomada y modificada (“Hallek, M., 1997”)
- 28: Tomada [en línea] el día 24/nov/11 desde <http://www.urologiacolombiana.com/revistas/marzo-2004/002.pdf>
- 29: Tomada [en línea] el día 29/nov/11 desde <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/cap06.pdf>
- 30: Tomada y modificada (“Chiu, C.C., 2005”)
- 31: Tomada y modificada (“Chiu, C.C., 2005”)
- 32: (“Dobrovolsky, N.V., 2003”)
- 33: (“Dobrovolsky, N.V., 2003”)
- 34: (“Dobrovolsky, N.V., 2003”)

Referencias de cuadros

- 1: LIAISON[®] Thymidine Kinase (310960)
- 2: LIAISON[®] Thymidine Kinase (310960)
- 3: LIAISON[®] Thymidine Kinase (310960)
- 4: Tomada y modificada (“Di, R., 2001”)
- 5: Tomada y modificada (“Di, R., 2001”)
- 6: Tomada y modificada (“Di, R., 2001”)
- 7: Tomada y modificada (“Di, R., 2001”)
- 8: Tomada y modificada (“Ellims, P.H., 2011”)
- 9: Tomada y modificada (“Gronowitz, J.S., 1983”)
- 10: Tomada y modificada (“Gronowitz, J.S., 1983”)
- 11: Tomada y modificada (“O'Neill, K.L., 1990”)
- 12: Tomada y modificada (“O'Neill, K.L., 1990”)
- 13: Tomada y modificada (“Svobodova, S., 2007”)
- 14: Tomada y modificada (“Svobodova, S., 2007”)
- 15: Tomada y modificada (“Hallek, M., 1997”)
- 16: Tomada y modificada (“Sakamoto, L., 2009”)