



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**SECRETARÍA DE SALUD
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA INTERNA**

**“EXPRESIÓN DE CD49F COMO MARCADOR PROLIFERATIVO EN
PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA DE NOVO”**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA:
DRA. ALEJANDRA MENDOZA TORRES**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. FAUSTINO LEYTO CRUZ
ASESOR DE TESIS:
M EN C. MONICA SIERRA MARTÍNEZ**

Número de Registro de Protocolo HJM 2517/15-R

MEXICO, D.F. JULIO DE 2015



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

DR. CARLOS VIVEROS CONTRERAS
JEFE DE ENSEÑANZA

DR. JOSÉ MANUEL CONDE MERCADO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO
EN LA ESPECIALIDAD DE MEDICINA INTERNA

DR. FAUSTINO LEYTO CRUZ
DIRECTOR DE TESIS

M EN C. MONICA SIERRA MARTÍNEZ
ASESOR DE TESIS

"El hombre vale por lo que sirve, no por lo que sabe y menos por lo que tiene"

Dr. Manuel Velasco Suárez

AGRADECIMIENTOS

Para decir la verdad, poca elocuencia basta... y la verdad es que en este camino nunca estuve sola, mis padres, mi familia y amigos, cada uno a su modo, me enseñaron que sólo hay felicidad donde hay virtud y esfuerzo. Por otro lado todos mis maestros principalmente aquellos del área de Hematología y Medicina Interna, me enseñaron que los grandes conocimientos engendran las grandes dudas.

Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran. A cada uno de ustedes les doy las gracias por acompañarme siempre.

INDICE

I.	Introducción.....	6
II.	Marco Teórico.....	7
III.	Planteamiento del problema.....	18
IV.	Justificación.....	19
V.	Objetivos.....	21
	1. Objetivos generales.....	21
	2. Objetivos específicos.....	21
VI.	Hipótesis.....	22
	1. Hipótesis de la investigación.....	22
	2. Hipótesis nula.....	22
	3. Hipótesis alternativa.....	22
VII.	Metodología de la investigación.....	23
	1. Diseño del estudio.....	23
	2. Población de estudio y tamaño de la muestra.....	23
	3. Criterios de inclusión.....	23
	4. Criterios de exclusión.....	23
	5. Material y métodos.....	23
	6. Técnica y procedimiento.....	24
	7. Consideraciones éticas.....	24
	8. Variables de interes.....	24
	9. Análisis estadístico.....	25
VIII.	Resultados.....	26
IX.	Discusión.....	31
X.	Conclusión.....	37
XI.	Sugerencias del estudio.....	38
XII.	Bibliografía.....	39

I. INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación descontrolada de células inmaduras que desplazan la hematopoyesis normal. De forma general se encuentran dentro de las principales causas de morbilidad y mortalidad relacionadas con el cáncer (5.8 del total de defunciones en 2002). La incidencia de la leucemia linfocítica aguda se ha incrementado a 30.9 % en un lapso de 40 años. En México, el registro epidemiológico de Neoplasias Malignas informa por cada 100 000 habitantes de la población general una incidencia anual de leucemias agudas de 2; de leucemia linfocítica aguda de 1.3 y de leucemia mielocítica aguda de 0.7. La incidencia ajustada a la edad es de 1.7 por 100,000 habitantes al año, teniendo aproximadamente 6020 casos nuevos y 1440 muertes en 2014, con edad media de diagnóstico de 14 años hasta en 60% de los casos y hasta 24% a los 45 años o más, representando un 20% de todas las leucemias en el adulto, respecto a las leucemias de estirpe linfocítica. La leucemia mielocítica aguda es el tipo de leucemia más común en adultos, ocupando el mayor número de muertes. Un estimado de 18860 casos nuevos en 2014 con 10460 muertes.

El diagnóstico se realiza mediante aspirado de médula ósea encontrando más de 20% de blastos. La realización de inmunofenotipo, para determinar su origen como T o B y su grado de maduración. El objetivo primario del tratamiento de las leucemias agudas es inducir una remisión completa de la enfermedad con diversas combinaciones de quimioterapias sistémicas, considerando una terapia puente para trasplante de médula ósea según las características individuales de cada paciente, considerando el riesgo según ciertos factores como lo son la edad, cuenta de leucocitos al diagnóstico y el resultado del análisis de citogenética , importantes factores para determinar el riesgo y el pronóstico de cada paciente. Nuevos marcadores de proliferación se encuentran en estudio en pacientes neoplasias hematológicas, tales como la integrina CD49f, que en recientes años ha sido de interés por su asociación con la expresión y la tasa de actividad de diversas vías de señalización en pacientes con neoplasias sólidas diversas así como hematológicas, incluidas las leucemias agudas.

II. MARCO TEÓRICO

El sistema sanguíneo sirve como paradigma para entender a la célula madre, su biología y su relación con el envejecimiento, enfermedad y oncogénesis. Debido a que las células sanguíneas maduras son de vida corta, las células madre son requeridas a lo largo de toda la vida para sustituir multilinajes progenitores. La célula hematopoyética madre reside a nivel de la médula ósea en la cima jerárquica para convertirse en linajes específicos.¹

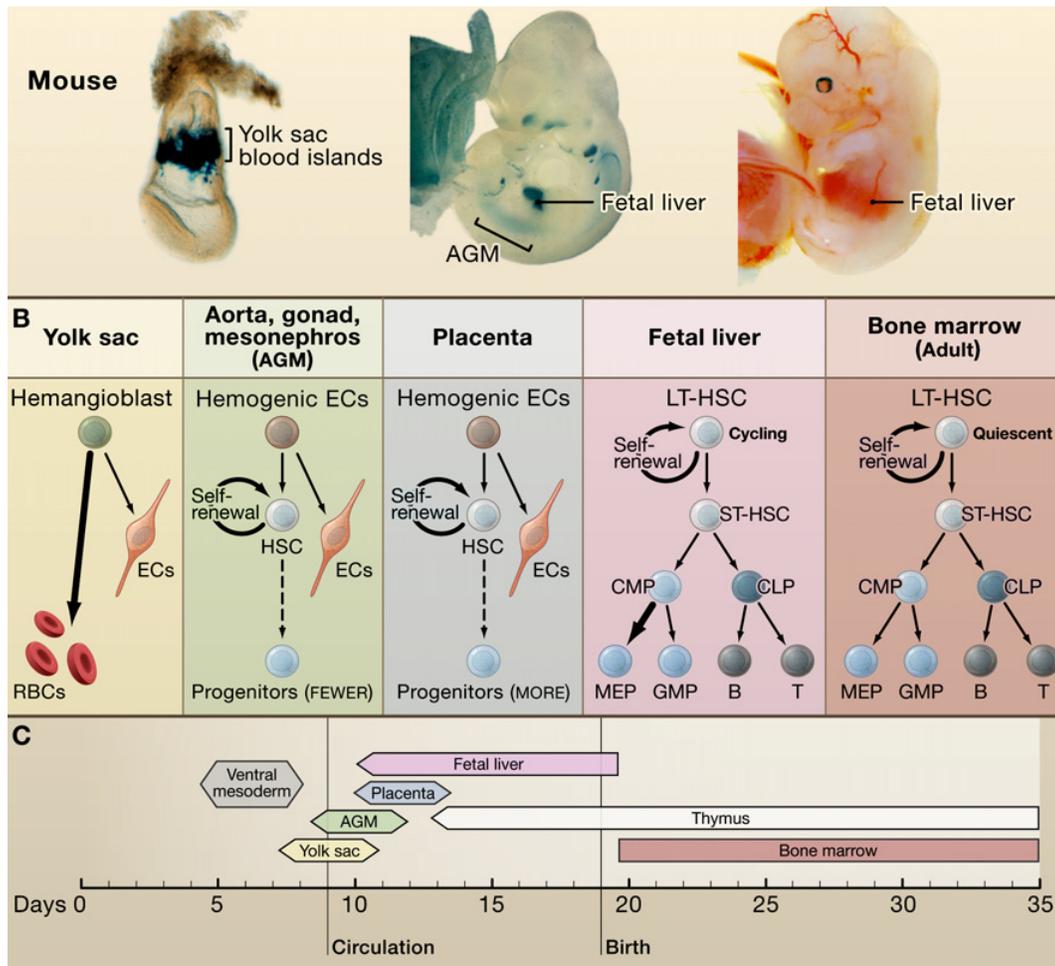


Figura 1. Regulación de la hematopoyesis en etapa embrionaria¹

- La hematopoyesis ocurre primero en saco vitelino, islotes sanguíneos, mesonefros, placenta e hígado fetal.
- En cada punto de localización de hematopoyesis se favorece la producción de linajes sanguíneos específicos.

En vertebrados, la producción de progenitores hematopoyéticos se logra por la diferenciación y especificación de distintas células embrionarias de diversos sitios que cambian de manera constante durante el desarrollo embrionario, desde el saco vitelino, el mesonefros, placenta, hígado fetal y finalmente la médula ósea, como se muestra en la Figura 1. La propiedades de la célula madre hematopoyética de cada sitio difieren, reflejando la existencia de diversos nichos.

En modelos de diferenciación hematopoyética actuales se sugiere que la célula adquiere potencial de diferenciación por divisiones simétricas y asimétricas, como se puede observar en la figura 2, donde de acuerdo a factores ambientales y del propio nicho, se establece el grado de diferenciación definitiva de la célula. Cada progenitor intermedio y monopotente tiene combinaciones específicas de factores de transcripción y remodeladores de cromatina. En general se sabe que una vez que ha alcanzado el linaje, adquiere un fenotipo específico no puede cambiar más.²

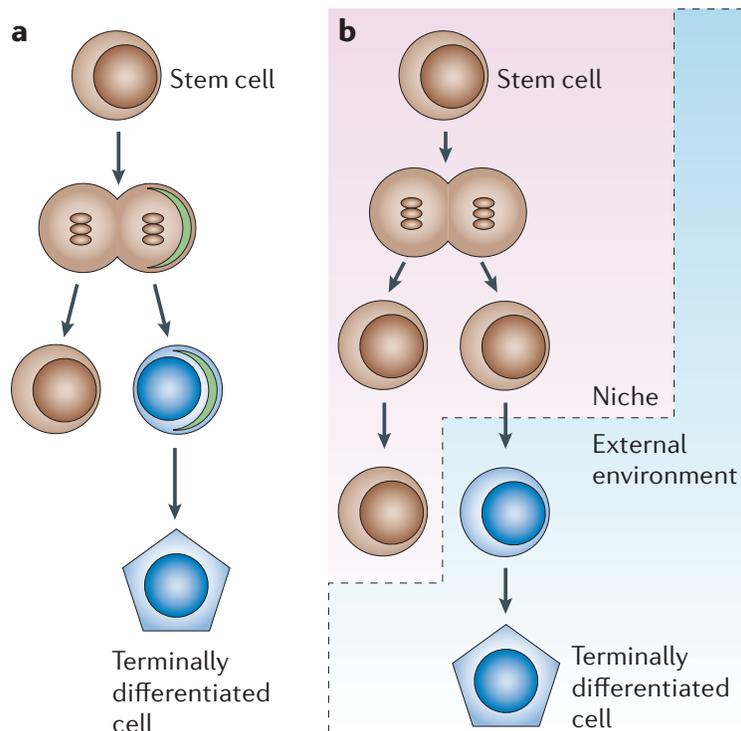


Figura 2. División celular asimétrica²

- a. Durante la división asimétrica donde solo una célula hija logra diferenciación.
- b. Durante la asimetría ambiental, después de una división, una de las dos células hijas se mantendrá en autorregeneración en el nicho mientras que las otras se relocalizarán en el nicho para promover otro tipo de diferenciación.

Las células madre adultas están presentes en la mayoría de los tejidos de auto renovación, como la piel, epitelio intestinal y sistema hematopoyético, con la capacidad de producir más de una célula madre del mismo tipo y generar progenitoras diferenciadas y maduras para reparación de tejidos. El mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y su regulación in vivo depende de un microambiente específico el cual ha sido llamado nicho hematopoyético.

Un nicho es definido como un espacio donde se aloja a las células madre y se mantiene el proceso de auto renovación en ausencia de diferenciación.³

La estructura y localización así como la base molecular y celular de la actividad del nicho sigue siendo un misterio. Muchas de las señalizaciones entre las células madre y el nicho permiten mantenimiento, autorenovación y diferenciación.⁴⁻⁵

Las células hematopoyéticas madre contribuyen sustancialmente a la homeostasis del sistema hematopoyético con una tasa de recambio alta. Estas pueden servir de reservorio para reactivarse en respuesta a estrés o injuria y pueden alojarse en una porción quiescente en el nicho hematopoyético.^{6,7,8}

Actualmente no queda del todo claro todas las funciones de las células madre del nicho, se ha propuesto regeneración, inhibición o diferenciación según sea el caso, con la coexistencia de varios tipos de nichos que interactúan de manera dinámica y en conjunto. La principal función es la autoregeneración de las células hematopoyéticas madre del nicho para garantizar un ambiente adecuado para la división celular asimétrica. Para llevar a cabo la autorenovación, las células se anclan en los centros del nicho cerca de los bordes que separan el nicho del microambiente que no pertenece al nicho para proveer de vías de señalización que pueden inducir diferenciación y división celular.

Se ha observado en modelos con ratones con trastornos en la hematopoyesis, donde se han encontrado implicados osteoblastos y osteoclastos, por lo que se cree que también estas células están vinculadas directamente con el buen funcionamiento del nicho y su microambiente.³

Por lo anterior se ha separado al nicho en diversos subtipos, el nicho endosteal de la médula ósea, donde se ha visto que los osteoblastos secretan gran cantidad de citocinas que promueven la proliferación de las células hematopoyéticas.⁹⁻¹¹ Los osteoclastos por lo tanto son una parte esencial en el nicho ya que limitan su tamaño y nivel de actividad.¹²⁻¹³

En este nicho se producen además progenitores multipotenciales que dan origen a linajes mieloides y linfoides.

El nicho vascular de la médula ósea, con grandes cantidades de células CD150 adheridas a endotelio fenestrado de los sinusoides medulares, con células fenotípicamente distintas a la microvasculatura de otros tejidos, expresan ligandos de quimiocina 12 (CXCL12) y moléculas de adhesión como selectinas y moléculas de adhesión celular vascular tipo 1 (VCAM1) que son importantes para la movilización, mantenimiento y engranaje de las células madre hematopoyéticas.³

Específicamente las células endoteliales de los sinusoides medulares otorgan supervivencia, proliferación y diferenciación a progenitores mieloides y megacariocíticos, mientras que las células estromales de la médula ósea liberan factores que inhiben la maduración de progenitores megacariocíticos. Por lo que se ha demostrado que la maduración mioide y megacariocítica se inicia en este nicho vascular.

Sin embargo el nicho vascular no es suficiente para mantener la hematopoyesis, por lo que es un nicho secundario requiriendo siempre un flujo constante de células madre del nicho endosteal.

El nicho endosteal y vascular interactúan de modo libre, en respuesta a vías de señalización específicas que favorecerán tanto la movilización como el reclutamiento de células madre hematopoyéticas, todo esto favorecido por selectinas e integrinas, citocinas, moléculas de señalización y receptores.¹⁴

Las integrinas son proteínas heterodiméricas transmembrana que se expresan en todas las células nucleadas. Estas moléculas son receptores que regulan la adhesión de las proteínas a la matriz extracelular así como interacciones intercelulares. Existen aproximadamente 17 cadenas de integrinas y 8 pares de cadenas en patrones específicos y dependiendo del tipo celular se expresan. Además de su papel regulando adhesión celular, se ha visto que las integrinas traducen señales intracelulares que regulan rearrreglos del citoesqueleto de actina, movilización celular, activación de algunas funciones celulares, transcripción genética, proliferación celular y supervivencia, siendo estas dos últimas características motivo de reciente investigación. En el contexto del cáncer, la adhesión celular dependiente de integrinas juega un papel crítico, determinando la habilidad de la célula para extender los márgenes tumorales para invadir localmente y posteriormente tener poder metastásico.¹⁵

Las integrinas son los receptores de superficie de membrana para las moléculas de la matriz extracelular, junto con FAK un elemento clave en la traducción de señalizaciones propiciado por integrinas. Al autofosforilizarse FAK, se favorece la unión con Src propiciando la activación de cinasas. El complejo FAK/Src también lleva a la activación de vías con PI3K.¹⁵

El CD49f es un receptor para laminina, moléculas presentes en sitios de desarrollo hematopoyético. Son expresados en células hematopoyéticas, epiteliales y endoteliales, particularmente expresadas altamente en células madre normales, encargadas de diversas funciones biológicas asociadas en particular con el

microambiente y nichos celulares que proveen de señales críticas para autoregeneración y pluripotencialidad.¹⁶

En la glándula mamaria, el microambiente otorga señales de control para modular la conducta de células epiteliales madre y células progenitoras, y las integrinas son importantes marcadores para identificar a este tipo de células, distinguiendo precursores de linajes celulares de acuerdo a su perfil de integrinas. Se ha encontrado a su vez que las células que expresan este complejo de integrinas juegan un importante papel en el anclaje a la matriz extracelular.¹⁷

Se ha visto que el bloqueo funcional de $\alpha 6$ integrinas o CD49f reduce significativamente la movilización de células progenitoras hacia los nichos hematopoyéticos en la médula ósea en ratones irradiados de manera letal, otorgando la primera evidencia de que CD49f tiene impacto sobre el “homing” de las células hematopoyéticas.¹⁸

El CD49f es codificado por el gen integrina $\alpha 6$ (ITGA6). Se asocia con la cadena integrina $\beta 1$ para formar VLA 6 y con la cadena integrina $\beta 4$ para formar TSP180 ambos con funciones de receptor de laminina. Estudios en modelos murinos y en mutaciones genéticas humanas han demostrado que el CD49f juega un papel importante en la adhesión celular. Además recientes estudios han propuesto el papel de CD49f para mantener pluripotencialidad en las células madre mesenquimatosas así como iniciación tumoral y poder metastásico en diversos tipos de cáncer. Se ha investigado este biomarcador en la oncogénesis como marcador de superficie de diversos cánceres como el osteosarcoma, además que se ha propuesto como blanco terapéutico. En ensayos con xenoinjertos muestran que las poblaciones celulares que expresan de manera alta el CD49f muestran un comportamiento tumoral agresivo. Se ha observado que el inhibir CD49f disminuye la actividad tumoral. Por lo anterior se ha propuesto al CD49f como un potencial marcador de superficie para identificar y tratar tumores de comportamiento agresivo, como el osteosarcoma y tumores prostáticos.³²

La expresión de ITGA6/CD49f se ha asociado con pobre pronóstico, reducción en la supervivencia y mayor probabilidad de extensión metastásica. ITGA6 se expresa en células madre hematopoyéticas humanas. El ligando de ITGA6, la laminina 511, se expresa de manera abundante en el hueso humano y es un componente esencial del nicho medular para la supervivencia de las células madre independiente a la expresión de citocinas y factores de crecimiento. Landowski y colaboradores propusieron en un estudio en modelos murinos el bloqueo con anticuerpos monoclonales anti ITGA6 (J8H). Se injertó de manera intracardiaca en ratones macho células tumorales prostáticas humanas y una semana después se inició J8H. Se monitorizó la progresión tumoral por TAC. Los ratones que recibieron J8H mostraron progresión radiográfica en un 40% comparado con los controles que tuvieron un 80% de progresión de lesiones en tibia y fémur a las 5 semanas. Mediante análisis de Kaplan–Meier se demostró mejor tasa de supervivencia en los ratones tratados con J8H. Se observó que la inhibición de ITGA6 bloquea la progresión tumoral ofreciendo una alternativa no citotóxica para pacientes con enfermedad ósea metastásica.³³

Se ha logrado de manera exitosa silenciar la actividad de ITGA6, de células epiteliales del timo promoviendo defectos a nivel de adhesión celular hasta en un 80% por medio de transferencia de oligonucleótidos después de 48 horas. Este efecto seguido por una inhibición significativa de la proteína CD49f detectado por citometría de flujo o inmunofluorescencia.³⁴

En otros estudios de pacientes con carcinoma de células escamosas esofágico se ha visto altamente expresado el gen ITGA6, jugando un papel importante en la progresión, proliferación y capacidad invasiva, por lo que se ha propuesto como factor pronóstico y terapéutico en análisis in vitro e in vivo.³⁵

La interacción de integrinas en procesos de supervivencia y proliferación involucran vías de señalización como FAK (Cinasas de adhesión focal), AKT y PI3K (Fosfatidilinositol 3 cinasa). La activación escalonada se muestra en la Figura 3. La vía de PI3K se inicia gracias a la activación de integrinas que traducen señales de supervivencia desde la matriz extracelular a las células, llevando a la

inhibición de p53. Además la activación de AKT se lleva gracias a cascada de cinasas de PI3K que además puede fosforilar Mdm2 resultando en inactivación y degradación de p53. Adicionalmente p53 juega un papel importante en la inducción de p21 después de daño en DNA y en la inducción de p16 después de senescencia prematura. Se ha visto en algunos modelos de progresión de carcinoma prostático que la integrina CD49f es requerida para la migración y activación. En modelos murinos con infarto a miocardio, CD49f puede ser un marcador con alto potencial terapéutico, ya que puede generar injertos multilíneaje de células hematopoyéticas.¹⁹

La actividad incrementada de PI3K/AKT/mTOR se ha observado en gran cantidad de procesos malignos. Esta vía puede funcionar por lo tanto como un factor que favorece la supervivencia en precursores leucémicos tempranos y su inhibición puede tener un impacto terapéutico importante.

La cascada de PI3K, esquematizada en la Figura 3, es activada por múltiples estímulos celulares principalmente por receptores de tirosin cinasa que activan isoformas clase Ia y Ib de PI3K. PI3K es un heterodímero compuesto de una subunidad catalítica p110 y la subunidad reguladora p85. AKT es una cinasa de serina/treonina expresada en 3 isoformas, tipo 1,2 y 3. AKT 1 y 3 son expresadas altamente en células madre hematopoyéticas. mTOR es una proteína cinasa serina/treonina con importante participación en el crecimiento y la supervivencia en respuesta a nutrientes, energía, señales de estrés, hormonas y factores de crecimiento. Esta cinasa es parte de dos complejos, mTORC1 y mTORC2, con diferente estructura y función. mTORC1 estimula la síntesis proteica a través de la fosforilación de importantes reguladores de la traducción de RNAm y síntesis ribosomal. Esto incluye fosforilación y activación de S6 proteína ribosomal cinasa y la fosforilación e inactivación de represores de traducción de RNAm. mTORC2 fosforila a AKT en el residuo de serina y lleva a activación completa de AKT, esta cinasa a su vez fosforila fosfatidil-inositol 4-5 bifosfonato (PIP2) para generar fosfatidil inositol-3,4,5 trifosfato (PIP3).

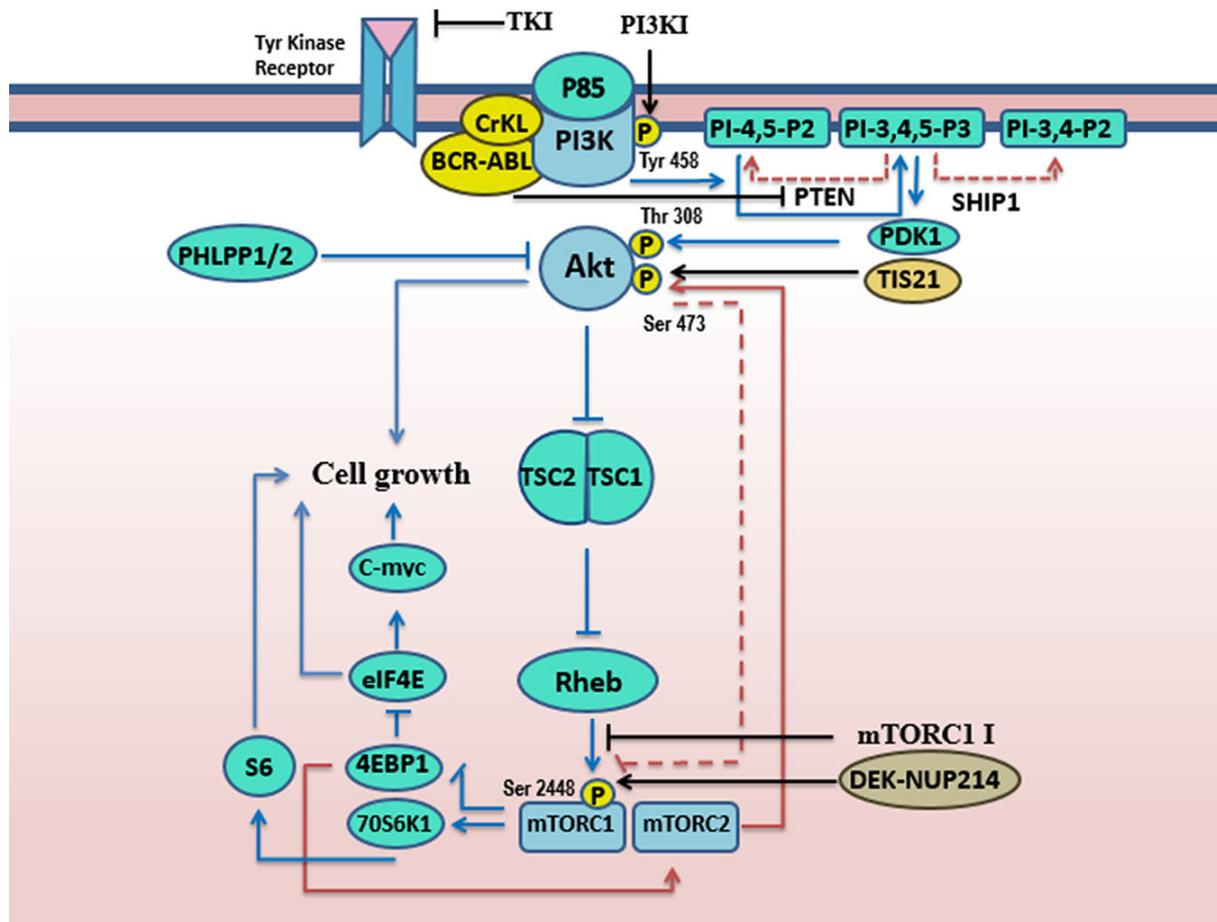


Figura 3. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR²⁴

PI3-K convierte PI-4,5-P2 a PI-3,4,5-P3 a través de fosforilación. Como regulador negativo de PI3K/Akt/mTOR, PTEN y SHIP convierten PI-3,4,5-P3 a PI-4,5-P2 y PI-3,4-P2, respectivamente. La activación de Akt se completa gracias a la fosforilación de T308 y S473 por PDK1 y mTORC2. Esta activación de Akt induce sustratos para diversas reacciones de fosforilación. Akt inactiva TSC1 y TSC2. TSC1/TSC2 suprimen Rheb, y Rheb activa mTORC1. mTORC1 juega un papel en la maquinaria de transducción a través de 4EBP1 y p70S6. La fosforilación de 4EBP1 lleva a la inhibición de la relajación de eIF4E y la formación de IF4F, que es necesaria para la traducción de mRNA.

PIP3 recluta AKT en la membrana plasmática donde es fosforilado por PDK1 y T208 y mTORC2. La porción activa de AKT fosforila diversos sustratos inhibiendo procesos apoptóticos y estimulando la proliferación celular. Por otra parte AKT fosforila directamente e inactiva TSC2/2, permitiendo que RHEB se acumule en GTP estado y estimule la actividad de mTORC1. La regulación negativa es mediada por fosfatasa lipídica PTEN y SHIP1 que convierte PIP3 en PIP3 y PIP2 respectivamente. PHLPP1/2 y PP2A son proteína fosfatasa que defosforilan AKT terminando vías de señalización.²⁰

En más de 60% de los pacientes con LMA, la activación de PI3K/ Akt/mTOR se ha observado. El mecanismo función aberrante de receptores de tirosin cinasas. También se ha visto que la secreción parácrina y autocrina de VEGF puede activar PI3K e incrementar la resistencia a quimioterapia en las células malignas en LMA.²¹⁻²²

Evaluaciones preclínicas de inhibidores de AKT (MK2206) han demostrado que esta droga sensibiliza a las células de LMA a getuzumab ozogamicina.²⁰ En otros estudios se ha visto su eficacia en cáncer de pulmón y mama como sinergista de otros agentes de quimioterapia, activando vía de las caspasas y favoreciendo regresión tumoral.²³

En las leucemias linfoblásticas agudas se ha intentado usar inhibidores de mTOR, en combinación con quimioterapia con efectos sinérgicos. ETV6/RUNX1 (E/R) gen de fusión causado por la traslocación (12; 21). E/R activa PI3K/Akt/ mTOR, por lo que inhibir esta vía reduce la viabilidad de células malignas y con capacidad de resensibilizar a las células malignas resistentes a prednisona.

La hiperactivación de PI3K/AKT/mTOR en leucemias pre B se han tratado con inhibidor selectivo de mTORC1 induciendo apoptosis y muestra un efecto sinérgico con el inhibidor de AKT MK2206.²⁴

Torin 2 es un inhibidor competitivo de segunda generación de ATP que afecta directamente mTORC1 y mTORC2 induciendo detención en el ciclo celular en G0/G1, causa autofagia y apoptosis. Torin 2 suprime la activación de PI3K/AKT, mientras que el inhibidor de mTORC1 (RAD001) requiere que se añada un inhibido de AKT (MK-2206) para alcanzar el mismo efecto.²⁵

Todo esto representa una nueva estrategia prometedora para los pacientes con leucemia aguda. La combinación de diversos blancos terapéuticos suena atractivo

como el uso de inhibidores de mTOR rapamicina con dexametasona por ejemplo para leucemias linfoblásticas de estirpe T. Numerosos fármacos como GDC 0941 (inhibidor de PI3K de clase I), MK-2206, RAD001, inhibidores duales de PI3K/PDK1, NVP-BAG 956, han mostrado potentes efectos citotóxicos.²⁶⁻²⁷

Perifosina es un inhibidor de AKT que bloquea el dominio de AKT cinasa previniendo su activación. Actualmente se encuentra en estudios clínicos fase III para cáncer de colon, mieloma múltiple (en combinación con bortezomib y dexametasona) y leucemia aguda tanto mieloide como linfoide refractaria.²⁸

En recientes fechas se ha investigado isoformas específicas de inhibidor de PI3K, CAL 101. Se ha demostrado que disminuye la síntesis de RNAr y la proliferación celular.²² Actualmente en el mercado se encuentra idelalisib (CAL 101) un inhibidor específico de PI3Kd, el primero en su clase para cánceres de estirpe B.²⁹ Actualmente la FDA también autorizó la combinación de un idelalisib con ibrutinib, un inhibidor de tirosin cinasa que tiene actividad en linfomas del manto y leucemia linfocítica crónica con resultados prometedores.³⁰ En general la disregulación de estas vías de señalización, que son detectables en un 70 a 85% de los pacientes, puede tener impacto directo en la supervivencia de los pacientes con leucemia aguda, disminuyendo la resistencia a terapias estándar. El mayor reto continua siendo la morbilidad asociada a los esquemas actuales de quimioterapia. Para los sobrevivientes a largo plazo, la toxicidad asociada a quimioterapia amerita mejor selección de esquemas, incluyendo terapias blanco así como individualización.³¹

Todo lo descrito anteriormente es la pauta para nuevas terapéuticas bien dirigidas contra leucemias agudas de novo, principalmente aquellas que desde un inicio son catalogadas como de alto riesgo. Estas terapias incluyen bloqueos a nivel de vías de señalización tales como inhibición de PI3K, sin embargo no existen métodos totalmente fidedignos que demuestren la sobreexpresión de dicha vía en pacientes con neoplasias hematológicas. De manera experimental se ha visto que la expresión de CD49f se correlaciona con la actividad de PI3K.³¹

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, las leucemias se encuentran entre las primeras 5 causas de cáncer en México, con edades de presentación tan variables desde la infancia hasta el adulto mayor. Para el diagnóstico según la Organización Mundial de la Salud (OMS) requiere realizar tres estudios fundamentales; citomorfología, inmunofenotipo y estudio citogenético. Junto a algunas características clínicas, estos parámetros se estratifican a los pacientes en: riesgo alto, intermedio y bajo, ya que de esto depende en gran medida la elección de un esquema terapéutico adaptado a dicho riesgo. Por ello el buscar nuevos marcadores que indiquen mayor actividad proliferativa y por lo tanto de progresión podría ayudar a establecer de mejor manera la evolución e incluso impactar en la elección del tratamiento.

En nuestro medio, la conducta terapéutica más común en los pacientes con diagnóstico reciente de leucemia aguda es llevar a la remisión de la enfermedad con quimioterapia citotóxica sistémica, con esquemas preestablecidos y recomendados por guías de práctica clínica.

Dentro de los grandes inconvenientes que esta conducta terapéutica es la gran tasa de complicaciones y efectos adversos asociados, como la toxicidad cardíaca aguda y crónica, renal, altos requerimientos transfusionales, infecciones intrahospitalarias, infecciones oportunistas y como consecuencia una larga estancia hospitalaria, generando con ello gastos importantes de atención, tanto para el paciente como a los servicios de atención de tercer nivel. Por otro lado se ha visto que un número importante de pacientes al paso del tiempo presentarán recaída de la enfermedad pese a la administración correcta de esquemas establecidos, principalmente aquellos que fueron clasificados como de alto riesgo al momento del diagnóstico; esto representa mayor riesgo en la tasa de complicaciones, incluida la opción de los cuidados paliativos ya que gran número de pacientes no logran continuar un segundo esquema por diversos factores, entre ellos cuestiones de índole emocional, física y económica entre otras.

IV. JUSTIFICACIÓN

Lo anterior ha hecho necesaria la búsqueda de mejores opciones de tratamiento con el fin de obtener el mayor beneficio, mejores tasas de supervivencia y con menores efectos adversos letales incluso asociados a la terapéutica. No existe aún terapia que cumpla todos estos requerimientos, sin embargo recientemente se ha encontrado con resultados prometedores, que incidir directamente en las vías de señalización de proliferación celular o el microambiente de la médula ósea podría mejorar los resultados, bien sea como terapia adyuvante a la quimioterapia sistémica o incluso como monoterapia si la vía alterada resulta esencial para la supervivencia y proliferación de la célula neoplásica como por ejemplo los Inhibidores de la tirosina cinasa en la leucemia mieloide crónica.

Se tienen criterios preestablecidos para clasificar a los pacientes con leucemias de alto riesgo como lo son la edad, la cuenta leucocitaria al momento del diagnóstico, las alteraciones citogenéticas de mal pronóstico como la presencia de cromosoma Philadelphia y el tiempo de respuesta entre el inicio de la quimioterapia y la inducción a la remisión. Sin embargo en el caso de leucemias agudas aún no se ha logrado la identificación de los factores que puedan activar las vías de señalización específicamente implicadas en la proliferación celular, lo que nos ayudaría a reconocer a quienes pudieran beneficiarse con su bloqueo, y de esta forma desarrollar fármacos que actúen de manera directa inhibiendo las vías de señalización implicadas como la de PI3K/Akt/ mTOR, la cual ha sido identificada como una importante vía implicada en la proliferación celular. Esto podría realizarse de forma indirecta a través de métodos sencillos y accesibles en nuestro medio como la citometría de flujo, con búsqueda directa de la expresión de integrinas como CD49f la cual ha sido descrita como posible factor activador de la vía PI3K/Akt.

La citometría de flujo permite realizar mediciones multiparamétricas de alta precisión, principalmente en estudios de expresión de antígenos de membrana e intracitoplasmáticos, siendo además una técnica rápida y reproducible para la cuantificación de otros marcadores, de manera individual y sobre miles de células en pocos minutos.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar la expresión de CD49f en pacientes con leucemia de novo como un factor asociado a proliferación y progresión neoplásica.

2. Objetivos específicos

Demostrar que los pacientes con leucemia aguda de novo, la expresión de la integrina CD49f es mayor que en la población sana

Identificar si el porcentaje de expresión de CD49f se correlaciona en específico con cierto tipo de leucemia.

Correlacionar la expresión de CD49f con alteraciones citogenéticas.

VI. HIPÓTESIS

1. Hipótesis de la investigación (Hi)

La integrina CD49f se expresa en mayor porcentaje en células neoplásicas de pacientes con leucemia aguda de novo.

2. Hipótesis nula (H0)

La integrina CD49f no se expresa en mayor porcentaje en células neoplásicas de pacientes con leucemia aguda de novo.

3. Hipótesis Alternativa (Ha)

La integrina CD49f se expresa en mayor porcentaje en un tipo específico de leucemia aguda.

VII. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

1. Diseño del estudio

Retrospectivo, transversal y descriptivo.

2. Población de estudio y tamaño de la muestra

Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda de novo entre los 17 a 99 años de edad que acudan al servicio de hematología del Hospital Juárez de México de enero de 2014 a diciembre de 2014. Se incluyeron en el estudio 49 pacientes con diagnóstico de leucemia de novo que cumplían los criterios de inclusión.

3. Criterios de inclusión

Pacientes con leucemia aguda de diagnóstico de novo.

Que no hayan iniciado tratamiento.

Edad: 17 años en adelante.

4. Criterios de exclusión

Pacientes con expediente clínico incompleto.

Pacientes con leucemia secundaria.

5. Material y métodos

Se realizó una revisión del expediente clínico del paciente con leucemia aguda de los pacientes ingresados a cargo del servicio de Hematología en Hospital Juárez de México de enero de 2014 a diciembre de 2014. Se captó la siguiente información biometría hemática al diagnóstico de la enfermedad (BH porcentaje de blastos en sangre periférica y médula ósea, así como resultado de inmunofenotipo y citogenética.

6. Técnica y procedimiento

Se realizó una base de datos en la que se recolectaron los siguientes datos obtenidos del expediente clínico:

1. Tipo de Leucemia.
2. Edad y sexo del paciente.
3. Cuenta de Leucocitos al diagnóstico.
4. Porcentaje de expresión de CD49 f en inmunofenotipo obtenido de sangre periférica o sangre de médula ósea.
5. Resultado de estudio citogenético.

La expresión de CD49f se determinó por citómetro de flujo FACSCalibur con software CellQuest Pro al momento de diagnóstico en muestra de sangre periférica o médula ósea según el porcentaje de blastos al momento de diagnóstico. Por otro lado se obtuvieron 50 muestras de pacientes sanos pareados por edad y sexo con respecto a los enfermos para realizar la comparación con la muestra obtenida, mediante el mismo método. Se consideró como positivo el CD49f a partir de un porcentaje de expresión de 25% o más.

7. Consideraciones éticas

La investigación fue de tipo retrospectivo y descriptivo, por lo cual no representó ningún riesgo para la población estudiada. Se mantuvo la confidencialidad de los pacientes durante todo el proceso del estudio.

8. Variables de interés

Porcentaje de expresión de CD49f (cuantitativa continua)

Edad (cuantitativa continúa)

Género (cualitativa nominal)

Alteraciones citogenéticas (cualitativa nominal)

Tipo de Leucemia (cualitativa nominal)

9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados, se realizó en el paquete STATA versión 11.0 y consistió en lo siguiente.

Análisis exploratorio: se realizó un análisis general de las variables de interés de los datos vacíos, datos faltantes e implausibles.

Análisis descriptivo: Posterior a la exploración de la base, se realizó un análisis de cada una de las variables de interés. Se analizaron las variables de interés y potencialmente confusoras en toda la población y posteriormente en cada uno de los subgrupos. Para las variables cualitativas se estimaron las frecuencias absolutas y relativas. Para las variables cuantitativas se estimaron las medidas de tendencia central y dispersión (media, mediana, desviación estándar, rangos y percentiles) y se realizaron pruebas de normalidad (sesgo, curtosis y género de papel normal, gráfico de cajas, histograma de frecuencias para normalidad, gráfica de tallo y hoja y prueba de Shapiro Wilk tomando como H_0 = distribución normal).

En cuanto a la comparación de variables sociodemográficas (edad y género), se utilizaron T de student para variables cuantitativas y χ^2 para variables cualitativas. Para la comparación de CD 49f entre ambos grupos y comparación entre tipos de leucemia se usó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

VIII. RESULTADOS

Dentro del estudio se incluyeron 49 pacientes con leucemia aguda, diagnosticados en el periodo de enero de 2014 a diciembre 2014 que cumplieron los criterios de inclusión. Se obtuvieron las siguientes características de la población (**Tabla 1**). Se obtuvieron un total de 28 hombres enfermos y 21 mujeres enfermas, con una mediana de edad de 33 años, sin embargo distribuidos por edad desde los 17 a los 77 años. Se obtuvieron 50 muestras de controles sanos, 23 hombres sanos y 27 mujeres sanas de 33 a 36 años de edad, pareados por edad y sexo con respecto a la población enferma de estudio. Del total de sujetos enfermos se documentaron 26 muertes hasta el momento del análisis, 9 pacientes del grupo de LLA y 17 pacientes del grupo LMA.

Dentro de los subtipos de leucemias se encontró a 27 pacientes con leucemia linfoblástica aguda, de ellos 15 hombres y 12 mujeres, subclasificados por estirpe morfológica, LAL1 3 pacientes (2 mujeres y 1 hombre), LLAL2 23 pacientes (10 mujeres y 13 hombres), L3 1 paciente hombre. Respecto a las leucemias de estirpe mielóide se obtuvieron 22 pacientes, 13 hombres y 9 mujeres. Dentro de subclasificación 11 eran de variedad M2 (7 hombres y 4 mujeres), 10 de tipo M3 (6 hombres y 4 mujeres) y 1 paciente era M1 (mujer) (**Tabla 2**). Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con quimioterapia. De los 27 pacientes con LLA 8 pacientes, (5 Hombres y 3 mujeres) reportaron alteraciones citogenéticas por cariotipo de médula ósea. Cuatro pacientes tuvieron presencia de traslocación 9:22 o cromosoma Filadelfia (Ph+).

El resto se presentaron cariotipos complejos con los siguientes resultados: paciente 1 47XY +5,i(17)(q10(7))/46XY, paciente 2 45xy dic(9;20)(p11.2;q13-1)(4)46 XY (16), paciente 3 45XY,add(3)(q11.2)-16-18+22(7)/45XY,add(3)(q11.2)-9,i(9)(q10)-16,+22(5)/46XY(8), paciente 4 48XX +6+21 (9). Respecto a los pacientes con leucemia mielóide, 7 pacientes presentaron alteraciones citogenéticas uno de ellos con M2, el resto con M3, 5 hombres y 2 mujeres. La

mutación reportada en 6 casos fue T(15,17)(q22,q12) y solo en un paciente t(8:21)q22:q21 (**Tabla 2**).

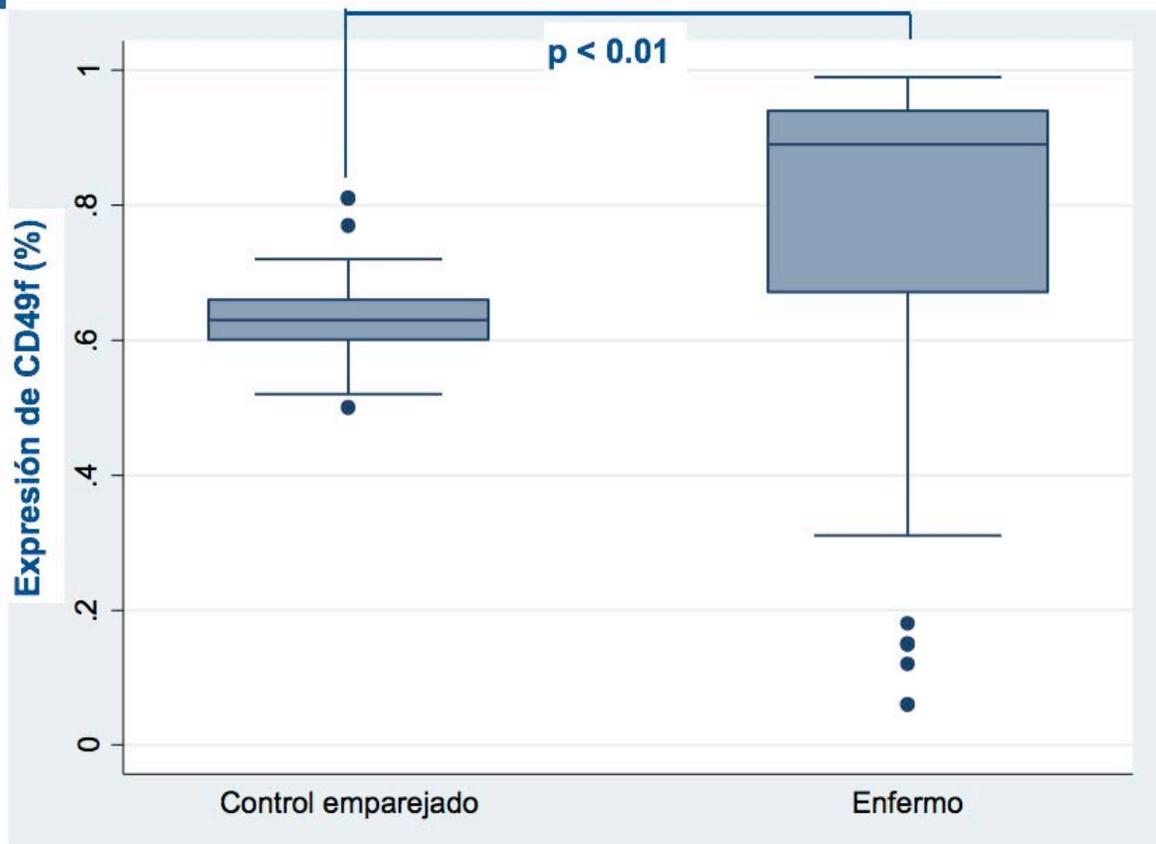
Tabla 1. Características de la población de estudio		
Características	Enfermos N=49(%)	Controles N=50(%)
Edad(años)*	33 (17-77)*	33(33-36)*
Género **	Hombres 28 (57.14%)	Hombres 23(46%)
	Mujeres 21(42.85%)	Mujeres 27(54%)
*Valores expresados en medianas y rangos (p0.25 prueba T de student para muestras independientes)		
**p 0.26 (chi ²)		

Tabla 2. Características de la población de estudio	
Características	Participantes N=49(%)
LLA	27 (55%)
L1	3(6.1%)
L2	23 (46.9%)
L3	1(2%)
LMA	22(44.8%)
M1	1(2%)
M2	11(22.4%)
M3	10(20.4%)
Alteraciones citogenéticas	15(30.6%)
Cromosoma Filadelfia	4 (8.16%)
t(15,17)(q22,q12)	6(12.24%)
Otras	5 (10.20%)

Se comparó el porcentaje de expresión de CD49f entre sujetos enfermos y sanos, mediante prueba de Wilcoxon/Shapiro-Wilk. La mediana de porcentaje de expresión de CD49f en los sujetos enfermos fue de 89% (con un rango de 6-99%), con un valor de $p < 0.01$. En sujetos sanos la mediana de porcentaje de expresión de CD49f 63% con un rango de (50-81%), con un valor de p de 0.13. La diferencia en la expresión de CD49f entre el grupo de enfermos y el grupo de controles se encontró una p estadísticamente significativa (**Tabla 3**). La distribución de expresión del biomarcador se visualiza en la **gráfica 1**.

Tabla 3. Promedio de porcentaje de expresión de CD49f		
Expresión CD49f (%)	Enfermos N=49(%)	Controles N=50(%)
CD49 f	89%(6-99)	63%(50-81)
Valor de P	<0.01	0.13

Gráfica 1.
Gráfica de cajas de expresión de CD49 f en población sana y enferma

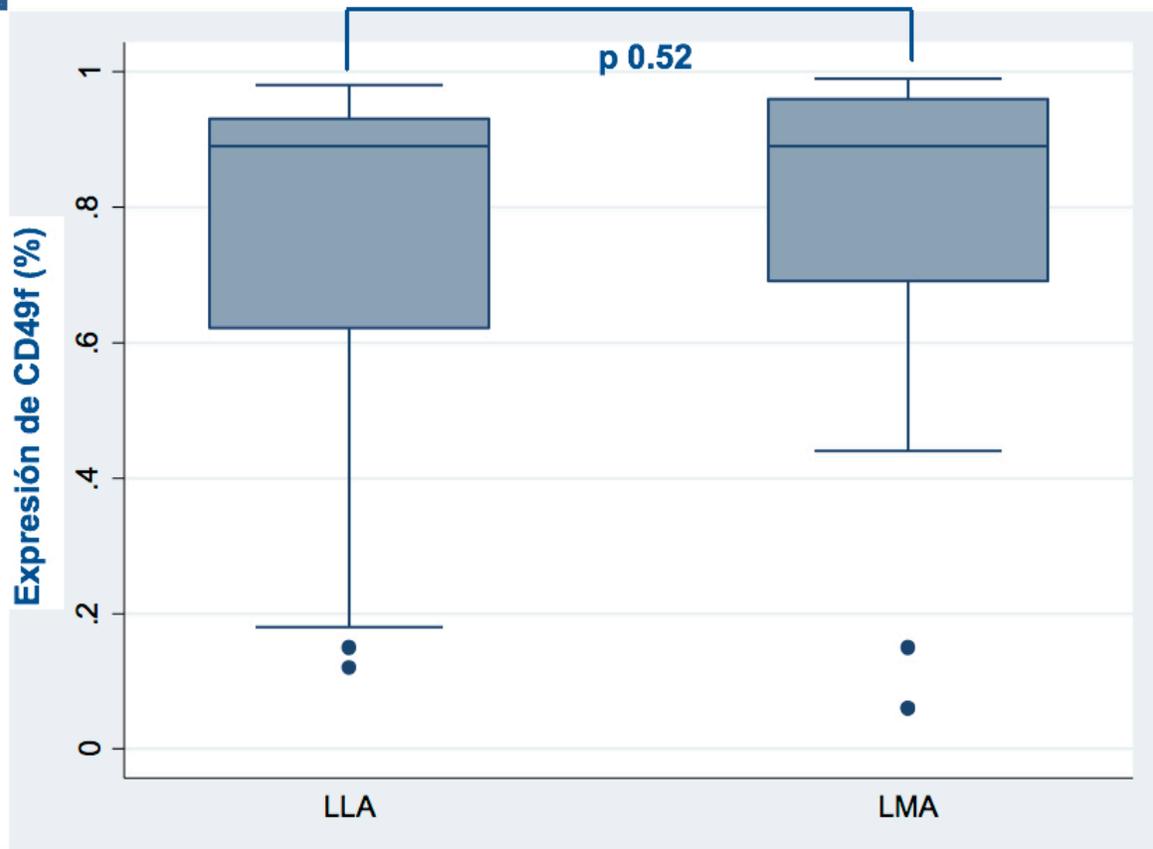


Se comparó la expresión de CD 49f entre los tipos de leucemias mediante prueba de Wilcoxon, encontrando una mediana de expresión para los pacientes con LLA de 89% con un rango de 12.3-98.3% y para LMA con una mediana de 89% con un rango de 6.4-99.5% con un valor de p 0.52, siendo estadísticamente no significativa. **(Tabla 4)**. En la gráfica 2 se aprecia la distribución de expresión del biomarcador CD49f, según el tipo de leucemia.

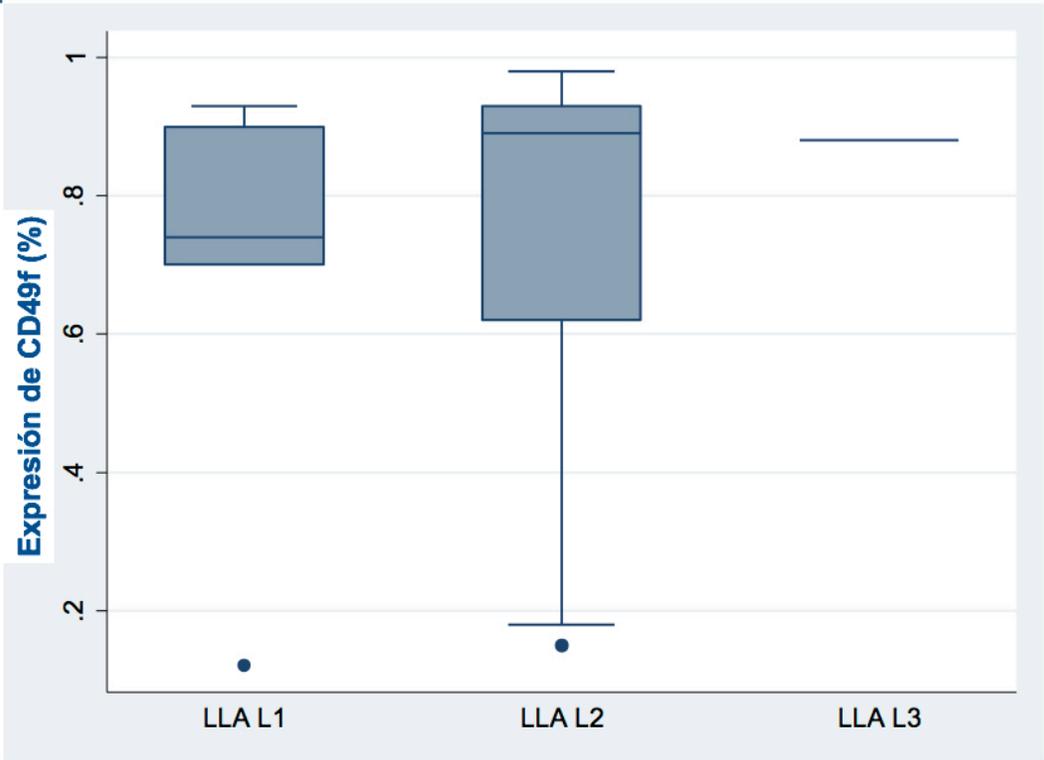
Tabla 4. Promedio de Expresión de CD49 f según el tipo de leucemia	
Tipo de Leucemia	CD49f%(rango)
LLA	89(12.3-98.3)
LMA	89(6-99)

p 0.52 prueba de suma de rangos de Wilcoxon

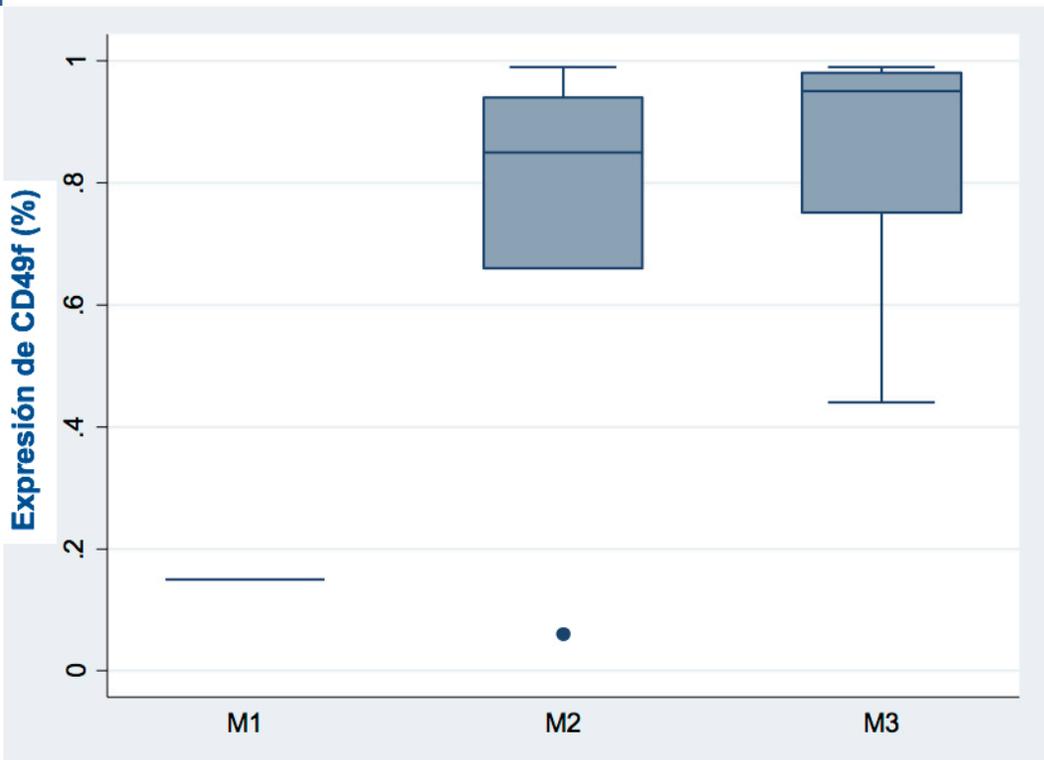
Gráfica 2. Gráfica de cajas de expresión de CD49f según tipo de leucemia



Gráfica 3. Gráfica de cajas de expresión de CD49f de LLA



Gráfica 4. Gráfica de cajas de expresión de CD49f de LMA



IX. DISCUSIÓN

El desarrollo de terapias dirigidas que cumplan el principio médico básico de *primum non nocere* (ante todo no hacer daño) es uno de los objetivos actuales de la medicina moderna, la identificación de las vías implicadas en el desarrollo y proliferación de las células neoplásicas se ha convertido a lo largo del tiempo en una necesidad en la Hemato-Oncología.

Yu et.al. ha descrito el papel de CD49f en la regulación de la diferenciación y la pluripotencialidad de las células madre, sin embargo no ha sido investigado totalmente; se ha documentado que la expresión de CD49f regula la capacidad proliferativa de las hMSCs (human mesenchymal stem cells) asociada con una activación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) / AKT y supresión del nivel de p53. La activación anormal de la vía PI3K resulta en alteración de los mecanismos de control del crecimiento y la supervivencia celular, lo que favorece el crecimiento competitivo, la capacidad metastásica y, frecuentemente, una mayor resistencia a los tratamientos; por esto, su estudio es parte crucial para el entendimiento de los procesos de carcinogénesis y su potencial utilidad terapéutica¹⁹.

Con esta racional esta investigación propuso como un probable marcador de proliferación a la integrina CD49f, biomarcador que aunque de manera normal se expresa en población sana y que se encarga de diversas actividades a nivel molecular, tales como la adhesión celular, se sugiere sin embargo que en pacientes con patologías neoplásicas se encuentra con mayor grado expresión perpetuando por lo tanto la proliferación celular bajo diversos mecanismos como sería a través de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR²⁴

Los porcentajes de expresión de CD49f hallados en la población enferma son altos, con una mediana de 89% en contra de un 63% en la población sana. Documentando una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.01$, por

lo que se puede sugerir que la vía de proliferación celular mediada por este antígeno se encuentra en mayor grado de actividad en sujetos enfermos.

Esto debería despertar el interés en estudiar su utilidad en la práctica clínica. Ya que sugiere la presencia de vías de proliferación celular anormalmente activas en los pacientes estudiados con leucemia aguda del Hospital Juárez de México. Puede ser el principio de investigaciones enfocadas en la búsqueda de terapias blanco dirigidas específicamente al bloqueo de dichas vías de señalización celular.

Otro uso en la práctica clínica, con respecto a la sobreexpresión de CD49f podría ser determinar la presencia de enfermedad mínima residual, o incluso si se logra más adelante correlacionar con factores de riesgo ya conocidos e incluirlo como un nuevo factor pronóstico ya que es entendible que si se perpetua una vía de proliferación celular, eventualmente presentará recaída de la enfermedad, entendiendo de mejor manera la progresión de la enfermedad. En la actualidad existen fármacos como Idelalisib e Ibrutinib, entre otros, cuyo mecanismo de acción se centra en la inhibición de PI3K/mTOR principalmente utilizados en neoplasias hematológicas que cursan con incremento en la proliferación celular como la leucemia linfocítica crónica y algunas variedades de linfoma, y que pudieran ser utilizados como herramientas que nos ayuden a identificar el alto porcentaje de expresión la activación de CD49f.

Blunt y colaboradores en su investigación incluyeron como estrategia de tratamiento para leucemia linfocítica crónica, el uso de inhibidor dual de PI3K/mTOR (PF-04691502) con efectos antitumorales importantes a nivel de células estromales y con alteraciones a nivel de migración celular. In vivo el tratamiento con PF-04691502 resultó en una linfocitosis transitoria seguida de una reducción en carga tumoral a nivel periférico, médula ósea, bazo y ganglios linfáticos, lo cual incluso ofrecería una nueva opción de tratamiento para pacientes con leucemia aguda.³⁹

Otros tipos de neoplasias como de cabeza y cuello al agregar inhibidores de PI3K/mTOR pudiera incrementar la tasa de éxito en el tratamiento ya que se incide

sobre diversas vías de proliferación celular. D'Amato y colaboradores encontraron que el tratamiento con inhibidor dual de PI3K/mTOR (PF-05212384) incrementa la sensibilidad a cetuximab in vitro, incluso cuando se documenta resistencia a EGFR. La combinación de estos fármacos inhibe la supervivencia celular, altera las vías de señalización y activación celular e induce apoptosis, reduciendo crecimiento tumoral e incrementando la supervivencia en modelos con ratones⁴⁰.

Todo esto sugiere que el bloqueo farmacológico de esta vía puede ser una opción prometedora en el tratamiento de las leucemias agudas, incluso como en este estudio, incrementado la sensibilidad de los fármacos ya estudiados, como la quimioterapia estándar en el caso de las leucemias agudas, reforzando la terapéutica con ataque directo a nivel de microambiente y vías de señalización.

DiGiuseppe y colaboradores encontró niveles mayores de expresión de CD49f en pacientes con Leucemias linfoblásticas agudas, encontrando niveles indetectables en células linfopoyéticas normales, mientras que en la mayoría de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda se encontró sobreexpresado junto con CD19, CD20 y CD45, permitiendo la detección de enfermedad mínima residual hasta en un 0.02%, incluso encontrándolo en un valor importante en algunos casos posterior a la terapia de inducción siendo negativo antes del inicio de esta. Como potencial limitante también encontró que los precursores de células B normales también tienen una expresión constante de CD49f, en menor proporción, tal y como lo encontramos con la población sana de esta investigación, sin embargo con diferencia significativa en su expresión, sugiriendo que la población enferma posee mecanismos de perpetuación anormal de las vías de señalización y proliferación celular.

En recientes investigaciones se proponen terapias para enfermedades degenerativas e inflamatorias basadas en células madre mesenquimatosas. Se propone que diversos marcadores de superficie pueden reflejar atinadamente la autoregeneración y el potencial de diferenciación de las células mesenquimatosas madre. Yang y colaboradores estudio el papel del CD49f en las células de la médula ósea madre mesenquimatosas y los mecanismos mediante los cuales

regula el comportamiento de dichas células en situaciones proinflamatorias. Se encontró que el CD49f se expresaba preferentemente en células mesenquimatosas con capacidad de formación de colonias y con alto potencial de diferenciación. Además de que la regulación a la baja de la expresión de CD49f disminuye la capacidad de diferenciación de las células mesenquimatosas, se observó que inhibición con TNF- α alteraba la adhesión a lamininas e incrementaba la migración.⁴¹

Es esperado que durante la evaluación inicial de un nuevo biomarcador, se desconozca el comportamiento biológico del mismo sin embargo en los resultados pudimos observar que los intervalos de confianza incluyen los valores de los controles por lo que existe una variabilidad amplia de distribución de la expresión del CD49f en la población enferma de esta investigación.

Dicha variabilidad puede ser atribuida primero que nada a la amplia distribución en los rangos de edad de la población enferma ya que van desde los 17 años hasta los 77 años. Sabemos que en la población a partir de los 65 años diversos sistemas se ven comprometidos en su función disminuyendo su activación, entre ellos el sistema inmunológico, llevando un estado de inmunosenescencia, que ocasiona daño cromosómico que lleva a la síntesis de productos génicos que inhiben la progresión del ciclo celular, incluso inactivando vías de proliferación celular como CD49f y a su vez PI3K/Akt/mTOR.

Por ejemplo se sabe que los linfocitos T después de repetidas divisiones entran a un estado de senescencia caracterizada por alteración en su función, acortamiento de las secuencias de telómeros, detención del proceso de proliferación y resistencia a la apoptosis. Los receptores linfocitarios para mitógenos no se modifican, pero debido a la menor capacidad proliferativa el número de divisiones celulares también es mínima esto puede deberse a anomalías en las cascadas de señalización con calcio, observadas en linfocitos de personas ancianas, que no permiten la activación celular adecuada o conducen a defectos en la síntesis/reparación del DNA debido a disminución sostenida de IL2.³⁶

Este factor puede ser corregido en la medida que se hagan investigaciones con grupos con rangos de edad bien establecidos, en centros de referencia donde el tamaño de la muestra (N) pueda ser más grande sin ser una limitante y analizar variables que en esta investigación fue difícil realizar debido al tamaño de la muestra.

La relación de expresión de CD49f con alteraciones citogenéticas no fue posible ya que solo 14 pacientes expresaron cariotipos anormales sin lograr documentar un patrón o tendencia, encontrando desde la presencia de cromosoma Filadelfia hasta cariotipos complejos, por lo que establecer la relación de una alteración citogenética en particular con la sobreexpresión del antígeno en los pacientes estudiados no fue posible.

Por otro lado parece ser que sin importar la estirpe celular mieloide o linfoide la presencia del CD49f se encontró sobre-expresada en comparación con sujetos sanos, sin ser estadísticamente significativa la diferencia entre ambos tipos de leucemia estudiadas, lo que podría significar que la presencia de este estímulo proliferativo incrementado es independiente de la neoplasia. En nuestro hospital tenemos con mayor frecuencia pacientes con leucemia linfoblástica L2 y en cuanto a las mieloides de tipo M3 y M2 por lo que sería interesante evaluar el comportamiento biológico de dicho marcador con grupos bien seleccionados, pareados por edad y por tipo de leucemia, para confirmar que en efecto no existe relación directa entre la expresión de CD49f y la estirpe afectada ya sea mieloide o linfoide. Además de que los tratamientos que existen en la actualidad para la inducción a la remisión son distintos en un inicio para cada subtipo, sin embargo si el CD49f se expresa en la misma proporción, sería tema interés unificar una nueva terapia blanco contra la vía de proliferación de PI3K/Akt/mTOR.

Otro factor que pudiera explicar la variabilidad en cuanto a la expresión de este biomarcador podría ser la procedencia de la muestra, ya que de manera rutinaria en el servicio de Hematología se solicita la determinación de inmunofenotipo con una muestra de sangre periférica, sin embargo cuando la expresión de blastos en

sangre periférica es menor del 15% o por situaciones distintas, como ausencia de celularidad en sangre periférica, se solicita se otorgue muestra de sangre de médula ósea. Las muestras de inmunofenotipo en general son sometidas a lisis de eritrocitos y fijación, y la separación celular por gradiente de densidad sólo en aquellas muestras contaminadas con células necróticas estromales o grasas³⁷. Por lo que si alguna muestra contenía mayor tejido estromal o graso que pudiera (ser el caso de las muestras procedentes de médula ósea) o existían alteraciones séricas o hidroelectrolíticas en la muestra de sérica (por ejemplo el nivel de lípidos séricos de los pacientes), pudieran ser confusores e incluso afectar la expresión del marcador a estudiar sin estar verdaderamente alterado, además de que a nivel de médula ósea la proliferación celular es mayor ya que el nicho y el microambiente se encuentran alterados en pacientes con leucemia, produciendo mayor número de señales anormales de proliferación, extensión y crecimiento de la clona anormal en el sujeto enfermo con leucemia.

Por último considero importante el modo de determinación de activación de la vía de proliferación de ITGA6/CD49f, si bien en esta investigación se midió por medio de citometría de flujo, existen otros modos de medir su actividad. Penfornis y colaboradores³² en su investigación proponen cultivos de células neoplásicas con posterior incubación de anticuerpos anti CD49f y posteriormente se realizaba medición del porcentaje de positividad en células malignas usando el citómetro de flujo Cytonomics FC500. Ferreira y colaboradores³⁴ en su estudio de evaluación de activación de ITGA6 mide CD49f por técnica de inmunofluorescencia y citometría de flujo otorgando opciones principalmente cuando uno de los métodos el negativo o infraexpresado. Otros autores tales como Jean-François Groulx³⁸, usaron anticuerpos y técnicas de Western Blot e inmunofluorescencia para su detección y expresión en pacientes con cáncer de colon, sin embargo no establecen puntos de corte o valores de referencia, importante en el estudio de un nuevo biomarcador.

X. CONCLUSIÓN

Esta investigación podría ser el inicio de un proyecto a largo plazo en el Hospital Juárez de México, eliminando todos los factores que ocasionaron variabilidad en nuestro estudio, con la finalidad de confirmar los hallazgos reportados. El número de pacientes con leucemia aguda con los que cuenta nuestro servicio contribuiría a su desarrollo.

La sobreexpresión de CD49f y su relevancia en la activación de vías como PI3K/Akt/mTOR en poblaciones de leucemia aguda, podría ser el inicio de nuevas terapias blanco dirigidas contra esta vía de proliferación y con ello mejorar las respuestas y disminuir las comorbilidades que conlleva el uso de quimioterapia citotóxica sistémica, incluso mejorar la supervivencia en este tipo de pacientes. Inicialmente los pacientes con leucemia aguda con 2 o más recaídas podrían ser candidatos a este tipo de terapias una vez confirmada la relevancia de la presencia de CD49f en la activación de esta vía de proliferación.

La investigación concluye que CD49f es un marcador indirecto de proliferación celular con mayor expresión en pacientes con leucemia aguda comparado con sujetos sanos, sin embargo con una gran variabilidad en su expresión. Considerando las aportaciones de la investigación, y en base a los reportes actuales en la literatura, se puede determinar que el CD49f es un potencial biomarcador, con utilidad clínica prometedora para nuevas propuestas de terapia blanco, incluso quizá como un factor pronóstico, más en leucemias agudas. Investigaciones con mejoría en métodos diagnóstico y selección de población serán necesarios para determinar el impacto real de su uso, sin embargo consideramos que esta investigación podría ser la pauta para nuevos estudios en nuestro hospital.

XI. SUGERENCIAS DEL ESTUDIO

De continuar la línea de investigación se deben mejorar las técnicas de determinación y detección de CD49f (como inmunofluorescencia o Western Blot) simulando a autores previamente citados que lograron un estudio estadísticamente significativo y que fueron publicadas en revistas indexadas. Por otro lado considerar evaluar a cada leucemia por grupo independiente para evitar sesgos asociados a las particularidades específicas de cada linaje hematopoyético.

Se deben aparear de acuerdo a edad y sexo sujetos sanos y enfermos así como ampliar el número de la muestra significativamente.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Orkin S, Zon L. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132, 631–644, February 22, 2008. Elsevier Inc .
2. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*, 1 May 2002 Volume 99, Number 9.
3. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic stem-cell niches. *Nature* 2006;6:93-106.
4. Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E. & Spradling, A. The stem cell niche: theme and variations. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 693–699 (2004).
5. Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. & Kai, T. Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98–104 (2001).
6. Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E. & Spradling, A. The stem cell niche: theme and variations. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 693–699 (2004).
7. Uchida, N. et al. ABC transporter activities of murine hematopoietic stem cells vary according to their developmental and activation status. *Blood* 103, 4487–4495 (2004).
8. Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23, 7150–7160 (2004).
9. 64. Taichman, R. S. & Emerson, S. G. The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 16, 7–15 (1998).
10. Taichman, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105, 2631–2639 (2005).
11. Oostendorp, R. A. et al. Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood* 99, 1183–1189 (2002).
12. Visnjic, D. et al. Conditional ablation of the osteoblast lineage in Col2.3 α k transgenic mice. *J. Bone Miner. Res.* 16, 2222–2231 (2001).

13. Visnjic, D. et al. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103, 3258–3264 (2004). This paper shows that conditional ablation of osteoblasts results in a reversible decrease of bone-marrow HSCs and extramedullary haematopoiesis, indicating that osteoblasts are not only required for maintenance of bone-marrow haematopoiesis, but are also an essential component of the niche.
14. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X. et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425: 836-841.
15. Seguin L, Desgrosellier J, Weis S. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in Cell Biology* April 2015, Vol. 25, No. 4.
16. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E. et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. Vol 481. January 2012.
17. Visvader J. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & Development* 2009. 23:2563–2577.
18. Qian H, Tryggvason K, Jacobsen S. Contribution of $\alpha 6$ integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with $\alpha 4$ integrins. *Blood*. 2006;107:3503-3510.
19. Yu K, Yang S, Jung J, et al. CD49f Enhances Multipotency and Maintains Stemness Through the Direct Regulation of OCT4 and SOX2. *STEM CELLS* 2012;30:876–887
20. Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015 Jun;72(12):2337-47.
21. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2003, 9(9):1158–1165.

22. Nguyen LX, Sesay A, Mitchell BS (2014) Effect of CAL-101, a PI3K delta inhibitor, on ribosomal rna synthesis and cell proliferation in acute myeloid leukemia cells. *Blood Cancer J.* 2014, 4:e228.
23. Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, et al. MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs In vitro and In vivo. *Mol Cancer Ther*; 9(7) July 2010.
24. Neri LM, Cani A, Martelli AM, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia.* 2014, 28(4):739–748
25. Simioni C, Cani A, Martelli A. et al. Activity of the novel mTOR inhibitor Torin-2 in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential to prevent Akt reactivation. *Oncotarget.* 2014;5(20):10034-10047.
26. Bressanin D, Evangelisti C, Ricci F, Tabellini G, et al. Harnessing the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia: eliminating activity by targeting at different levels. *Oncotarget* 2012. 3(8):811–823.
27. Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F, et al. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2010 (20):8097–8107.
28. Gojo I, Perl A, Luger S. et al. Phase I study of UCN-01 and perifosine in patients with relapsed and refractory acute leukemias and high-risk myelodysplastic syndrome. *Invest New Drugs* (2013) 31:1217–1227 .
29. Zhu J, Hou T, Mao X. Discovery of selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors to treat hematological malignancies. *Drug Discov Today* (2015).
30. Rooij M, Kuil a, Kater A. et al. Ibrutinib and idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy. *Blood* 2015 125:2306-230

31. Cani A, Simioni C, Martelli A, et al. Triple Akt inhibition as a new therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. 2014. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 20.
32. Penforis P, Cai D, Harris MR, et al. High CD49f expression is associated with osteosarcoma tumor progression: a study using patient-derived primary cell cultures. *Cancer Medicine* 2014; 3(4): 796–811.
33. Landowski T, Gard J, Pond E. et al. Targeting Integrin $\alpha 6$ Stimulates Curative-Type Bone Metastasis Lesions in a Xenograft Model. *Mol Cancer Ther*; 13(6) June 2014.
34. Ferreira D, Correa-de-Santana E, Ribeiro-Alves M. ITGA6 gene silencing by RNA interference modulates the expression of a large number of cell migration-related genes in human thymic epithelial cells. *Genomics* 2013, 14(Suppl 6):S3.
35. Kwon J, Lee TS, Won Lee H, et al. Integrin alpha 6: A novel therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2013, 43: 1523-1530.
36. Ledesma J, Valdés M Ramos M. ¿Somos tan viejos como nuestros linfocitos? *Inmunosenescencia. Rev Invest Med Sur Mex*, 2011; 18 (4): 168-173.
37. Piedras J. Citometría de flujo en el diagnóstico y clasificación de padecimientos hematológicos: leucemias agudas, síndromes linfoproliferativos crónicos y glicoproteínas plaquetarias. *Revista de Hematología* Vol. 7, No. 2, 2006.
38. Groulx JF, Giroux V, Beauséjour M. Integrin $\alpha 6A$ splice variant regulates proliferation and the Wnt/ β -catenin pathway in human colorectal cancer cells *Carcinogenesis* vol.35 no.6 pp.1217–1227, 2014.
39. Blunt M, Carter M, Larrayoz M, et al. The PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 induces apoptosis and inhibits microenvironmental signaling in CLL and the E μ -TCL1 mouse model. *Blood*. 2015 Jun 25;125(26):4032-41.

40. D'Amato V, Rosa R, D'Amato C. The dual PI3K/mTOR inhibitor PKI-587 enhances sensitivity to cetuximab in EGFR-resistant human head and neck cancer models. *British Journal of Cancer* (2014) 110, 2887–2895.
41. Yang Z, Dong P, Fu X, et al. CD49f Acts as an Inflammation Sensor to Regulate Differentiation, Adhesion, and Migration of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2015 May 26. doi: 10.1002/stem.2063.