



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE ATENCION MEDICA UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. ANTONIO FRAGA MOURET"
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

TESIS

DETERMINACION DE LINFOCITOS Treg, T γ δ , *inv*NKT, CÉLULAS DENDRÍTICAS,
EXPRESIÓN DE CD34 Y GLICOPROTEÍNA P EN PACIENTES CON LMC *de novo*, EN
TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE TIROSIN CINASA Y/O IFN α .

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

PRESENTA
DR. HIRAM ULISES SEVERINO LUGO

ASESOR DE TESIS
D en C. LAURA ARCELIA MONTIEL CERVANTES.

MEXICO D.F FEBRERO 2016



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.

HOJA DE AUTORIZACION DE TESIS

Dr. Jesús Arenas Osuna
Jefe de la División de Educación en Salud
Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Jorge Vela Ojeda
Profesor Titular del Curso de Hematología
Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Hiram Ulises Severino Lugo
Residente de tercer año de Hematología
Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”
Instituto Mexicano del Seguro Social

Número de Registro: R-2014-3501-9

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COORDINACIÓN DE UNIDADES MEDICAS DE ALTA ESPECIALIDAD

UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

“DR. ANTONIO FRAGA MOURET “
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD

TÍTULO

DETERMINACION DE LINFOCITOS Treg, T γ δ , invNKT, CÉLULAS DENDRÍTICAS, EXPRESIÓN DE CD34 Y GLICOPROTEÍNA P EN PACIENTES CON LMC *de novo*, EN TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE TIROSIN CINASA Y/O IFN α .

INVESTIGADOR PRINCIPAL

D en C. LAURA ARCELIA MONTIEL CERVANTES.
la_moncer@outlook.com

INVESTIGADORES ASOCIADOS

DR. JOSÉ LUIS AYALA SÁNCHEZ.
joseluaya@prodigy.net.mx
DR. HIRAM ULISES SEVERINO LUGO.
RESIDENTE DEL 3ER AÑO DE HEMATOLOGÍA.
huseverino@gmail.com

SITIO DE INVESTIGACIÓN

LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA ESPECIAL.
DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA.
HECMNR. UMAE “DR ANTONIO FRAGA MOURET”

DOMICILIO

SERIS Y ZAACHILA SIN NÚMERO.
COLONIA LA RAZA. DELEGACIÓN AZCAPOTZALCO. CP 02990.
TELÉFONO: 57245900 ext 23090.

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA

Vo. Bo. DR. JORGE VELA OJEDA.

INDICE.

Resumen	4
Abstract	5
I. Introducción	6
II. Justificación	13
III. Pregunta de investigación	14
IV. Hipótesis	15
V. Objetivos	16
VI. Sujetos, material y métodos	17
a. Descripción general del estudio	23
b. Análisis estadístico	24
c. Consideraciones éticas	25
d. Recursos humanos, materiales y financieros	26
VII. Resultados	28
VIII. Discusión	38
IX. Conclusión	42
X. Bibliografía.....	43
XI. Anexos	47
a. Figura 1	52
b. Cuadro 1	53

RESUMEN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa crónica de origen clonal, causada por un oncogén quimérico BCR-ABL que afecta a la célula tronco hematopoyética pluripotencial, caracterizada por el cromosoma Philadelphia (Ph) resultado de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, el cual codifica una cinasa de tirosina constitucionalmente activa. El tratamiento se basa en inhibidores de cinasa de tirosina, así como interferón alfa (IFN- α). El objetivo general del estudio fue determinar la cantidad de linfocitos Treg, T $\gamma\delta$, iNKT, células dendríticas, expresión de CD34 y glicoproteína P en células tumorales en pacientes con LMC *de novo*, en tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa y/o IFN- α . Se realizó un estudio transversal comparativo con un total de 185 pacientes, con un grupo control de 33 donadores sanos (DS) con una mediana de edad de 43 años y un grupo de 152 en pacientes, de los cuales 9 eran de *novo*, 88 en tratamiento con imatinib (IM), 23 con nilotinib (NIL), 18 con dasatinib (DAS) y 14 con IFN- α . A todos los pacientes se realizó caracterización morfológica, citoquímica e inmunofenotípica por citometría de flujo. Los pacientes *de novo* presentaron aumento de LcT en comparación con los DS y el grupo tratado (p: 0.0021); El grupo tratado con IM presentó disminución de Lf en comparación con DS y el resto del grupo de tratamiento (p: 0.0003); el grupo de pacientes de *novo* presento un aumento de linfocitos CD3 así como de CD8 comparados con el grupo sano y el grupo de tratamiento (p: 0.0437); no hubo diferencia significativa entre las determinaciones de TNK, iTNK y células dendríticas tipo 1 y 2 y Treg en los diferentes grupos; hubo un aumento de la cifra de células Treg en los pacientes de *novo* y pacientes con dasatinib (p: 0.0011), la expresión de glicoproteína P fue mayor en pacientes de *novo* con disminución en los pacientes bajo tratamiento. Los resultados sugieren que las células Ph⁺ indujeron un fenómeno de inmunoección en los pacientes que se regula por el tratamiento empleado y un estado inmunológico reactivo comparado con los DS.

PALABRAS CLAVE: leucemia mieloide crónica, linfocitos Treg, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos TNK, células dendríticas, glicoproteína P, inhibidores de tirosin cinasa, interferón.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative neoplasm of clonal origin, caused by BCR-ABL, a chimerical oncogene that affects the hematopoietic stem cell, characterized by Philadelphia chromosome (Ph), which is the result of a reciprocal translocation between the chromosomes 9 and 22, which encodes a tyrosine kinase constitutionally active. The treatment is based on tyrosine kinase inhibitors and alpha interferon (IFN- α). The general objective of the study was to determine the quantity of lymphocytes Treg, T $\gamma\delta$, iNKT, dendritic cells, expression of CD34 and glycoprotein P (GpP) on leukemic cells in patients with newly diagnosed CML, in treatment with tyrosine kinase inhibitors and/or IFN- α . A comparative cross study was made with a total of 185 patients, with a control group of 33 healthy donors (HD) with a median age of 43 years and a control group of 152 patients, 9 of which were recently diagnosed, 88 patients were in treatment with imatinib (IM), 23 with nilotinib (NIL), 18 with dasatinib (DAS), and 14 with IFN- α . All of the patients samples underwent morphological, cytochemical and immunophenotypic characterization by flow cytometry. The newly diagnosed patients had an increase in TLk compared to the HD and the treated group ($p=0.0021$); The group treated with IM had a decrease in Lf compared to HD and the rest of the treated group ($p=0.0003$); the group of patients recently diagnosed had an increase in lymphocytes CD3 as well as CD8 compared to HD and the treated group ($p= 0.0437$); there was no significant difference between the determinations of TNK, iTNK and dendritic cells type 1, 2 and Treg on the different groups. There was an increase in the count of Treg cells in the recently diagnosed patients, and the patients with DAS ($p=0.0011$), the expression of glycoprotein P was highest in recently diagnosed patients, and lowest in the treated patients. The results suggest that Ph + cells induced immunoediting a phenomenon in patients and is regulated by the treatment employed and a reactive immune status compared to HD.

KEY WORDS: Chronic myeloid leukemia, lymphocytes Treg, lymphocytes T $\gamma\delta$, lymphocytes TNK, dendritic cells, glycoprotein P, tyrosine kinase inhibitors, interferon.

I. INTRODUCCION

La leucemia mieloide crónica es un neoplasia mieloproliferativa crónica de naturaleza clonal, se origina en una célula madre pluripotencial común a la tres líneas hematopoyéticas (eritroide, megacariocítica y granulocítica)⁽¹⁾; fue la primera enfermedad maligna asociada con una alteración genética, la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22⁽²⁾. En México no hay un registro de padecimientos onco-hematológicos que permita saber cuál es la incidencia real de este padecimiento; a nivel mundial se presentan de 1 a 2 casos por cada 100 000 habitantes por año, predomina en adultos entre 40 y 60 años, con una media de 53 años, representa del 15-20% de todas las leucemias en adultos, siendo ligeramente más común en varones, con una relación de 1.3:1. La mediana de supervivencia global al diagnóstico, es de 4 a 6 años (a 5 años del 39%), con un rango de 1 a 10 años^(1,3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la codifica como ICD-O 9875/3, denominándola LMC, cromosoma Philadelphia (Ph) positivo [t(9.22)(q34;q11)], (BCR/ABL). La etiología se asocia a exposición de radiaciones ionizantes⁽⁴⁾.

Los pacientes son asintomáticos al momento del diagnóstico, pero las características clínicas predominantes son: fatiga, pérdida de peso, sudoración profusa, anemia, pérdida de apetito, molestias abdominales causadas por viceromegalias hepato y/o esplenomegalia que aumentan conforme progresa la enfermedad; atípicamente se presentan cuadros de trombocitosis marcada sin elevación del recuento de leucocitos⁽⁵⁾.

Fases de LMC.

Este síndrome tiene una evolución clínica trifásica; iniciando en una fase crónica (FC) caracterizada por la expansión de células mieloides con maduración normal y aumento del recuento de leucocitos y plaquetas; el 85% de los pacientes se diagnostican en esta etapa que tiene una duración de 3 a 8 años, posteriormente evoluciona a fases más agresivas. En la fase acelerada (FA) donde las células leucémicas pierden la capacidad de diferenciarse, aparece un aumento de células blásticas y basófilos (hasta 20%) en sangre periférica, la duración de esta fase es de aproximadamente 18 meses, ya que estos pacientes evolucionan a fase blástica (FB), resistente a la quimioterapia y caracterizada por la presencia de 30% o más de blastos en sangre y/o infiltrados extramedulares, en esta fase la supervivencia de los pacientes es de 2 a 4 meses^(6,7).

Para el establecimiento de las fases de la enfermedad se basan en el número de blastos en médula ósea o sangre periférica, en la Tabla 1 se muestran los criterios según Kantarjian. La OMS en 2008⁽⁴⁾, estableció los criterios para determinar la evolución de la enfermedad en pacientes con diagnóstico de LMC en fase crónica:

Fase acelerada: a) Blastos en SP o MO entre 10 – 19%, b) Basófilos circulantes \geq 20%, c) Trombocitopenia persistente $<$ $100 \times 10^9/L$, d) Fibrosis medular, e) Evidencia citogenética de evolución clonal.

Fase blástica: a) Blastos circulantes o en MO \geq 20%, b) Crisis blástica extramedular, c) Grandes focos o clusters de blastos en biopsia medular.

Tabla 1.

Criterios de diagnóstico de Kantarjian⁽⁵⁾.

Fase	Blastos en SP o MO.*	Blastos mas promielocitos en SP o MO. *	Basófilos	Plaquetas
Crónica	$<$ 15%	$<$ 30%	$<$ 20%	$>$ $100 \times 10^9/L$
Acelerada	15 – 29%	\geq 30%	$>$ 20%	$<$ $100 \times 10^9/L$
Blástica	\geq 30%	Enfermedad blástica extramedular		

* SP: Sangre periférica. MO: Médula ósea.

En la última fase de la enfermedad, las células leucémicas han perdido la capacidad de diferenciarse, resultando en leucemia mieloblástica aguda resistente a quimioterapia⁽¹⁾.

Inmunofenotipo.

Durante la fase blástica de la LMC, los marcadores que se expresan en más de un 80% de pacientes son CD34 y CD45^{dim}, que son utilizados como indicativos de evolución de la enfermedad, sin embargo, se han reportado algunos otros marcadores asociados, como: mieloperoxidasa citoplasmática, CD33⁺, CD13⁺ en pacientes con compromiso madurativo en serie granulocítica; HLADR^{-/+}débil, CD13⁺, CD33⁺⁺, CD117^{-/+}, CD11b⁻ en pacientes con elevada cantidad de promielocitos circulantes; a diferencia del promielocito normal, carecen de expresión fuerte de CD15. En las crisis blásticas con infidelidad de linaje, las células

muestran un fenotipo correspondiente a precursor B inmaduro (CD34⁺⁺, CD19+débil, CD13⁻/⁺débil), asociado a expresión anormalmente débil y heterogénea de CD38^(8,9,10).

Tratamiento

El objetivo del tratamiento es la reducción de la masa tumoral, y lograr la remisión citogenética. La quimioterapia es eficaz en la inducción de una respuesta hematológica; tradicionalmente se utilizaron busulfán, hidroxiurea o interferón-alfa como tratamiento de primera línea⁽⁵⁾. Actualmente los inhibidores de tirosin cinasa son el tratamiento de primera elección. A partir de 1988, se desarrolló el primer inhibidor sintético y específico de tirosin-cinasa⁽¹¹⁾. Este fue el mesilato de imatinib (MI), se comprobó que era un potente y selectivo inhibidor de la tirosin-cinasa ABL ⁽¹²⁾.

Se han desarrollado inhibidores de tirosin cinasa de segunda y tercera generación; como el dasatinib que es la primera terapia autorizada por la FDA como tratamiento de la LMC resistente o intolerante a MI. Es un inhibidor del receptor de tirosin cinasa de segunda generación, no relacionado estructuralmente con el imatinib; la inhibición del dasatinib es sobre las cinasas BCR-ABL ^(13,14). El nilotinib es un inhibidor competitivo del sitio de unión al ATP de BCR-ABL similar al MI; está indicado para pacientes en fase crónica o fase acelerada resistentes al MI. El bosutinib es un inhibidor dual del Src y ABL cinasa, actúa en múltiples mutaciones, pero no lo hace sobre la T315I, que es la más común en pacientes con LMC ^(15,16).

Para determinar la efectividad del tratamiento se toman en cuenta los factores hematológicos, citogenéticos y moleculares.

1) Respuesta hematológica completa (RHC):

- Normalización del hemograma con leucocitosis < 10.000 x 10⁹/L.
- Plaquetas dentro de rango normal.
- Ausencia de elementos inmaduros, promielocitos, mielocitos o blastos en SP.
- Ausencia de síntomas o signos de enfermedad con desaparición de esplenomegalia palpable.

2) Respuesta hematológica parcial (RHP):

- En hemograma presencia de células inmaduras (blastos, promielocitos o mielocitos).
- Descenso del recuento plaquetario $< 50\%$, con relación al recuento pre tratamiento, pero superior a $450.000 \times 10^9/L$.
- Persistencia de esplenomegalia con $< 50\%$ respecto al tamaño pre-tratamiento.

3) Respuesta citogenética (RC):

Permite evaluar la respuesta al tratamiento estableciendo el porcentaje de células Ph+, según los siguientes grupos:

- Respuesta nula (RCN) persistencia de más de 95% Ph+
- Respuesta mínima (RCMi) persistencia entre 65–95% Ph+
- Respuesta menor (RCMe) persistencia de 36–65% Ph+
- Respuesta mayor (RCMa) menos de 35% Ph+
- Respuesta completa (RCC) 0% Ph+

En los casos en que con el tratamiento se alcance la negatividad del cromosoma Ph por citogenética clásica, debe evaluarse la persistencia de células Ph+, por técnicas más sensibles; se ha detectado la aparición de clones Ph negativos portadores de otras anomalías citogenéticas; lo que ha llevado a la presencia de resistencia al tratamiento con inhibidores de la tirosin cinasa⁽¹⁷⁾.

Resistencia al tratamiento

Una de las principales limitaciones del tratamiento actual es la incapacidad de erradicar las células madre Ph+ quiescentes; por lo que aproximadamente el 15% de los pacientes en fase crónica presentan resistencia a imatinib. Se identifican dos tipos de resistencia, la primaria y la secundaria; la primera se refiere a casos en que la enfermedad es refractaria al tratamiento. La segunda se refiere a pacientes que han obtenido una respuesta previa y esta se ha perdido⁽¹⁸⁾; la mayoría de casos que presentan este fenómeno corresponden a fases avanzadas de la enfermedad, la incidencia es de 40-50% de los pacientes en fase acelerada después de 2 años de tratamiento, y aumenta al 75% después de 4 años⁽¹⁹⁾.

Resistencia a multidrogas El transporte de drogas juega un papel importante en la resistencia farmacológica, ya que permite que el fármaco sea transportado fuera de la célula, se le conoce como fenómeno de multiresistencia a drogas asociado con sobreexpresión de la glicoproteína P; en este caso la célula tumoral desarrolla resistencia cruzada a una amplia variedad de drogas que no tienen similitud estructural entre sí, después de haber sido expuestas a ellas⁽²⁰⁾. Estos transportadores se localizan en la superficie de la membrana plasmática⁽¹⁸⁾.

La expresión de esta proteína en células cromosoma Ph⁺ de pacientes con LMC se ha relacionado con la presencia de resistencia a Imatinib.⁽²¹⁾

Respuesta inmunológica

La función del sistema inmunológico es proteger al organismo de agentes extraños; así como del seguimiento de las células que lo conforman, esto se logra identificando y eliminando células anormales que expresan antígenos considerados extraños, induciendo un ataque por los linfocitos T citotóxicos contra las células transformadas que los reconocen por estar unidos a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I; sin embargo, algunas células tumorales logran evadir este mecanismo por diversas vías, como: reduciendo el número de moléculas clase I del CMH, liberando productos que inhiben la respuesta inmune o desarrollando tolerancia inmunológica a antígenos tumorales⁽²²⁾.

La respuesta inmunológica está mediada por los linfocitos T, y estos se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad funcional en: linfocitos T citotóxicos con capacidad efectora; linfocitos T cooperadores que coordinan la acción efectora y linfocitos T supresores o reguladores, que se encargan de desmontar la respuesta inmune. Al igual que los linfocitos, los tipos de respuestas montadas por ellos también pueden clasificarse de acuerdo al panel de citocinas que los estimulan y que secretan cuando son activados. Los linfocitos T cooperadores tienen 3 tipos de respuestas cooperadoras denominadas⁽²³⁾:

- **TH1:** referida como inmunidad celular; donde los linfocitos secretan Interferón gamma (IFN- γ).
- **TH2:** denominada como inmunidad humoral, es promovida por la IL-4, sintetizada por basófilos, eosinófilos y linfocitos activados, tiene un efecto antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF- α , IL-6.

- **TH17:** este tipo de respuesta ha sido descrita recientemente; predomina en mucosas y epitelios, está mediada por linfocitos CD4+ que secretan alta cantidad de IL-17.

En la mayoría de enfermedades se observan alteraciones en los linfocitos T cooperadores; una respuesta TH1 exacerbada se asocia a procesos inflamatorios, mientras que una respuesta TH2 exagerada se relaciona con enfermedades atópicas.

En cuanto a los linfocitos T reguladores o supresores naturales (Treg), son una subpoblación encargada de inhibir la activación de la respuesta inmune, manteniendo la homeostasis y favoreciendo la tolerancia a autoantígenos; por ello es que en la mayoría de neoplasias estos linfocitos presentan alteraciones⁽²³⁾.

El inmunofenotipo de esta subpoblación de linfocitos que expresan el antígeno de superficie CD4, necesario para la activación celular; expresan constitutivamente la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25); también expresan la proteína FoxP3, favoreciendo la tolerancia inmunológica, porque inhibe la síntesis de IL-2.

Un grupo muy pequeño de linfocitos son los denominados $T\gamma\delta$, ya que su TCR está conformado por una cadena γ y una cadena δ ; esta población es de aproximadamente el 5% del total de linfocitos circulantes; pero es muy abundante en mucosas, por lo que también se les llama linfocitos intraepiteliales; las funciones efectoras atribuidas a los linfocitos $T\gamma\delta$ incluyen actividad citotóxica, secreción de múltiples citocinas inflamatorias y actividad colaboradora para la producción de inmunoglobulinas.

Existe una subpoblación que se caracteriza por expresar moléculas clásicamente asociadas con el fenotipo de las células asesinas naturales (NK), lo que llevó a denominarlas células T asesinas naturales (NKT).

Otras células relacionadas en los problemas oncológicos son las células dendríticas (DC) o células presentadoras de antígeno, están estrechamente relacionadas con la activación de linfocitos T vírgenes, ya que tienen una capacidad macrofágico-inmunoestimuladora específica.

Las DC se dividen en 2 grupos, de acuerdo con los marcadores inmunofenotípicos que presentan: las primeras son las células dendríticas mieloides, que presentan integrina alfa

X, también conocido como CD11c, así como antígenos de linaje mieloide, como CD13 y CD33, necesitan del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

El segundo tipo de células dendríticas son las plasmocitoides, las cuales no expresan moléculas CD11c, pero si la cadena α del receptor de IL-3 (CD123), para su proliferación requieren de IL-3^(24,25).

II. JUSTIFICACIÓN

En pacientes con LMC, la fase de la enfermedad al momento del diagnóstico, la resistencia inicial al tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa y una baja cantidad de linfocitos CD8+ son factores que se han asociado a un mal pronóstico en la evolución del clínica del paciente. La resistencia a la farmacoterapia está mediada por la presencia de mutaciones en el sitio de acción del medicamento, así como por la expresión de la glicoproteína MDR (gp-P) que se ha relacionado como causa de resistencia y/o falla al tratamiento en pacientes que la sobreexpresan. De igual forma, la inmunosupresión ha sido motivo de controversia, ya que en diversos estudios se han observado un mayor número de recaídas en pacientes con depleción de linfocitos CD8+; todos estos factores repercuten en la evolución clínica del paciente, lo que muestra la necesidad de estudiar estos elementos de manera conjunta en los pacientes, para obtener mayor conocimientos de la enfermedad. En el servicio de Hematología del HECMNR se cuenta con una frecuencia anual de pacientes con LMC *de novo* de 45.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Son diferentes las cantidades de linfocitos *Treg*, $T_{\gamma\delta}$, *inv*NKT, células dendríticas que intervienen en la destrucción de células tumorales CD34⁺ y la sobre-expresión de glicoproteína P en células tumorales en pacientes con LMC *de novo*, en tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa y/o IFN α .?

IV. HIPÓTESIS:

Nula:

La cantidad de linfocitos *Treg*, $T\gamma\delta$, *NKT*, células dendríticas, expresión de CD34 y glicoproteína P en células tumorales en pacientes con LMC no se modifica en los diferentes grupos de estudio.

Alternativa:

La cantidad de linfocitos *Treg*, $T\gamma\delta$, *NKT*, células dendríticas, expresión de CD34 y glicoproteína P en células tumorales en pacientes con LMC se modifica en los diferentes grupos de estudio.

V. OBJETIVOS:

Objetivo general

Determinar la cantidad de linfocitos *Treg*, $T\gamma\delta$, *NKT*, células dendríticas, expresión de CD34 y glicoproteína P en células tumorales en pacientes con LMC *de novo*, en tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa y/o IFN- α .

Objetivos específicos

- Cuantificar la cantidad de linfocitos *Treg*, $T\gamma\delta$, *NKT*, células dendríticas, expresión de CD34 y glicoproteína P en muestras de donadores sanos obtenidas del Banco de Sangre y comparar los resultados de estos con los obtenidos de los pacientes.
- Comparar los resultados de la cantidad de linfocitos *Treg*, $T\gamma\delta$, *NKT*, células dendríticas, expresión de CD34 y glicoproteína P entre pacientes con LMC *de novo*, tratados con inhibidores de tirosin cinasa y/o IFN- α *versus* donadores sanos.

VI. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS:

DISEÑO DE ESTUDIO:

Por el control de maniobra: observacional.

Por la captación de información: prospectivo.

Por la medición del fenómeno en el tiempo: transversal.

Por la presencia de un grupo control: comparativo.

Por la dirección del análisis: prospectivo.

Por la ceguedad en la aplicación: abierto.

UNIVERSO DE ESTUDIO:

El estudio se realizará con la población de pacientes del servicio de Hematología en el Hospital de Especialidades del CMN La Raza durante el período comprendido de Enero del 2014 a Enero de 2015.

Con diagnóstico clínico, morfológico, citogenético e inmunofenotípico (OMS) de leucemia mieloide crónica de novo y en tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa y/o IFN- α .

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión.

Pacientes mayores de 16 años con número de seguridad vigente, diagnóstico clínico, citogenético y morfológico (OMS) de leucemia mieloide crónica *de novo*, en tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa y/o IFN- α , que ingresen y pertenezcan al servicio de Hematología del HECMNR de enero del 2014 a enero 2015.

Médula ósea (MO) con celularidad > 1000 células blásticas/microL.

Sangre periférica (SP) con celularidad > 1000 células blásticas y linfocitos/microL.

No se requiere firma de consentimiento informado debido a que las muestras que se utilizarán serán las de desecho de los estudios de rutina, el investigador principal garantizará la privacidad de los resultados.

Sangre periférica heparinizada (3 mL) de donadores clínicamente sanos, obtenidos del Banco de Sangre del CMN "La Raza". Con carta de consentimiento informado. Anexo I

Criterios de no inclusión.

Pacientes mayores de 16 años con diagnóstico clínico y morfológico (OMS) de leucemia aguda y síndrome mielodisplásico en fase blástica que ingresen al servicio de Hematología del HECMNR en el periodo de estudio.

Criterios de eliminación.

Pacientes que se pierdan durante el seguimiento al tratamiento.

Pacientes que pierdan la vigencia al IMSS.

TAMAÑO DE LA MUESTRA (Proporciones %)

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha} \sqrt{2 \pi_0 (1 - \pi_0)} + Z_{\beta} \sqrt{\pi_1 (1 - \pi_1) + \pi_0 (1 - \pi_0)}}{\pi_1 - \pi_0} \right)^2$$

$\pi_0 = 0.15$

$n = 32.6$

$\pi_1 = 0.5$

$\alpha = 0.05$

Potencia $(1 - \beta) = 0.8$

$Z_{\alpha} = 1.96$

$Z_{\beta} = 1.645$

de novo = 33

En tratamiento = 33

Donador sano = 33

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES. INDEPENDIENTES

a. Leucemia mieloide crónica.

Definición conceptual: La leucemia mieloide crónica es un síndrome mieloproliferativo crónico de naturaleza clonal que se origina de una célula progenitora hematopoyética común a las tres líneas celulares: eritroide, megacariocítica y granulocítica.

Definición operacional: Presencia de menos del 20% de blastos en médula ósea con características clínicas de evolución de la enfermedad a fase blástica: Criterios OMS.

Tipo variable: Cualitativa.

Escala de medición: ordinal (OMS: LMC: fase crónica, fase acelerada y fase blástica).

b. Respuesta a tratamiento

Definición conceptual: Eliminación de células blásticas dado el esquema de tratamiento, recuperación de la hematopoyesis normal.

Definición operacional:

Respuesta hematológica completa (RHC): Normalización del hemograma con leucocitosis $< 10.000 \times 10^9/L$, plaquetas dentro de rango normal, ausencia de elementos inmaduros, promielocitos, mielocitos o blastos en SP, ausencia de síntomas o signos de enfermedad con desaparición de esplenomegalia palpable.

Respuesta hematológica parcial (RHP): En hemograma presencia de células inmaduras (blastos, promielocitos o mielocitos), descenso del recuento plaquetario $< 50\%$, con relación al recuento pre tratamiento, pero superior a $450.000 \times 10^9/L$, persistencia de esplenomegalia con $< 50\%$ respecto al tamaño pre tratamiento.

Respuesta citogenética (RC): Permite evaluar la respuesta al tratamiento estableciendo el porcentaje de células Ph+.

Tipo variable: Cualitativa.

Escala de medición: ordinal (RHC, RHP, RC).

DEPENDIENTES

c. GpP (multirresistencia a drogas)

Definición conceptual: esta es una proteína de 170 Kd (p170) se denomina proteína P-170, pertenece a la superfamilia de proteínas transportadoras ABC, llamados así porque poseen dominios de unión a ATP; su presencia en células leucémicas se considera la principal causa de falla al tratamiento. Esta proteína participa en el transporte celular dependiente de energía, actúa como una bomba extractora con un mecanismo no conocido totalmente. Se cree que las drogas pasan a través de un poro hidrofóbico formado por un dominio transmembrana y que la salida de sustancias requiere de un cambio conformacional de la proteína dependiente de energía. Se ha sugerido que el estado de fosforilación de la gp-P pudiera regular este proceso y modular la resistencia a citotóxicos

Definición operacional: Presencia de la expresión de esta proteína en las células blásticas de la médula ósea de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica, medida por inmunocitofluorometría.

Tipo variable: Cuantitativa

Escala de medición: células/microL.

d. CD34.

Definición conceptual: Glicoproteína transmembranal presente en estadios muy tempranos de células progenitoras hematopoyéticas de las líneas granulo-monocíticas, megacariocíticas y eritroides.

Definición operacional: Presencia de la expresión de esta proteína en las células blásticas de la médula ósea de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica, medida por inmunocitofluorometría.

Tipo variable: Cuantitativa

Escala de medición: células/microL.

e. Linfocitos Treg.

Definición conceptual: Los linfocitos T reguladores o supresores naturales (Treg), son una subpoblación encargada de inhibir la activación de la respuesta inmune, manteniendo la homeostasis y favoreciendo la tolerancia a autoantígenos.

Definición operacional: Presencia de la expresión de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25) y de la proteína FoxP3 en los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺; medida por inmunocitofluorometría.

Tipo variable: Cuantitativa

Escala de medición: células/microL.

f. Linfocitos T $\gamma\delta$.

Definición conceptual: Los linfocitos T $\gamma\delta$, son linfocitos cuyo receptor de células T (TCR) está conformado por una cadena gamma y una cadena delta y dentro de sus funciones efectoras se incluyen la actividad citotóxica, secreción de múltiples citocinas inflamatorias y actividad colaboradora para la producción de inmunoglobulinas.

Definición operacional: Presencia de la expresión de la cadena gamma y delta en los linfocitos T CD3⁺; medida por inmunocitofluorometría.

Tipo variable: Cuantitativa

Escala de medición: células/microL.

g. Linfocitos *inv*NKT (NKT invariantes).

Definición conceptual: Se caracterizan por poseer un TCR conformado por una cadena alfa que tiene siempre el mismo rearreglo V α J α , con base en esta estructura constante se les ha dado el nombre de “células T invariantes restringidas por CD1d” o simplemente “células NKT invariantes” (*inv*NKT). La mayor importancia de las células *inv*NKT radica en su potente acción inmunorreguladora debida a la liberación rápida y masiva de citocinas tipo Th1 y Th2, especialmente el IFN- γ y la IL-4, luego de la activación a través de su TCR invariante.

Definición operacional: Presencia de la expresión de las cadenas v-alfa-24 y v-beta-11, en los linfocitos T CD3⁺; medida por inmunocitofluorometría.

Tipo variable: Cuantitativa

Escala de medición: células/microL.

h. Células dendríticas (DC).

Definición conceptual: Las células dendríticas (DC) o células presentadoras de antígeno (CPA), tienen una capacidad macrofágico-inmunoestimuladora específica. Las DC expresan en su superficie una gran cantidad de moléculas del CMH clase II, para la presentación de

antígenos a los linfocitos T. Las DC se dividen en 2 grupos, de acuerdo con los marcadores inmunofenotípicos que presentan: las primeras son las células dendríticas mieloides, que presentan CD11c, así como antígenos de linaje mieloides, como CD13 y CD33, necesitan del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos. El segundo tipo de células dendríticas son las plasmocitoides, las cuales no expresan moléculas CD11c, pero si la cadena α del receptor de IL-3 (CD123).

Definición operacional: Presencia de la expresión de CD11c y HLADR (DC1), CD123 y HLADR (DC2), ambas con ausencia de linaje; medida por inmunocitofluorometría.

Tipo variable: Cuantitativa

Escala de medición: células/microL.

GENERALES

Sexo

Definición conceptual: Condición orgánica, masculino, femenina.

Definición operacional: Como aparece en el expediente clínico.

Tipo variable: Cualitativa

Escala de medición: nominal, dicotómica.

Edad

Definición conceptual: Tiempo que ha vivido una persona en años desde su nacimiento hasta su ingreso al estudio.

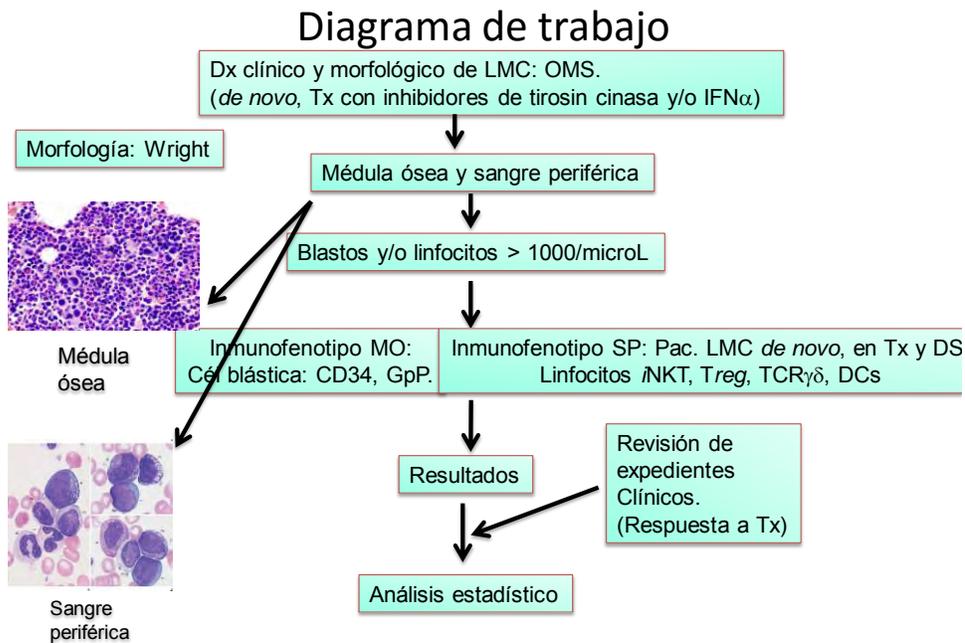
Definición operacional: años completos.

Tipo variable: Cuantitativa

Escala de medición: numérica.

a. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Pacientes mayores de 16 años con diagnóstico clínico y morfológico (OMS) de leucemia mieloide crónica *de novo*, en tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa y/o interferón alfa que ingresen o pertenezcan al servicio de Hematología del HECMNR, a los cuales se les tomara dentro de los estudios de rutina sangre periférica y aspirado de médula ósea.



b. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- ✓ Se realizará un análisis descriptivo de la información utilizando medidas de tendencia central y dispersión (mediana, percentiles 25 y 75%).
- ✓ Se compararán las medianas de los linfocitos *Treg*, $T\gamma\delta$, *NKT* y células dendríticas entre los donadores sanos y los pacientes *de novo*, en tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa y/o $IFN\alpha$.
- ✓ Se considerará como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.
- ✓ Se utilizara el programa SPSS v18.0.

c. CONSIDERACIONES ÉTICAS:

FACULTAD Y ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio se fundamenta en la experiencia previa realizada a nivel mundial. Se contempla de acuerdo a los lineamientos éticos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, Junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, Octubre de 1975. 35ª Asamblea Médica Mundial Venecia, Italia, Octubre de 1983. 41ª Asamblea Médica Mundial Hong Kong, Septiembre 1989, 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996 y la 52ª Asamblea General Edimburgo, Escocia, Octubre 2000. Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002. Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la 59ª Asamblea General de la AMM, Seúl Corea 2008 y a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud mexicana en materia de investigación para la salud.

Una vez aprobada la investigación por el comité de Enseñanza e Investigación y Bioética del Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret” del Centro Médico Nacional “La Raza”, se procederá a utilizar las muestras de desecho de los de los pacientes y bajo consentimiento informado se obtendrán 3 mL de sangre periférica de los donadores del Banco de Sangre del CMN “La Raza”.

El estudio será realizado por profesionales de la salud, con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del paciente y del donador sano bajo la responsabilidad de una Institución que cuenta con los recursos humanos y materiales necesarios para que garanticen su bienestar. Prevalciendo siempre el criterio de respeto a la dignidad y protección de sus derechos.

d. RECURSOS HUMANOS, MATERIALES y FINANCIEROS:

Servicio de Hematología CMN La Raza

Jefe del servicio de Hematología: Jorge Vela Ojeda

Hematólogo adscrito al servicio de hematología: Dr. José Luis Manuel Ayala Sánchez.

Investigador Asociado: Dr. Hiram Ulises Severino Lugo. Residente de 3er año de Hematología.

Química responsable del proyecto: D en C. Laura Arcelia Montiel Cervantes

Citómetro de flujo modelo FACSCalibur, modelo Becton Dickinson. Programa Cell Quest Pro.

Insumos necesarios para la inmunofenotipificación.

Computadora

Hoja de captura de datos

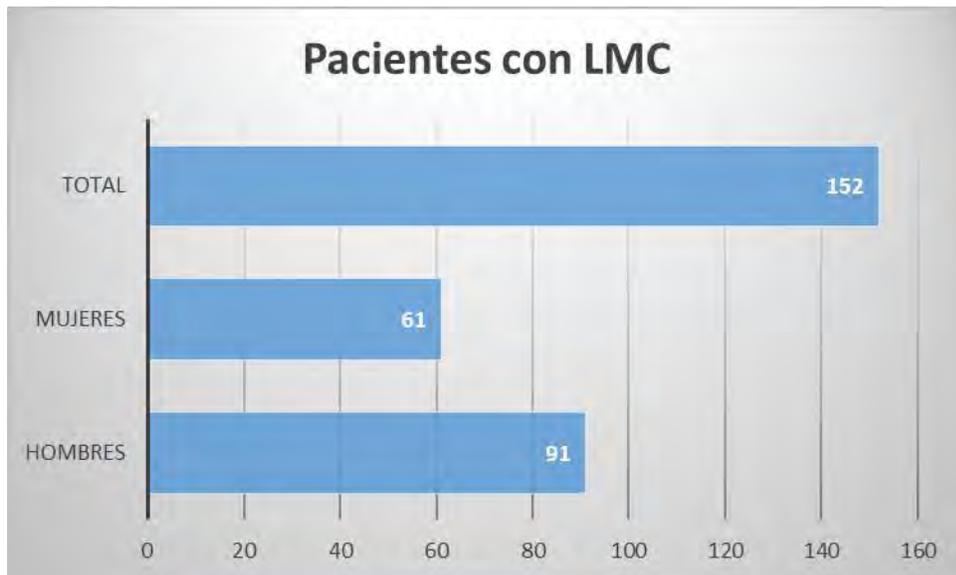
El costo de la investigación será absorbido por la institución hospitalaria, ya que esta cuenta con los recursos humanos, físicos y materiales para llevarla a cabo.

El proyecto no generara gastos adicionales para lo previstos de la atención ordinaria de los pacientes.

VII. RESULTADOS:



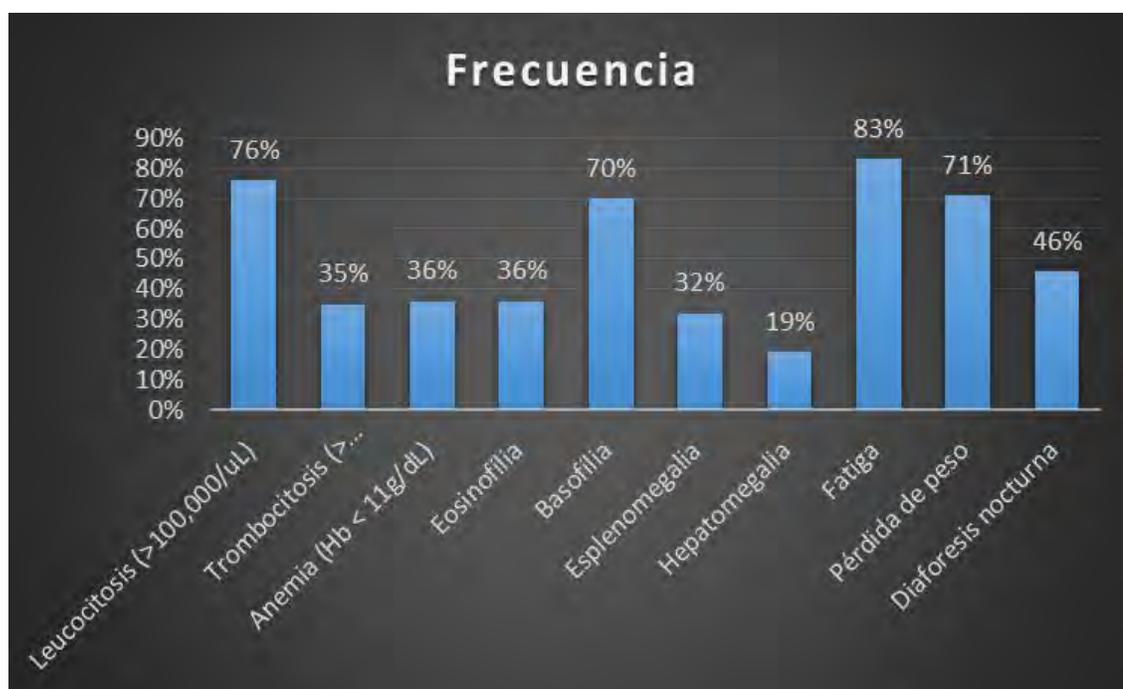
Del grupo control que son donadores clínicamente sanos del Banco de sangre del CMN "La Raza" se obtuvieron 33 muestras en total, de estos donadores la mediana de edad fue de 43 años (rango de 19-64 años), dentro de los cuales un 75% (25) fueron hombres y un 25% (8) mujeres.



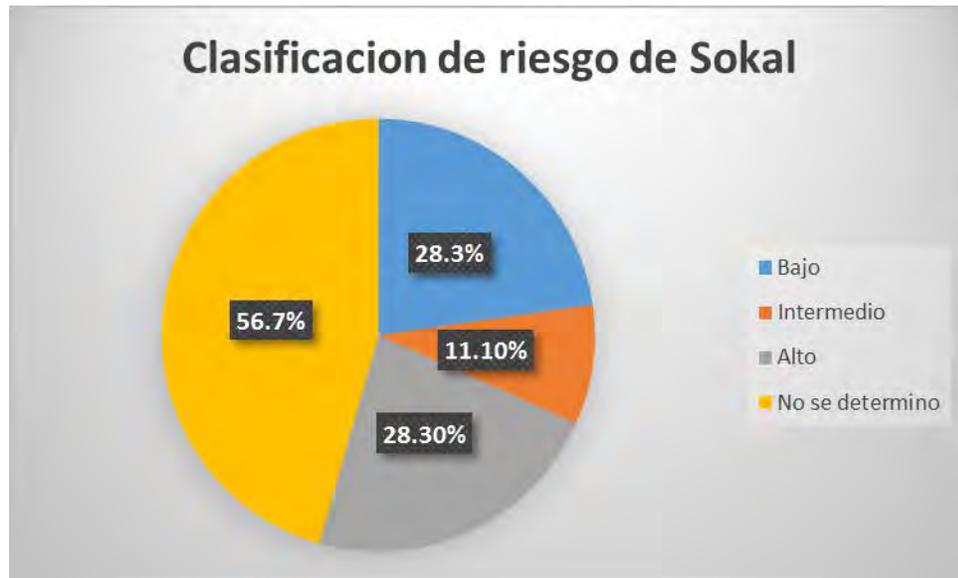
De los pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica se realizó la caracterización morfológica, citoquímica e inmunofenotípica de 152 muestras de sangre periférica, de los cuales 91 fueron hombres (60%) y 61 fueron mujeres (40%).

La mediana de edad al diagnóstico de los pacientes estudiados con leucemia mieloide crónica fue de 41 años, con una mínima de edad de 11 años y un máximo de edad de 83 años; la mediana de edad actual de los pacientes estudiados es de 45.5 años, con una mínima de edad de 16 y un máximo de edad de 90 años.

Situación en tiempo	Mediana de edad
Edad al diagnóstico	41 años (11-83)
Edad actual	45.5 años (16-90)

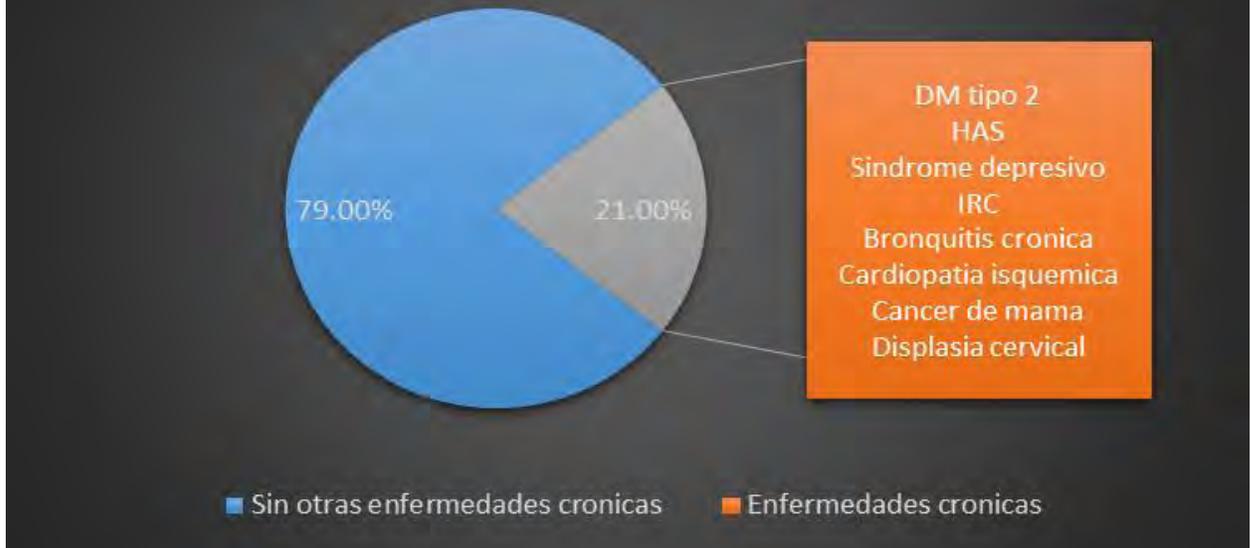


Las principales alteraciones de los pacientes estudiados en la biometría hemática son la leucocitosis con diversos grado de eosinofilia y basofilia, trombocitosis y anemia de diferentes grados, así como síntomas constitucionales siendo los más frecuentes: diaforesis profusa, pérdida de peso y fatiga, además de presentar diversos grado de síndrome infiltrativo con hepatomegalia y/o esplenomegalia sintomática.



Dentro de la revisión del expediente clínico también se buscó la clasificación de riesgo otorgado al momento del diagnóstico por medio de la escala realizada por Sokal et al. que tiene en cuenta la cantidad de blastos, el tamaño del bazo, la cuenta plaquetaria y la edad, permitiendo diferenciar 3 grupos de riesgo: bajo, intermedio y alto.

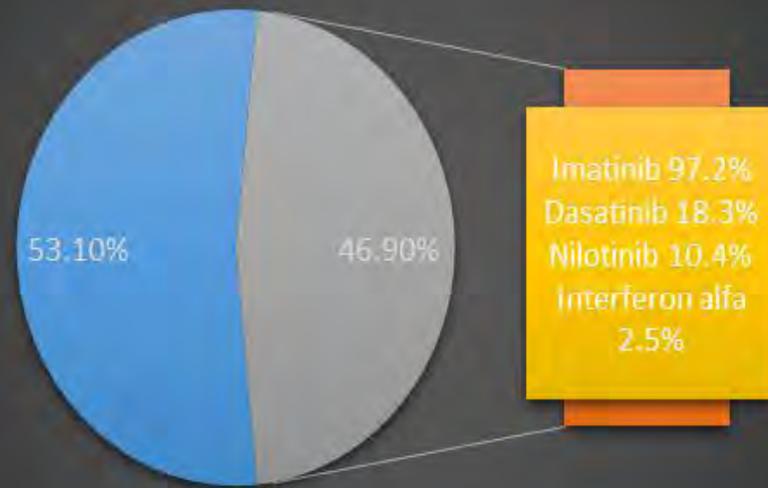
Enfermedades crónicas asociadas



De los pacientes con leucemia mieloide crónica se determinó que el 21% de estos padecía otra enfermedad crónica asociada como síndrome depresivo, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial sistémica, insuficiencia renal crónica, bronquitis crónica, cardiopatía isquémica que ameritaban una terapia farmacológica además del tratamiento de la LMC; además de determino 2 pacientes que presentaron otras neoplasias como cáncer de mama y displasia cervical que amerito histerectomía.

Además de presentar el cromosoma Philadelphia (t9;22) en los pacientes con leucemia mieloide crónica se identificó si estos pacientes presentaban otras alteraciones citogenéticas adicionales, donde se encontró que el 12% de los pacientes presentaban otras alteraciones dentro de las cuales se encontraban: derivativo 15, translocación 15;16, 47 XY (+8) [2], 46 XX (del 7) [5], 46 XX (del 22,q11) [3], doble Ph (+), poliploidias y t(3;9).

Resistencia a tratamiento



■ No resistentes a tratamiento

■ Resistentes a tratamiento

Se determinó que el 46.9% de los pacientes presentaban resistencia a inhibidores de cinasa de tirosina o interferón alfa, dentro de los cuales a imatinib un 45.6%, dasatinib 8.6%, nilotinib 4.9% e interferón alfa 1.2%.

Subpoblación	Donador sano (n=33)	Pacientes de novo (n=9)	Pacientes en tratamiento				P
			IM (n=88)	NIL (n=23)	DAS (n=18)	IFN-a (n=14)	
LcT (cel/μL)	5430	50000	5050	5010	6340	11090	<u>0.0021*</u>
Lf (cel/μL)	3340	2221	1593	1754	2175	2754	<u>0.0003*</u>
CD3 (cel/μL)	1543	5360	1609	1711	1946	2436	<u>0.0281*</u>
CD4 (cel/μL)	721.8	3667	763.7	392.5	760.2	955.2	0.2443
CD8 (cel/μL)	530.1	1704	695.5	533.8	1186	1467	<u>0.0437*</u>
NK (cel/μL)	28.2	12.6	26.2	31.3	68.4	67.2	0.5417
NKT (cel/μL)	6.2	10.6	7.3	2.79	10.8	75.4	0.1419
iNKT (cel/μL)	3.2	4.8	2.5	1.8	3.6	5.7	0.7360
DC ₁ (cel/μL)	2.1	4.6	1.1	2.4	1.6	2.24	0.2120
DC ₂ (cel/μL)	0.8	4.8	0.9	1.5	0.5	6.8	0.1144
T _{γδ} (cel/μL)	4.7	51.5	10.1	5.4	25.3	16.9	<u>0.0011*</u>
T _{CD4reg} (cel/μL)	2.8	17.7	1.4	1.7	2.4	6.2	0.1046
T _{CD8reg} (cel/μL)	1.2	4.8	2.2	0.68	0.9	2.7	0.2801
CD45 _{low} (cel/μL)	646	1196	2.3	2.6	83.3	72.5	<u>< 0.0001*</u>
GpP (cel/μL)	18.7	246.7	0.22	0.21	6.2	4.9	<u>< 0.0001*</u>
GpP	5.8%	22.6%	10.5%	10.8%	9.5%	8.1%	0.2748

Se determinaron las medianas de los leucocitos totales, linfocitos totales, subpoblaciones linfocitarias, células dendríticas y determinación de glicoproteína P en el donador sano, pacientes de novo y pacientes en los diferentes tipos de tratamiento establecido, se determinó la significancia estadística.

Al analizar la tabla anterior se demuestra que los pacientes de novo presentaban cifras de leucocitos más alta en comparación con los donadores sanos y con los pacientes en las diferentes formas de tratamiento, donde se puede observar que la cifra de leucocitos en los donadores sanos son valores muy cercanos en comparación con los pacientes en tratamiento; los valores de linfocitos totales se encontraron más disminuidos en los grupos de imatinib y nilotinib en comparación con los demás grupos sin embargo sin tener criterio para ser linfopenia.

Analizando las subpoblaciones de linfocitos, la subpoblación de células CD3+ fue mayor en los pacientes de novo y en los pacientes tratados con interferón alfa, los donadores sanos tuvieron cifras semejantes que los pacientes tratados con inhibidores de cinasa de tirosina; la subpoblación de células CD4+ fue mayor en los pacientes de novo en comparación con los donadores sanos y los pacientes en tratamiento, así como no hubo diferencia significativa de las cifras comparando los donadores sanos con los pacientes en tratamiento. La subpoblación de células CD8+ presentaron cifras de mediana mayores el grupo de pacientes de novo y los que tienen tratamiento con dasatinib e interferón alfa, con diferencia significativa cuando se le compara con los donadores sanos y el grupo de tratamiento con imatinib y nilotinib.

La subpoblación de linfocitos NK estuvieron las cifras más altas en pacientes en tratamiento con dasatinib e interferón alfa, disminuidas en los pacientes de novo sin embargo al comparar todos los subgrupos la diferencia no fue significativa; los linfocitos NKT presentaron cifras mayores en pacientes en tratamiento con dasatinib e interferón alfa en comparación con los donadores sanos y el grupo de tratamiento con nilotinib e imatinib sin embargo sin ser estadísticamente significativas. Las células iNKT presentaron cifras más altas en pacientes con interferón alfa en comparación tanto con el grupo de donadores sanos y los pacientes de novo así como el resto de los grupos de tratamiento, sin diferencia significativa.

Las células dendríticas tipo 1 se encontraron con cifras más altas en pacientes de novo en comparación con el grupo de donadores sanos, así como en el grupo de tratamiento, sin ser estadísticamente significativa; con respecto a las células dendríticas tipo 2 presentaron cifras más altas los pacientes de novo y los pacientes en tratamiento con interferón alfa en comparación con los donadores sanos y el grupo de tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina, sin ser estas diferencias significativas.

Los linfocitos $T\gamma\delta$ presentaron cifras mayores en el grupo de pacientes de novo y en el grupo de pacientes en tratamiento con interferón alfa en comparación con el grupo de donadores sanos y el grupo de pacientes en tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina siendo estas diferencias significativas.

En la subpoblación de linfocitos TCD4 reg presentaron cifras más altas los pacientes de novo y los pacientes en tratamiento con interferón alfa en comparación con los donadores sanos y el grupo de pacientes en tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina, sin diferencia significativa. La subpoblación de linfocitos TCD8 reg solamente se encontraron aumentados en pacientes de novo en comparación con donadores sanos, y los pacientes bajo tratamiento con nilotinib y dasatinib presentaron cifras menores en comparación con los donadores sanos.

Las células CD45 low presentaron un aumento significativo en los pacientes de novo en comparación con los donadores sanos y una disminución de las cifras en pacientes bajo tratamiento con imatinib y nilotinib en comparación con los donadores sanos; la expresión de glicoproteína P se vio aumentada en pacientes de novo en comparación con donadores sanos y se encontró disminuida en el grupo de pacientes en tratamiento comparándolos con los donadores sanos, estadísticamente significativa.

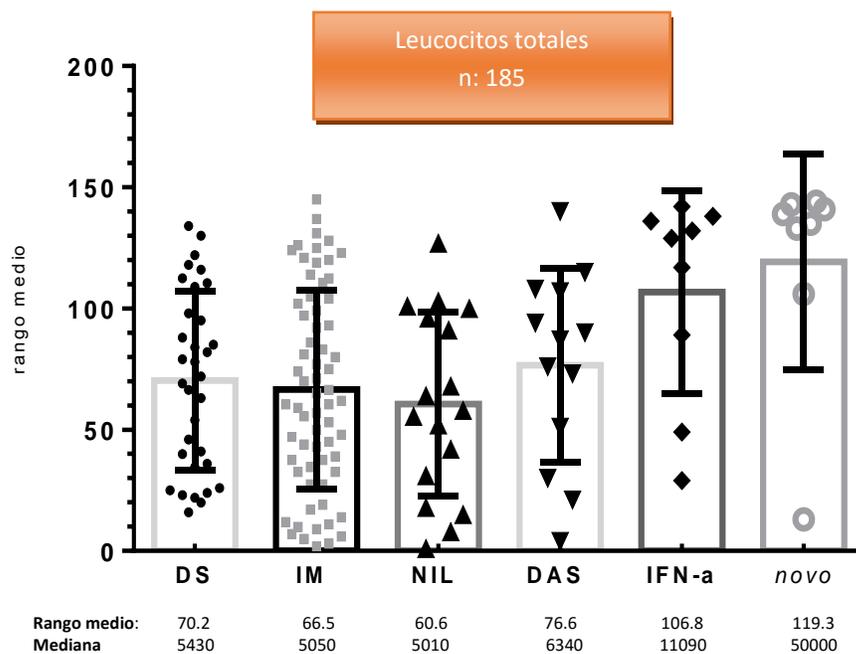


Tabla donde se demuestra la determinación de leucocitos totales por grupo de pacientes y donadores sanos (DS), se muestran los valores del rango medio, medianas y desviación estándar.

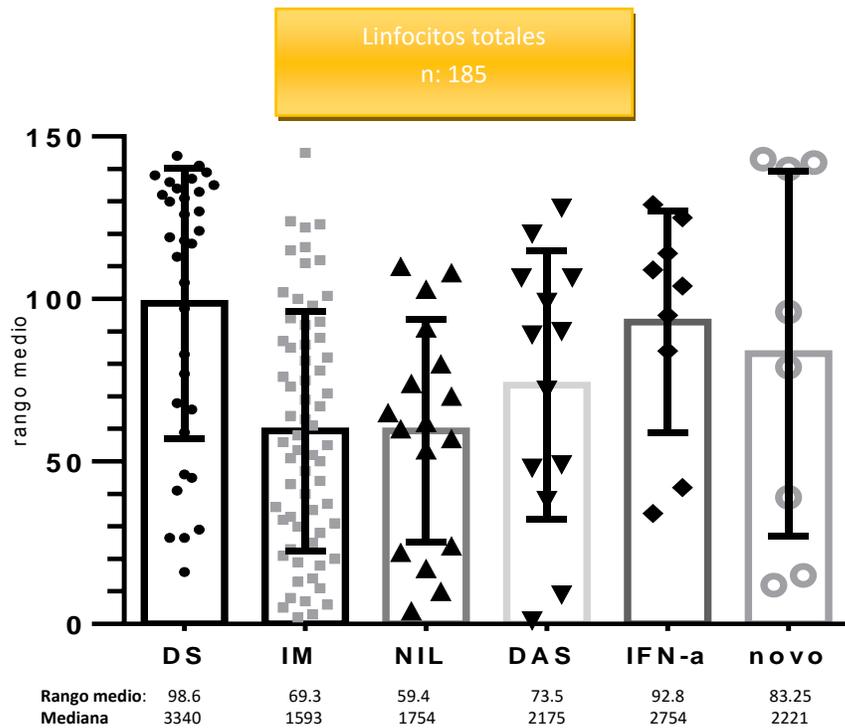


Tabla donde se demuestra la determinación de linfocitos totales por grupo de pacientes y donadores sanos (DS), se muestran los valores del rango medio, medianas y desviación estándar.

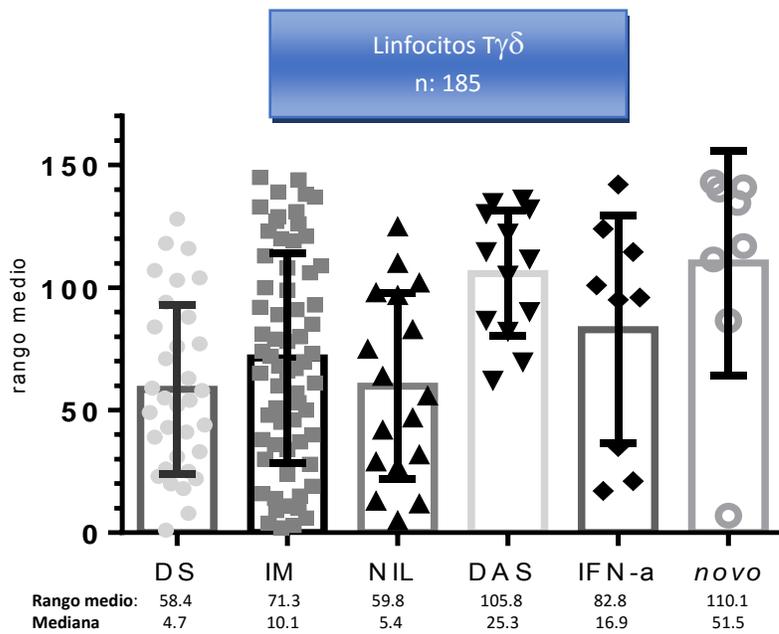


Tabla donde se demuestra la determinación de linfocitos $T\gamma\delta$ por grupo de pacientes y donadores sanos (DS), se muestran los valores del rango medio, medianas y desviación estándar.

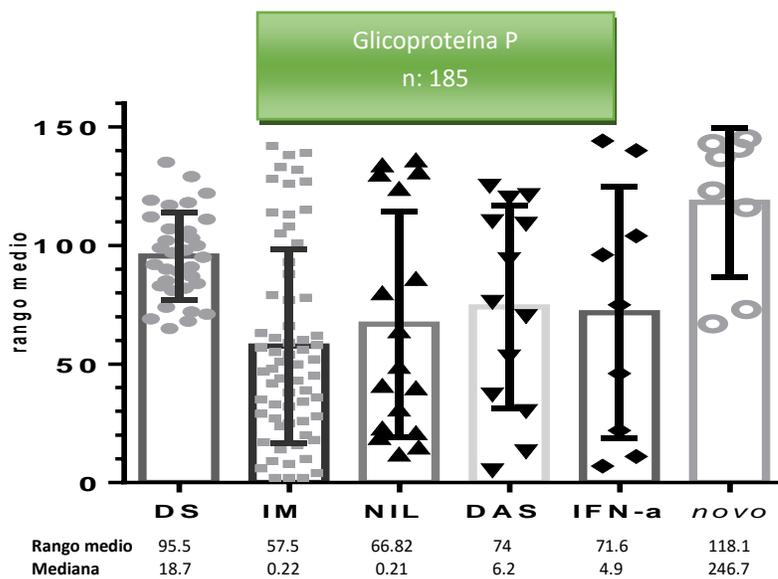


Tabla donde se demuestra la determinación de glicoproteína P por grupo de pacientes y donadores sanos (DS), se muestran los valores del rango medio, medianas y desviación estándar.

VIII. DISCUSIÓN:

La leucemia mieloide crónica es una neoplasia mieloproliferativa crónica que afecta principalmente al adulto con una mediana de presentación en nuestro medio de 41.56, cifra cercana a la que se obtuvo con este estudio de 41 años, al contrario de lo reportado en Norteamérica y Europa quienes reportan una mediana de edad de 67 años⁽³²⁾, siendo en nuestro medio la edad de presentación mas joven; esta enfermedad es más frecuente en varones como se demostró también en este estudio con el 60% varones y 40% mujeres⁽³²⁾.

Esta enfermedad es la leucemia crónica más frecuente en nuestro medio, donde solo el 20.2% de los casos se presenta de forma asintomática, donde los síntomas más frecuentes con la fatiga presentada en el 83% de los pacientes en nuestro estudio, anorexia, pérdida de peso en un 71%, donde el hallazgo más común al examen físico es la esplenomegalia reportado en la bibliografía en un 58% siendo en este estudio solo se reportó en un 32%, hepatomegalia en 21.7% siendo cercana a la cifra demostrada en el estudio de 19%, la anemia en estudios publicado fue la forma de presentación en 64.6% de los pacientes siendo reportada en nuestros pacientes en un 36%, donde la alteración más frecuente hematológica en el grupo de pacientes fue la leucocitosis en un 76% de los casos⁽³³⁾.

Dentro de la clasificación de riesgo de la enfermedad hay diversas escalas pronosticas disponibles actualmente, dentro de las cuales la más usada sigue siendo la escala de Sokal que fue diseñada previa a la era de imatinib, en la era donde la quimioterapia se basaba en busulfan e hidroxiurea sin embargo actualmente continua siendo de gran utilidad ⁽³⁴⁾ a pesar de que el tratamiento se basa en inhibidores de cinasa de tirosina; en Norteamérica y Europa la mayoría de los pacientes se diagnostican en riesgos bajos debido a la mayor utilidad de estudios de escrutinio, sin embargo en nuestra población la gran mayoría de los pacientes son clasificación en riesgos altos debido el retraso del diagnóstico y a que presentan gran actividad leucémica a su diagnóstico, en este estudio durante la revisión de expedientes un 56.7% de los pacientes no se realizó la determinación de riesgo al momento del diagnóstico, seguido de 28.3% clasificando de riesgo alto, 3.7% de riesgo intermedio y 11.1% riesgo bajo. Esta enfermedad como ya se menciona es una enfermedad principalmente de adultos donde la prevalencia de enfermedades crónicas es más frecuente ⁽³⁵⁾, en este estudio se demostró que un 21% de los pacientes tienen enfermedades crónicas asociadas las cuales también ameritaban tratamiento farmacológico, además de tener a 2 pacientes con neoplasias asociadas como una paciente con cáncer de mama y una paciente con displasia de cérvix que amerito tratamiento quirúrgico.

Esta enfermedad se caracteriza por una translocación balanceada recíproca entre el cromosoma 9 y 22, formando el cromosoma Philadelphia; sin embargo se pueden presentar tanto alteraciones citogenéticas adicionales o evolución clonal con alteraciones citogenéticas en las mismas metafases en que se presenta el cromosoma Philadelphia que

nos habla de una progresión de la enfermedad ya sea a fase acelerada o fase blástica⁽³⁶⁾, en este estudio se encontró que el 12% de los pacientes presentaban otras alteraciones genéticas además del cromosoma Philadelphia, donde dentro de las alteraciones presentadas la trisomía del cromosoma 8 y el doble cromosoma Ph⁺ se asocian con progresión de la enfermedad; además que en los pacientes que presentan otras alteraciones genéticas es más frecuente que presenten resistencia al tratamiento, dentro de este estudio se determinó que el 46.9% presentaban resistencia al tratamiento, de este porcentaje el 97.2% eran resistentes a imatinib, 18.3% a dasatinib, 10.4% a nilotinib y 2.5% a interferón alfa, por lo cual se realiza en estos pacientes cambio de inhibidor de cinasa de tirosina o sinergia con un inhibidor de cinasa de tirosina e interferón alfa; una de las causas más importantes de resistencia a imatinib reportado son la presencia de bombas de eflujo de glicoproteína P a través de la expresión del gen MDR-1 que impiden que el fármaco alcance su proteína blanco.

Dentro de la determinación de los leucocitos totales en los diversos grupos se pudo observar que los pacientes de novo presentaron cifras más elevadas característico de la fase inicial de la enfermedad donde se presenta leucocitosis por expansión clonal en medula ósea; los pacientes en tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina presentaron niveles más bajos esto es debido a que inicialmente a los pacientes se les inicia tratamiento con fármacos citoreductores como lo es la hidoxicarbamida con posterior inicio de los inhibidores de cinasa de tirosina manteniendo este último fármaco los niveles estables de la cifra de leucocitos debido a su función de inhibición de la célula tumoral clonal en medula ósea; en los pacientes con tratamiento a base de interferón alfa presentaron cifras mayores en comparación con el grupo bajo tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina, una de las razones puede ser las propiedades de este fármaco que tiene efectos sobre la respuesta inmune humoral, promotor del ciclo celular de células que están en estado de quiescencia, aumentando la actividad y número de linfocitos citotóxicos y de células dendríticas⁽³⁷⁾, siendo en nuestro estudio la subpoblación que presento cifras más altas en comparación con los demás subgrupos son la subpoblación de linfocitos NKT, células dendríticas tipo 2 y linfocitos TCD8 reg.

En las subpoblaciones linfocitarias CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ se presentaron cifras más elevadas en los pacientes de novo esto es debido a la leucocitosis inicial que presenta este grupo a expensas de todas las líneas celulares, así como también encontrarse cifras más altas en el grupo de interferón alfa en comparación con el grupo de inhibidores de cinasa de tirosina debido a lo anteriormente comentado que aumenta la actividad y número de linfocitos citotóxicos⁽³⁷⁾.

Las células NKT y iNKT en el presente estudio se demostró que estaban con cifras menores en pacientes de novo, este subtipo linfocitario tiene un papel muy importante en el proceso de inmunovigilancia principalmente detectando células cancerígenas, teniendo un efecto

citotóxico directo y una función inmunomoduladora regulando las citocinas del tipo TH1 y TH2, por lo cual al encontrarse disminuidas en este grupo de pacientes nos traduce que estas células no cumplen su función totalmente por presentar cifras más bajas, perdiendo su función de inmunovigilancia⁽³⁷⁾. Los linfocitos NKT presentaron cifras mayores en pacientes en tratamiento con dasatinib e interferón alfa en comparación con los donadores sanos y el grupo de tratamiento con nilotinib e imatinib aunque no fue estadísticamente significativo lo que confirma que con tratamiento con dasatinib produce un aumento en la cifra de células citotóxicas directas como los linfocitos NKT⁽³⁸⁾ haciendo que el tratamiento con este fármaco tenga mejores resultados traducido a la clínica con respuestas más tempranas, respuestas moleculares más profundas, teniendo menos falla a tratamiento lo que se traduce como una mayor sobrevida libre de enfermedad comparado con imatinib.

En cuanto a la determinación de las células dendríticas tipo 1 y tipo 2 se encontraron con cifras más altas en los pacientes de novo en comparación tanto con los donadores sanos y los grupos de tratamiento con inhibidor de cinasa de tirosina, aun no hay estudios donde se determina esta subpoblación en pacientes con LMC para poder realizar una correlación; si se observó que en los pacientes bajo tratamiento con interferón alfa presentaron cifras más elevadas aunque sin ser estadísticamente significativas, este dato que ya se demostrado en diversos estudios donde se ha visto las propiedades inmunomoduladoras aumentando el número y función de las células dendríticas, estas células son de suma importancia debido a que activan linfocitos vírgenes, son células presentadoras de antígeno por excelencia, secretan citocinas como interferón alfa y gamma, así como activar otras células citotóxicas⁽³⁹⁾.

Los linfocitos $T\gamma\delta$ presentaron cifras mayores en el grupo de pacientes de novo y en el grupo de pacientes en tratamiento con interferón alfa en comparación con el grupo de donadores sanos y el grupo de pacientes en tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina siendo estas diferencias significativas, en los pacientes de novo este aumento puede ser debido a la proliferación de todas las líneas celulares, sin embargo estas células es probable que tengan una función deficiente⁽⁴⁰⁾, con respecto al aumento en el grupo de pacientes con interferón alfa confirmando su función inmunomoduladora ya que estas células tienen acción citotóxica directa, produce citocinas inflamatorias y reconoce antígenos no dependientes del complejo de histocompatibilidad mayor importantes para el proceso de inmunovigilancia⁽⁴⁰⁾.

En este estudio la expresión de glicoproteína P se vio aumentada en pacientes de novo en comparación con donadores sanos y se encontró disminuida en el grupo de pacientes bajo tratamiento comparándolos con los donadores sanos, siendo esta estadísticamente significativa; ya se ha determinado que la glicoproteína P es una de las causas más importantes de resistencia a tratamiento a través de la expresión del gen MDR-1 que impiden que el fármaco alcance su proteína blanco, así como la producción de bombas de

eflujo del fármaco; debido a que en los pacientes se encontró cifras aumentadas se puede explicar porque cierto grupo de pacientes de novo en la clínica presentan resistencia inicial principalmente al uso de imatinib, después de haber descartado mal apego a tratamiento o mutaciones asociadas a resistencia como la T315I; en el grupo de pacientes bajo tratamiento esta expresión de glicoproteína P se encontraba en cifras más bajas esto probablemente se trate de que con el tratamiento se han eliminado la mayor cantidad de células leucémicas que pueden producir o sobreexpresar la glicoproteína-P, seria de utilidad en pacientes que son resistentes a tratamiento medir la expresión de esta glicoproteína para determinar si es la causa de resistencia en ese grupo de pacientes.

IX. CONCLUSIONES:

1. En los pacientes *de novo* se apreciaron aumento en los valores de subpoblaciones linfocitarias: CD3+, CD4+, CD8+ y Treg, posiblemente a causa del fenómeno de inmunomodulación generado por las células Ph+; donde los linfocitos Treg parecen desempeñar un papel importante.
2. Los agentes usados en el tratamiento de la LMC provocaron modificaciones en el sistema inmunológico de los pacientes, en general aumentando el número de células citotóxicas (T γ δ).
3. En los pacientes que alcanzaron y mantuvieron una respuesta se observó que presentan disminución en la regulación del sistema inmune, sugiriendo que se mantienen en un estado híper-reactivo.
4. En pacientes con respuesta a tratamiento la expresión de GpP baja, posiblemente debido a la que el número de células Ph+ que sobreexpresan la glicoproteína disminuyen, como mecanismo de resistencia al tratamiento.
5. De los agentes usados en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, el dasatinib es el fármaco que induce mayor proliferación de células citotóxicas, así como disminución de células reguladoras en los pacientes, de este modo, el sistema inmune se encuentra activo, lo que puede favorecer al mantenimiento de la respuesta.

X. BIBLIOGRAFÍA:

1. Rodríguez, M., Felipe-Cardona A, Enciso L, "Leucemia mieloide crónica en crisis blástica: bases moleculares y diagnóstico." *Cancerología* 2007; 10, (no. 4): 257-266.
2. Pavón-Morán, V., Hernández-Ramírez P, Jaime-Fagundo J, "Imatinib en leucemia mieloide crónica." *Hematología, inmunología y hemoterapia* 2005; 21, (no. 3).
3. Góngora-Biachi, R., Selva-Pallares J, Gómez-Almaguer D, "Declaración Mexicana de Posición para el Tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica 2005.", *Hematología* 2005, (6).
4. OMS. *The WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008.
5. Giraldo-Castellanos, P., Franco-García M, Palomera-Bernal L. "Guía Clínica de Actuación en LMC." HEMATOLOGÍA, FUNDACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA HEMATOLOGÍA HEMOTERAPIA EN ARAGON, Zaragoza, 2003.
6. Chávez-González, MA., Ayala-Sánchez M, Mayani H. "La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento." *Investigación clínica*, 2010; 61, (no. 3).
7. Morales, C., Torres V, Valencia JE, "Leucemia mieloide crónica: diagnóstico y tratamiento." *CES Medicina*, 2010, 24, (no. 1): 97-108.
8. Orfao, A, Ortuno F, De Santiago M, "Immunophenotyping of acute leukemias an myelodysplastic syndromes." *Cytometry*, 2004, (54): 62-71.
9. Roa-Higuera, C., Fiorentino S, Rodríguez-Pardo V, "Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría.", *Científicas de América*, 2010, 15, (no. 3): 206-223.
10. Orfao, A, et al. "Inmunofenotipaje de hemopatías malignas: de la investigación básica a la práctica asistencial." *Hematología*, 2008, 93, (no. 1): 79-83.
11. Hernández-Ramírez, P. "Nueva opción terapéutica en leucemia mieloide crónica." *Hematología, inmunología y hemoterapia*, 2001, 17, (no. 3).
12. Druker, BJ, Sawyer CL, Kantarjian HM. "Activity of a specific inhibitor of the BCR/ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the philadelphia chromosome." *New England Journal Medical*, 2001, 344, (no. 14): 1038-1042.
13. McFarland, KL., Wetzstein GA. «Chronic myeloid leukemia therapy: focus on second generation tyrosine kinase inhibitors.» *Cancer Control*, 2009, 16, (nº 2): 132-40.

14. Wong, SF. "New dosing schedules of dasatinib for CML and adverse event management." *Journal Hematol Oncol*, 2009, 23, (no. 2): 10.
15. Ramírez, P, Dipersio JF. "Therapy options in Imatinib failures." *Oncologist*, 2008, 13, (no. 4): 424-34.
16. Swords, R., Mahalingam D, Padmanabham S, "Nilotinib: optimal therapy for patients with chronic myeloid leukemia and resistance or intolerance to imatinib." *Drug Des Devel Ther*, 2009, 21, (no. 3): 89-101.
17. Nese, M., Díaz L, Muxi P. "Pautas de diagnóstico y tratamiento en hematología." *Cátedra de Hematología*, 2005, 1, (no. 3).
18. Best-Aguilera, C., López-Guillén I, Osuna-Díaz J. "Resistencia a imatinib en leucemia mieloide crónica.", *Hematología*, (2009), 10, (no. 1): 5-8.
19. Delgado-López, N., Medrano-Contreras J, Terreros-Muñoz E, "Leucemia mieloide crónica. Fase acelerada, *Hematología*, 2009, 10, (no. 1 y 2): 14-16.
20. Quiñones-Sepúlveda, L., Roco-Arriaga A, Squicciarini-Rueda V, "Polimorfismos genéticos y su influencia en la efectividad del tratamiento quimioterapéutico de pacientes leucémicos." *Cuaderno Médico* 2010, 50, (no. 4): 288-295.
21. Raghava-Srivalli, K., Lakshmi P. "Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 48, (no. 3).
22. Palma-Ramos, A., et al. "Demostración de la participación de la respuesta inmunitaria celular adquirida (TCD4+ TH1) contra eumicetoma." *Revista Mexicana de Dermatología*, 2012, 56, (no. 2): 102-108.
23. Serrano-Hernández, A. "Células colaboradoras (TH1, TH2, Th17) y reguladoras (Treg, TH3 y NKT) en artritis reumatoide." *Revista de Reumatología clínica*, 2009, 5, (no. 1): 1-5.
24. Lasso, P., Cuellas, A, Rosas F, "Células dendríticas y linfocitos T reguladores naturales en pacientes con enfermedad crónica de Chagas." *Revista de Infectología*, 2009, 13, (no. 4).
25. Morales-Matus, V. "Células dendríticas ¿Tienen futuro en oncología?" *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 2009, (no. 588): 129-133.
26. O'Brien et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2003, (348): 994-1004.

27. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Longterm prognosis significance of early chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*. 2010; 116: 3758-3765.
28. Cortes et al. A phase III, randomized, open-label study of 400 mg versus 800 mg of imatinib mesylate (IM) in patients (pts) with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) using molecular endpoints: 1-year results of TOPS (tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity) study. *Blood*. 2008. 112: 130-131.
29. Hochhaus et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic phase chronic myeloid leucemia after failure of imatinib therapy. *Blood*. 2007. 109: 2303–2309.
30. Kantarjian et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Eng J Med*. 2006. 354:2542–2551.
31. Grigg et al. Role of allogeneic stem cell transplantation for adult chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006. 12:795–807.
32. Vargas-Viveros P, Hurtado R, Cervera E, et al. The age of mexican patients with chronic myeloid leukemia (CML) Ph+ is quite younger than the reported in USA and European series. *Blood (ASH annual meeting abstracts) 2009*, 114: Abstract 4291.
33. Aguayo A, Garcia-Alvarez E, Cazares-Ordoñez Y, et al. Chronic Myeloid Leukemia: A clinic-epidemiologic and therapeutic description of a single institution in Mexico City. *Clinical Leukemia* 2008, Nov; 2(4):261-266.
34. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984 Apr; 63 (4):789-799.
35. Pavón Morán, V., Hernández Ramírez, P., Martínez Antuña, G., Agramonte Llanes, O., Jaime Fagundo, J. C., & Bravo Regueiro, J. (2005). Leucemia mieloide crónica: Actualización en citogenética y biología molecular. *Rev Cubana de Hematol Inmunol Hemoter*, 21:1-10.
36. Davila-Rodriguez M, Cerda Flores R, Leal Garza C, et al. Alteraciones cromosomicas secundarias en pacientes con leukemia mieloide cronica, en un hospital de referencia al noreste de México. *Gac Med Mex*, 2004, Nov/Dic; 140 (6), 589-592.
37. Chávez-González, M. A., Ayala-Sánchez, M., & Mayani, M. (2009). La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Rev Invest Clin*, 61:221-32.
38. Mustjoki, S., Auvinen, K., Kreutzman, A., Rousselot, P., Hernesniemi, S., Melo, T., Porkka, K. (2012). Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia*, 27:914-924.

39. Liu, Y. J. (2005). IPC: Professional Type Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. TNF/TNFR Family members in co-stimulation of t cell responses, *Annu Rev Immunol*. 23:275-306.
40. Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Gombert, J. M. (2012). Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eu J Immunol*, 42:1870-1875.

XI. ANEXOS:
ANEXO I: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Lugar y Fecha _____

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

DETERMINACION DE LINFOCITOS Treg, T γ δ , \mathcal{N} KT, CÉLULAS DENDRÍTICAS, EXPRESIÓN DE CD34 Y GLICOPROTEÍNA P EN PACIENTES CON LMC *de novo*, EN TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE TIROSIN CINASA Y/O IFN α .

Registrado ante el Comité Local de Investigación con el número: _____

El objetivo del estudio es: Determinar la cantidad de linfocitos Treg, T γ δ , \mathcal{N} KT, células dendríticas, expresión de CD34 y glicoproteína P en pacientes con LMC *de novo*, en tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa y/o IFN- α .

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: permitir que tomen 3 mL de sangre periférica en un tubo extra al momento de tomar los tubos para estudios de rutina en la donación de sangre, para que también se les realicen las determinaciones de células llamadas linfocitos, sin tener que realizar otra punción, realizándose estas determinaciones el mismo día que se realicen los estudios de rutina para la donación de sangre.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

No existe riesgo alguno, ya que solo se manejara la identificación del sexo y edad de mi muestra, el Investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Nombre y firma del paciente o del representante legal

Investigador Principal: D en C. LAURA ARCELIA MONTIEL CERVANTES.

. ASOC. "A". HEMATOLOGÍA.

Testigos

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: 5724-5900 ext 23090 y 23213.

Clave: 2810-009-013

ANEXO II

HOJA DE CAPTURA DE DATOS:

Paciente	LMC <i>de novo</i>				LMC Tratamiento				Donador sano			
	1	2....		40	1	2....		40	1	2....		40
FECHA												
NOMBRE												
EDAD												
SEXO												
NSS												
CNX10 ³ /mL												
PqX10 ³ /mL												
%Basófilos												
%Blastos												
CD34X10 ³ /mL												
GpPX10 ³ /mL												
TregX10 ³ /mL												
TgdX10 ³ /mL												
<i>inv</i> NKTX10 ³ /mL												
DC1X10 ³ /mL												
DC2X10 ³ /mL												
Resp a Tx1												
Resp a Tx2												
Resp a Tx3												

ANEXO III

TINCIONES PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

* WRIGHT

Finalidad. Es una tinción policromática, que permite la identificación de los diversos tipos celulares de la sangre periférica y la médula ósea.

Principio de la prueba. Los colorantes policromáticos son mezclas de azul de metileno alterado por calentamiento en solución de NaHCO_3 o en dicromato de potasio (azul de metileno) y eosina. El azul de metileno es azul violeta y tiñe los componentes celulares ácidos como el núcleo y el RNA citoplásmico. La eosina es roja y tiñe los componentes más básicos como la hemoglobina. Algunas estructuras se tiñen con ambos componentes. Los colorantes son soluciones metanólicas del precipitado que se forma al mezclar los dos colorantes. Debido a que estas son disueltas en metanol, la solución puede ser empleada tanto para fijar como para teñir.

Reactivos. Existen muchas soluciones de buena calidad disponibles en el comercio; el colorante seco puede ser adquirido en forma de polvo. Para preparar una solución del colorante seco, se pone 0.1 g en un mortero con adición secuencial de pequeñas cantidades de metanol absoluto hasta un volumen final de 60 mL. La mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente de 1 a 2 días. Es filtrada antes de su uso. El colorante de Wright se guarda en una botella herméticamente tapada para impedir la entrada de vapor de agua y no se abrirá cuando se están usando soluciones ácidas o básicas, por ejemplo, mientras se efectúa la tinción para el hierro.

Técnica. Las extensiones deben ser sostenidas en una posición horizontal. Se cubre la extensión con el colorante en cantidad suficiente hasta cubrir totalmente la superficie. Se deja el colorante de 1 a 2 minutos para que fije la extensión. El tiempo óptimo para este paso se determina para cada lote de colorante. Entonces se añade agua destilada, agua corriente o solución amortiguadora (sol. amortiguadora de fosfato sódico 0.05M a pH 6.4) para diluir el colorante. La cantidad de agua debe ser suficiente para cubrir completamente el portaobjetos, pero no debe sobrepasarlo. Cuando el colorante es diluido se forma una extensión fina, metálica en apariencia. El colorante diluido se deja en el portaobjetos de 3 a 6 minutos. El tiempo óptimo para este paso también debe ser determinado para cada lote de colorante. Se lava con agua corriente y se deja secar al aire.

Interpretación. Las extensiones teñidas de manera conveniente son aproximadamente de color rosado, al microscopio los hematíes son de color rosa, el núcleo azul y el citoplasma rosa.

ANEXO IV.

ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.

A partir de cada una de las muestras se les realizará cuantificación de células nucleadas en el equipo Advia 120 marca Siemens para ajustar la cantidad de células a $10^6/100\mu\text{L}$ y poder realizar la tinción utilizando para esta cantidad de células $20\mu\text{L}$ del anticuerpo en estudio. Inicialmente a todas las muestras se les aplicarán los criterios del grupo OMS utilizando las tinciones de Wright, a todas ellas se les realizarán estudios de inmunocitofluorometría. Los anticuerpos monoclonales que se utilizaran para medir la multirresistencia a drogas de los blastos leucémicos serán: CD34PerCP y antiglicoproteína P PE; para cuantificar las células dendríticas: antiLin1FITC, CD123PE, HLADR-PerCP y CD11cAPC; para las subpoblaciones linfocitarias: TCR $\gamma\delta$ -FITC, CD3PerCP, vbeta11-FITC, valfa24-PE, CD8-FITC, FoxP3-PE, CD4PerCP, CD25-APC, además de todos los insumos necesarios para la tinción intra y de superficie de acuerdo a el procedimiento establecido por el fabricante; todos los anticuerpos monoclonales serán de la marca Becton Dickinson (San José Cal. EUA). Todos los marcadores se analizaran por citometría de flujo utilizando el programa "Cell Quest Pro" versión 5.1.1 en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD San José Cal. EUA).

ANEXO V.

ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA

Tratamiento

Basado en las respuestas logradas por el estudio aleatorizado de Imatinib, un inhibidor de tirosina cinasa selectivo, comparado con Interferón α y bajas dosis de Citarabina (estudio IRIS)⁽²⁶⁾, se estableció al Imatinib como el tratamiento estándar en pacientes con LGC en fase crónica. La actualización del estudio IRIS confirmó los resultados iniciales, con una supervivencia libre de progresión del 84% y una supervivencia global del 88% después de 6 años⁽²⁷⁾. La dosis inicial de imatinib en fase crónica es de 400 mg VO cada día. No existe indicación actual para iniciar la dosis con 600 u 800 mg al día, ya que se ha demostrado la falla de esta superioridad al compararla con 400 mg al día⁽²⁸⁾. El uso de hidroxiurea se recomienda únicamente como método paliativo o en fases iniciales debido a la leucocitosis.

Evaluación de la respuesta

Los 3 tipos de respuestas logradas con Imatinib son: óptima, subóptima y falla al tratamiento. En caso de lograr “respuesta óptima”, se deberá continuar el tratamiento con Imatinib de forma indefinida. Una vez que se documente “falla al tratamiento”, se debe considerar tratamiento con inhibidores de segunda generación, como son Dasatinib (BMS 354825)⁽²⁹⁾ y Nilotinib (AMN107)⁽³⁰⁾. 50% de los pacientes en fase crónica resistentes o intolerantes a Imatinib logran una RCC con cualquier inhibidor de tirosina cinasa de segunda generación, sin embargo ambos son inefectivos en caso de presentar la mutación T315I. En caso de lograr respuesta, esta generalmente es rápida, por lo que se podrá decidir seguir con el inhibidor de segunda generación o realizar trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas⁽³¹⁾. Aún se desconoce el mejor tratamiento de aquellos pacientes con “respuesta subóptima”, sin embargo se puede continuar el tratamiento con Imatinib, misma o mayor dosis, así como considerarlos candidatos a recibir inhibidores de segunda generación.

Los pacientes que presentan fase acelerada o progresan a fase blástica, su tratamiento dependerá del tratamiento recibido previamente, y puede incluir otros inhibidores de tirosina cinasa o quimioterapia sistémica. Aquellos pacientes que no tengan acceso a inhibidores de tirosina cinasa se propone tratamiento paliativo (Citarabina, Hidroxiurea) o tratamiento epigenético.

Seguimiento

El seguimiento es parte fundamental del tratamiento para evaluar la respuesta. Al inicio, y durante los primeros 3 meses, se dará seguimiento clínico, hematológico y bioquímico cada 2 semanas, o más frecuente en caso que sea necesario; posteriormente se dará seguimiento dependiendo de las condiciones y respuesta obtenida, siendo en rangos de hasta cada 3 a 6 meses aproximadamente. A partir del tercer mes se recomienda realizar estudios citogenéticos por lo menos cada 6 meses hasta lograr la respuesta citogenética completa, y en caso de ser posible realizar RT-PCR cada 3 meses hasta lograr una respuesta molecular mayor. Una vez lograda la RCC o RMM, la citogenética se podrá realizar cada 12 meses y RT-PCR cada 6 meses; en caso de tener riesgo alto o presentar una respuesta subóptima, se podrá realizar el monitoreo más frecuente. En el *Cuadro 1* se define el monitoreo de acuerdo con el tipo de respuesta y en la *Figura 1* se señala el tratamiento de acuerdo con la respuesta obtenida.

Cuadro 1:

Monitorización y respuesta al Imatinib

Respuesta	Descripción de Monitorización
Hematológica	Al diagnóstico, después cada 15 días hasta lograr RH, posteriormente cada 3 meses y como sea requerida
Citogenética	Al diagnóstico, a los 3 meses y a los 6 meses; después cada 6 meses hasta lograr y confirmar RCC; posteriormente cada 12 meses
Molecular por RT-PCR	Cada 3 meses hasta lograr y confirmar RMM, después cada 6 meses

Definición de respuesta hematológica, citogenética y molecular

Tipo de respuesta	Definición
Hematológica	
Completa	LT <10/ μ L Basófilos <5% Ausencia de mielocitos, promielocitos y mieloblastos Plaquetas <450/ μ L Ausencia de bazo palpable
Citogenética	
Completa (RCC)	Metafases – de Ph
Parcial (RCP)	1-35% de metafases + de Ph
Menor (RCM)	36-65% de metafases + de Ph
Mínima (RCMin)	66-95% de metafases + de Ph
Ninguna (NoRC)	>95% de metafases + de Ph
Molecular	
Completa (RMC) Mayor (RMM)	Transcritos indetectables de BCR-ABL por RT-PCR Radio de BCR-ABL a ABL <0.1% de la escala internacional

Ph: cromosoma Philadelphia; (-): negativo; (+): positivo