



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

**DETERMINACION DE LA EXPRESION DE FAS/CD95 EN
PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA
TRATADOS CON IMATINIB**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN
HEMATOLOGIA**

PRESENTA:

DRA. MARIELA CARDIEL SILVA

ASESOR

DR. EDUARDO EMIR CERVERA CEBALLOS



MEXICO, D.F.

AGOSTO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Tesis AGRADECIMIENTOS

A mis *padres* con todo mi cariño y agradecimiento por su amor, su ejemplo y apoyo constante...

A mi hermana por su apoyo incondicional...

A Carlos por su amor eterno y sincero...

Con gran admiración a mi maestro Dr. Juan Rafael Labardini Méndez por su dedicación en la enseñanza, por ser una persona excelente...

A mi asesor Dr. Eduardo Cervera Ceballos por su enseñanza, tiempo y dedicación...

A mis maestros Dr. Valentin Lozano Zavaleta, Dra. Silvia Rivas Vera, Dr. Juan Ramón Chalapud Revelo por sus contribuciones en mi formación...

A mis amigos, Ramiro Espinoza , Cindy Ledesma e Ivette Carrasco, por compartir tantos momentos, por su amistad....

ÍNDICE

PÁGINA

1.-Introducción	2
2.-Antecedentes	3
3.-Justificación	12
4.-Objetivos	13
5.-Hipótesis	13
6.-Criterios de inclusión y exclusión	14
6.-Material y métodos	15
7.-Resultados	18
8.-Conclusiones	24
9.-Bibliografía	25

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un trastorno clonal mieloproliferativo que resulta de la transformación neoplásica de células hematopoyéticas pluripotenciales, corresponde al 15-20% de las leucemias en adultos y se caracteriza por la presencia de la translocación entre los cromosomas 9 y 22, t(9;22)(q34;q11.2) la cual produce un gen quimérico BCR-ABL que se traduce como producto de fusión de proteínas con actividad tirosino cinasa incrementada, ligada a la patogénesis de la LMC, por tanto representa un blanco ideal para intervención terapéutica. El tratamiento para LMC ha cambiado dramáticamente en los últimos años, la introducción del mesilato de Imatinib comenzó la era de terapia molecular al producir respuestas citogenéticas completas en más del 80% de los pacientes y respuestas moleculares mayores en el 90% de los casos. Actúa como inhibidor de cuatro proteínas tirosino cinasas, en las células que expresan BCR-ABL inhibe la autofosforilación de BCR-ABL, la fosforilación de sustratos y la proliferación, e induce apoptosis (proceso fisiológico de muerte celular en forma controlada en respuesta a diversos estímulos, en este caso a agentes externos como lo son los quimioterápicos). Existen 2 vías de apoptosis (externa e interna) en la externa una señal interacciona con una serie de receptores de muerte de la membrana celular como el Fas (CD95). Pocos estudios han reportado la expresión de Fas CD95 en células de leucemia, Lijita y cols realizaron un estudio sobre la expresión funcional de Fas (CD95) en células de leucemia mieloide aguda (LAM) en el contexto de expresión de CD34 y CD38 (pero no en relación a tratamiento) en 64 pacientes donde se concluyó que hay una expresión variable de Fas en células de LAM, y que la apoptosis mediada por Fas podría ser relevante clínicamente, por lo que surgió la idea de determinar la expresión de FAS/CD95 como marcador de apoptosis en leucocitos de pacientes con LMC antes y después de iniciar tratamiento con Imatinib, así como correlacionar con otro marcador: anexina V. Además de determinar la relación de los marcadores de apoptosis con la obtención de respuesta hematológica.

ANTECEDENTES

A) LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

La leucemia mieloide crónica (LMC), conocida también como leucemia granulocítica crónica (LGC) es un trastorno mieloproliferativo que resulta de la transformación neoplásica de células hematopoyéticas pluripotenciales con incidencia de 1-2 casos por 100 000 habitantes, más frecuente en varones con una relación respecto a mujeres de (1.3-1.5:1) corresponde al 15-20% de todas las leucemias en adultos. La edad de presentación es a los 50-60 años, se relaciona en cuanto a su etiología con radiaciones, antígenos HLA, y con la presencia de cromosoma Philadelphia que resulta de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, t(9;22) (q34;q11) (**fig 1**) la cual implica el movimiento de un segmento del protooncógeno Abelson, ABL del brazo largo del cromosoma 9 a la región principal del agrupamiento del punto de rotura (M-BCR) en el cromosoma 22 y el movimiento de un fragmento del cromosoma 22 al cromosoma 9. Los cromosomas resultantes se etiquetan como 22q- ya que falta parte del brazo largo y 9q+ porque el brazo largo lo es más de lo normal. Así, resulta también como un marcador de buen pronóstico en los pacientes que cursan LMC. La enfermedad tiene 3 fases una crónica, una acelerada y una blástica, la primera no cuenta con características de la segunda y de la tercera, la fase acelerada se define como uno ó más de los siguientes: por la presencia de células blásticas 15-19% en sangre periférica (SP) o médula ósea(MO), basófilos >20% trombocitopenia <100x10⁹ no relacionada al tratamiento. Y la crisis blástica definida por la presencia de >20% de blastos en SP, MO ó involucro extramedular ó ambos, el grupo Europeo considera la fase acelerada con un porcentaje de blastos de 15-20% y la blástica mayor de 30%.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la enfermedad se muestra en el **cuadro 1**, donde se reporta el porcentaje de presentación de los síntomas y signos en LMC, sin olvidar que algunos pacientes se encuentran asintomáticos y son detectados como hallazgo en reporte de laboratorio ó pueden presentar síntomas pocos comunes (diaforesis, priapismo, tinitus)

SINTOMAS	%	SIGNOS	%
Fatiga	83	Esplenomegalia	95
Pérdida de peso	61	Dolor esternal	78
Plenitud temprana	38	Linfadenopatía	64
Hemorragia	35	Hepatomegalia	48
Dolor abdominal	33	Púrpura	27
Fiebre	11	Hemorragia retiniana	21

Cuadro 1.-Manifestaciones clínicas en pacientes con LMC, reportados en porcentaje de acuerdo a frecuencia de aparición

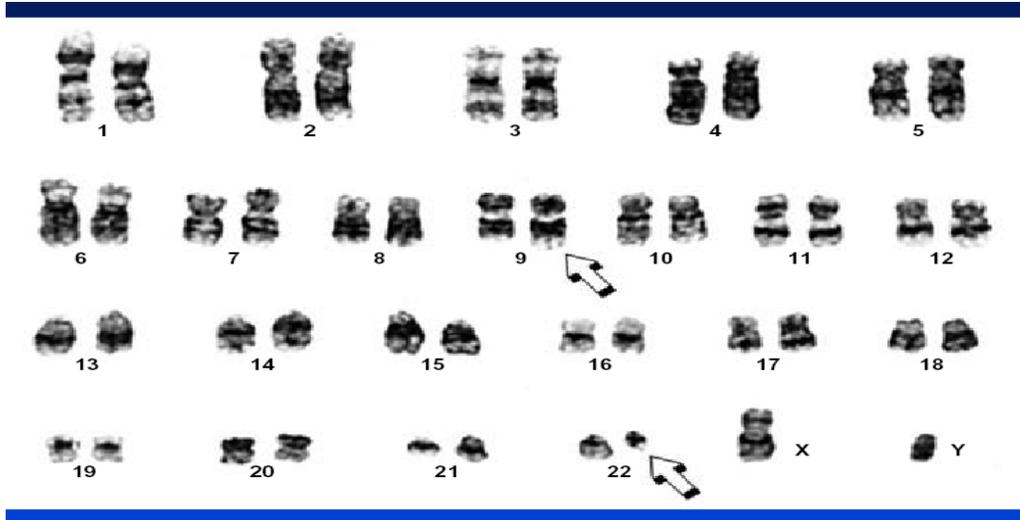


Figura 1.-Cromosoma Philadelphia : t(9:22)

En el reporte de laboratorio la cuenta de leucocitos es elevada al diagnóstico ($25 \times 10^9/L$), en un 50% de los casos se reporta cuentas $>100 \times 10^9/L$, además de granulocitos en todos los estadios de desarrollo, neutrófilos hipersegmentados, la fosfatasa alcalina de los neutrófilos esta disminuida ó ausente. En el estudio de médula ósea, se observa hiper celularidad, con granulopoyesis dominante, eosinófilos y basófilos estan incrementados en relación a como se encuentran en sangre periférica(2), en ocasiones se pueden ver células de pseudo Gaucher

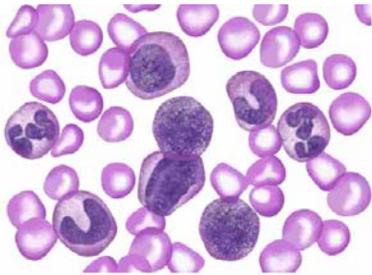


Figura 2 Frotis de sanare periférica

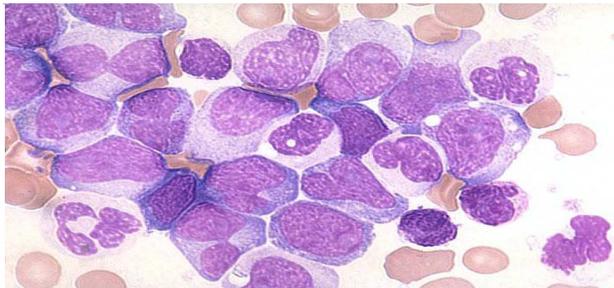


Figura 3 Frotis de médula ósea , se observan blastos mieloides (fase blástica)

El tratamiento para LMC ha cambiado dramáticamente en los últimos años, la introducción del mesilato de Imatinib (Glivec®) comenzó la era de terapia molecular al producir respuestas citogenéticas completas en más del 80% de los pacientes y respuestas moleculares mayores en el 90% de los casos, es decir las mejores respuestas

comparados con otros tratamiento como hidroxiurea e Interferón α . Pertenece a el grupo de los 2-fenilaminopiridinas desarrollado en 1990. Actúa como inhibidor de cuatro proteínas tirosino cinasas, : Ableson (*ABL*),receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGRF*) α Y β Y *KIT*, así como el gen relacionado a Abelson (*ARG*). En las células que expresan BCR-ABL inhibe la autofosforilación de BCR-ABL, la fosforilación de sustratos y la proliferación, e induce apoptosis, mecanismo fisiológico de muerte celular que en este caso esta inducido por agentes externos como lo son los quimioterápicos. A continuación se explica el mecanismo de apoptosis.

APOPTOSIS

En condiciones fisiológicas las células dañadas, se eliminan a través de un tipo de muerte celular denominada apoptosis, del griego antiguo apo-toe-sis, que significa desprendimiento de las hojas del árbol en otoño. Kerr en 1972 retomó el término y lo aplicó a la pérdida de las células por los tejidos para la supervivencia del hospedero. Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular porque cuando se altera se producen enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varios tipos de neoplasias. Cuando la gravedad del daño es tal que la célula no puede repararse, se activan mecanismos que la dirigen al suicidio a través de un grupo de moléculas, conservadas evolutivamente, que constituyen la maquinaria apoptótica. Aunque algunas de estas moléculas son ubicuas y generales, otras son específicas de algunos tejidos y utilizan señales también específicas.

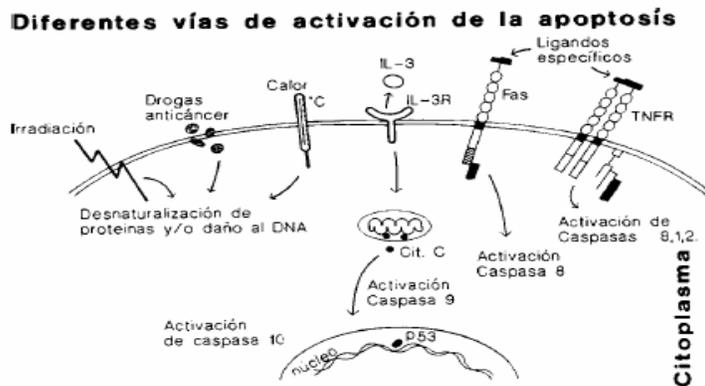


Figura 5



Figura 4

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células al inicio del proceso apoptótico, consiste en una condensación del citoplasma y reducción del volumen celular acompañado de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana; esto es seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De manera análoga, la membrana celular experimenta invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando

racimos de vesículas (**Fig 4**) El proceso de apoptosis ha sido subdividido en 3 fases diferentes: inductora, efectora y de degradación.

La investigación sobre alteraciones de la apoptosis se ha dirigido últimamente a intentar detectar anomalías en los genes implicados en el control y regulación de este proceso. Se han identificado en el ser humano algunos genes cuya transcripción parece ser crucial en este proceso: *fas*, *p53*, *bcl-2*, entre otros. El gen *fas/APO-1/CD95* es un inductor de apoptosis en los linfocitos T y B ya activados.. Este gen codifica una proteína transmembrana de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, cuya estimulación conduce a la apoptosis de linfocitos T y B previamente activados. Teniendo en cuenta que la apoptosis constituye un mecanismo que evita una proliferación excesiva y descontrolada de células implicadas en la respuesta inmune, no debe extrañar que una de las señales que estimulan la apoptosis en los linfocitos sea la propia activación de éstos. Esta señal es transmitida a un segundo mensajero intracelular (calcio, protein-cinasa C, tirosin-cinasa) que actúa a nivel del núcleo y ocasiona la transcripción de determinados genes. La expresión de estos genes determina la sobre expresión del receptor de FAS (rFas) y la inducción del Fas ligando (LFas), lo que hace que se active el proceso de apoptosis en dicha célula. Por lo tanto, la apoptosis inducida por la activación se desencadena por la reestimulación de los LB por sus inmunoglobulinas de superficie o por la reinteracción antigénica con los receptores de los LT ya activados, esto conlleva a la transcripción de anti-oncogenes por los mecanismos apoptóticos.

Así pues, la llamada "apoptosis inducida por la activación" se desencadena por la estimulación de las inmunoglobulinas de membrana en los linfocitos B, y en los LT por la interacción con su receptor (TCR) a cargo de antígenos o, experimentalmente, Este fenómeno tiene importancia en la autotolerancia (selección tímica negativa), en la tolerancia inmunológica (desensibilización), y en el mecanismo de "feed-back" para evitar respuestas inmunes exageradas (fenómenos autoinmunitarios y síndromes linfoproliferativos). ⁽⁶⁾El gen *p53* también llamado "guardián del genoma", se encarga de estimular la apoptosis cuando hay un daño importante del DNA que no podrá ser reparado. El *p53* es un oncogén recesivo, localizado en el brazo corto del cromosoma. Sus alteraciones se han relacionado con el origen de diversas neoplasias (colon, mama, pulmón, etc). Su función parece estar asociada principalmente a la regulación del ciclo celular mediante el bloqueo del paso de la fase G1 a S. De esta forma, la célula sufre apoptosis si existen alteraciones en el DNA de difícil reparación.

El protooncogén *bcl-2* inhibe habitualmente la apoptosis, de manera que, en caso de una sobre expresión anómala, permitirá una proliferación celular excesiva con el posible desarrollo de neoplasias. Bcl-2 fue inicialmente identificada por su participación en la mayoría de linfomas no Hodgkin de células B, donde la traslocación intercromosomal t(14:18) yuxtapone el gen *bcl-2* con el locus de las inmunoglobulinas, lo que lleva a la transcripción de altos niveles de *bcl-2*, con el consiguiente incremento de la supervivencia celular.

Vías de inducción de apoptosis

Existen dos tipos generales de vías de señalización que permiten el inicio de la activación de caspasas iniciadoras de la muerte celular programada. La primera de ellas depende de la participación de la mitocondria y la segunda implica a los receptores de muerte como son el receptor 1 de TNF (TNFR-1) y Fas (CD95). **(Fig 5)** se asocia con Apaf-1 y después con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. Las proteínas de choque térmico (heat-shock proteins, HSP) actúan en múltiples pasos regulando la apoptosis. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 que se encarga de ejecutar la apoptosis generando distintos subprogramas cuya suma resultará en el desmantelamiento ordenado y en la muerte de la célula.

Vía Intrínseca ó Mitocondrial

La mitocondria no es sólo la productora de energía de la célula, es también un arsenal. La mitocondria secuestra un potente cóctel de proteínas proapoptóticas. La más prominente entre ellas es el citocromo c, el humilde transportador de electrones. Varios trabajos han revelado que el citocromo c es todo lo contrario a inocuo y que además de su implicación en la fosforilación oxidativa mitocondrial, es uno de los componentes requeridos para la activación de la caspasa-9 en el citosol. No se conoce exactamente cómo el citocromo c atraviesa la membrana externa, pero está claro que la **familia de Bcl-2** está íntimamente implicada en la regulación de este proceso. El nombre de la familia se debe al primer miembro, que fue aislado como un gen implicado en el linfoma de células B

Se ha identificado un inhibidor de las IAPs de mamíferos, denominado **Smac** (second mitochondria-derived activator of caspases) o **DIABLO** (direct IAP-binding protein with low pI). Smac/DIABLO se une a los miembros de la familia de las IAPs y neutraliza su actividad antiapoptótica. Curiosamente, Smac/DIABLO es una proteína mitocondrial normal pero su liberación al citosol celular induce apoptosis, presumiblemente siguiendo la misma ruta de salida que el citocromo c. Por tanto, si una célula está comprometida a sufrir apoptosis y libera el contenido mitocondrial al citosol, entonces Smac/DIABLO secuestra las proteínas IAPs y se asegura que estas proteínas no intenten parar el programa en curso.

La vía mitocondrial se ejecuta en respuesta a intromisiones externas y a daño en el DNA. Las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria, a menudo a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2. Excepto Bcl-2, que está la mayoría del tiempo anclado a membranas intracelulares, algunos miembros de los grupos II y III, incluyendo Bax, Bad, Bim y Bid, pueden localizarse tanto en el citosol como en organelos. La forma citosólica de estas proteínas es un reservorio inactivo pero preparado para la batalla. Las señales proapoptóticas redirigen estas proteínas a la mitocondria donde tendrá lugar la lucha por el destino de la célula. La activación de miembros proapoptóticos puede producirse a través de proteólisis, defosforilación y probablemente otros mecanismos. Los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 se encuentran en la superficie de la mitocondria donde regulan la salida del citocromo c por un mecanismo todavía debatido. Si los miembros proapoptóticos ganan,

una gran cantidad de moléculas son liberadas desde la mitocondria. La principal de estas moléculas liberadas es el citocromo c.

Vía extrínseca o de los receptores muerte

Los receptores de muerte de la familia del receptor de TNF (TNFR) incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Los miembros de esta familia están caracterizados por presentar de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína. Los receptores de muerte también poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado **dominio de muerte** (death domain, **DD**). Cuando un ligando se une a estos receptores se puede producir la muerte por apoptosis de la célula que los posee.

El miembro de los receptores de muerte más estudiado y relevante en Inmunología es el CD95 ó Fas. La oligomerización, más probablemente la trimerización, del CD95 tras la unión de su ligando, FasL, es requerida para la transducción de la señal apoptótica. Un complejo de proteínas se asocia con el CD95 activado. Este **complejo de señalización inductor de muerte** (death-inducing signalling complex, **DISC**) se forma en el segundo de los receptores trimerizados. Primero, el adaptador **FADD** (Fas-associated death domain) o Mort1 se une a través de su dominio de muerte al dominio de muerte del CD95.

FADD también presenta el denominado **dominio efector de muerte** (death-effector domain, **DED**), y, de nuevo por interacciones homólogas, recluta en el DISC la procaspasa-8 (o FLICE) que contiene un DED. Después, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes. La caspasa-8 activa rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular.

La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen dos DED y que se unen al complejo CD95-FADD. Esto inhibe el reclutamiento y la activación de la caspasa-8, antiguamente conocida como FLICE, de ahí el nombre de **proteínas inhibidoras de FLICE** (FLICE-inhibitory proteins, **FLIP**). La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. El solapamiento y la integración de las dos vías se debe a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid incrementando enormemente su actividad proapoptótica que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de las condiciones, este solapamiento es mínimo, y las dos vías operan de manera independiente.

La apoptosis es la que genéticamente controla el programa de suicidio celular que puede ser activado por la detección de células contra la desregulación del oncogen, el estímulo que induce stress y el daño producido por agentes al DNA. Al Bcr-Abl se le ha atribuido una actividad antiapoptótica, la cual parece promover el desarrollo y la resistencia a las drogas por la Leucemia mieloide Crónica (LMC). Estudios han demostrado que el Bcr-Abl tiene una fuerte función antiapoptótica sobre las citosinas que promueve una selectiva activación de los Stats. El incremento de la actividad de las cinasas en células positivas Bcr-Abl nos conduce a la activación de las proteínas Stats, las cuales entran seguidamente al núcleo y activan la transcripción de genes envueltos en el proceso apoptótico. Alguno de estos genes han demostrado estar envueltos en la oncogénesis mediada por Bcr-Abl, así tenemos: c-myc, Bcl-x, ciclina D1 y P21waf. La leucemia mieloide crónica al progresar hacia la fase aguda, frecuentemente la expresión de niveles de Bcr-Abl se incrementa. Esta fase muestra profundas características apoptóticas que se reflejan en dificultad en el tratamiento. Además una duplicación del cromosoma Ph1 representa más frecuentemente una anomalía cariotípica en la fase aguda de la leucemia mieloide crónica. También líneas de células inmortales, múltiples copias o la amplificación del gen Bcr-Abl han sido observadas.

La inhibición de apoptosis, sin embargo, no se considera el primer mecanismo que emplea el gen Bcr-Abl en la clonogénesis en la leucemia mieloide crónica. Como se ha visto las células provenientes de pacientes con leucemia mieloide crónica, en estadios tempranos de esta enfermedad, por sí sola la expresión del gen Bcr-Abl no impide la inducción de apoptosis por drogas, ni tampoco induce apoptosis por la retirada de las citosinas, acentuando el contexto celular y el estado de la enfermedad dentro de los efectos mediados por Bcr-Abl.

La resistencia de la apoptosis en células positivas Bcr-Abl se ha reportado que ocurre por la vía Bcl-2 dependiente y es independiente a otras vías. Así, es de interés la mayor expresión de Bcl-2 con la presencia de IL-3 que no reemplaza la actividad antiapoptótica inducida por Bcr-Abl. La expresión de Bcl-2 ha mostrado la función de impedir la actividad pro-apoptótica de Myc, por tanto, permite a las células proliferar en ausencia de apoptosis. Bcr-Abl conduce a elevar la expresión de otros genes antiapoptóticos, Bcl-xL, que parece ser un participante muy poderoso en la mediación de la resistencia apoptótica por Bcr-Abl. Esta molécula antiapoptótica es también regulada por IL-3 y su función parece depender de la vía de la Map cinasa. Niveles disminuidos de Bcl-xL preceden apoptosis inducida por la retirada de citosinas. La proteína cinasa C (PKC) también ha sido implicada como un marcador negativo de Bcr-Abl en la mediación de la supresión de apoptosis. La inhibición selectiva de Bcr-Abl y PKC ha demostrado la necesidad de mantener la activación de PKC al suprimir apoptosis en respuesta a los agentes quimioterápicos.

Se ha realizado estudios en relación a la expresión de Fas/CD95, en 1995 Hiroyuki Hata y colaboradores realizaron un estudio para determinar la expresión de Fas/Apo-1 (CD95) y apoptosis en células de pacientes con patologías de células plasmáticas, la apoptosis se confirmó con análisis morfológico solo ó en combinación con análisis de electroforesis de DNA, en sus resultados reportaron que las células plasmáticas de mieloma agresivo con expresión elevada de DHL expresan antígeno Fas, el entendimiento del mecanismo de apoptosis en células plasmáticas malignas contribuyen a la investigación de patofisiología y de tratamiento d de mieloma.

En 1997 Lijita y cols realizaron un estudio sobre la expresión funcional de Fas(CD95) en células de leucemia mieloide aguda (LAM) en el contexto de expresión de CD34 y CD38(pero no en relación a tratamiento) en 64 pacientes donde se concluyó que hay una expresión variable de Fas en células de LAM, y que la apoptosis mediada por Fas podría ser relevante clínicamente.

En 2007 se realizó estudio para valorar apoptosis por Imatinib en síndrome hipereosinófilico y se concluyó que apoptosis elevada significativamente después de 96 horas de la ingesta de MI puede ser predictivo de la respuesta a tratamiento en pacientes con la fusión FIP1L1-PDGFRΑ y sin gen de fusión detectable.

CITOMETRÍA DE FLUJO

El método que utilizamos en el presente estudio para determinar apoptosis es la citometría de flujo el cual analiza células en suspensión que interfieren de forma individual con una fuente de luz. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada, por su tamaño relativo, por sus granulaciones o bien por su reactividad con fluorocromos previa incubación con diversos anticuerpos monoclonales. Es un método de lectura rápido, que permite analizar un elevado número de células (de 10.000 a 50.000 para cada anticuerpo monoclonal) y proporciona un registro computarizado de los resultados.

La citometría de flujo permite la determinación de antígenos celulares de superficie, y por tanto, tiene utilidad en el inmunotipaje de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos. Así mismo, permite la cuantificación del ADN y la determinación de la actividad proliferativa de la población celular. La cuantificación de ARN celular se aplica al recuento de reticulocitos.

La citometría de flujo se ha beneficiado de los avances ocurridos en los últimos años en informática, electrónica, óptica y tecnología láser. Así mismo, la producción de nuevos anticuerpos monoclonales con diferentes fluorocromos y los nuevos procedimientos de tinción en citoquímica han permitido ampliar las áreas de estudio en diagnóstico clínico e investigación biomédica. Actualmente, esta tecnología ha pasado de ser una herramienta útil en investigación básica a ser empleada en la práctica habitual de muchos laboratorios de hematología y anatomía patológica.

Dentro de las aplicaciones de citometría de flujo se encuentra la *Identificación de antígenos* mediante anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos, que permiten la identificación y clasificación de diferentes células tanto normales como patológicas. El isotiocianato de fluoresceína, la ficoeritrina y el PerCP son los fluorocromos más empleados en el marcaje de anticuerpos monoclonales. Todos ellos se excitan a 488 nm (luz azul) y emiten en la zona del verde, naranja y rojo, respectivamente. El citómetro mediante una compensación electrónica permite su utilización simultánea. La posibilidad de realizar un triple marcaje con diferentes anticuerpos monoclonales en una misma muestra ha permitido profundizar en el conocimiento de las diferentes poblaciones celulares estudiadas. Así, se han logrado importantes avances en el diagnóstico clínico y clasificación de leucemias y linfomas. En otras áreas también se ha demostrado su utilidad como en la detección de auto anticuerpos e inmunocomplejos, en el diagnóstico de trombocitopatías adquiridas, y en la realización de la prueba cruzada linfocitaria. La monitorización de las subpoblaciones linfocitarias en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), fundamentalmente la cuantificación en sangre periférica de las células CD4+ y los linfocitos CD8+, aporta un valor diagnóstico y pronóstico en esta patología. En la actualidad representa una técnica de rutina en muchos laboratorios, ante la necesidad de establecer controles periódicos del número de células CD4+ en estos pacientes.

Para la identificación de la apoptosis celular y la diferenciación entre apoptosis y necrosis, la citometría de flujo ha evaluado los cambios en la morfología celular, la presencia de fosfatidil serina en la superficie celular, el hundimiento de la membrana mitocondrial, la fragmentación de ADN y la activación de caspasas. Detección de cambios en la morfología celular se conducen primeramente por la deshidratación que se evidencia por la reducción de la célula, la condensación de la cromatina y citoplasma, la fragmentación nuclear, todo esto mediado por la activación de caspasas. Por el contrario, la célula en necrosis está marcada inicialmente por la hinchazón de la célula seguida de la ruptura de su membrana y su posterior lisis. Todos estos cambios pueden ser detectados y medidos por una exploración citométrica. Así, es de enfatizar que la citometría de flujo es capaz de percibir los cambios de los diversos mecanismos que llevan a la célula a la apoptosis, siendo de mucha ayuda en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) debido a que en este tipo de leucemia el fenómeno de la apoptosis se halla bloqueado, por ello con la determinación de la señal apoptosis proporcionada por FAS/CD95 después del tratamiento quimioterápico hace posible evidenciar la efectividad del mismo. Se han realizado numerosos estudios de apoptosis en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) utilizando la citometría de flujo, uno de ellos es con el Arsénico, el cual induce apoptosis en este tipo de leucemias, así mismo, se ha estudiado el Interferón Alfa (INF-alfa), cuyo mecanismo de acción está dado por FAS – R, el cual hace posible la apoptosis en la Leucemia mieloides Crónica y también el estudio de fármacos utilizados en este tipo de leucemias, los cuales producen apoptosis y esta se evidencia por el análisis citométrico.

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células. Hay dos modos de uso:

- (1) unión covalente del fluorocromo a moléculas que se unen específicamente a componentes celulares.
- (2) fluorocromos que varían sus características en función del microambiente que les rodea.

Las propiedades ideales de un fluorocromo son:

- Alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz)
- Alto rendimiento cuántico (emisión de luz).
- Elevada fotoestabilidad.
- Corto estado de excitación.

Si el fluorocromo va a estar unido a algo, éste será insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente.

Fundamento del immunoprep tm

El sistema de reactivo del IMMUNOPREP cumple por lo general con el propósito del laboratorio al ser utilizado como reactivo, en la preparación de leucocitos provenientes de sangre entera que son medidos por inmunofluorescencia en citómetros de flujo ópticos.

El IMMUNOPREP es un sistema de reactivos rápido, ligero que no lava a los eritrocitos del sistema de lisado lo cual mantiene la morfología de los leucocitos y la integridad de la superficie celular. Así, la pérdida celular y morfológica debido al lavado y centrifugado es eliminada. Los tiempos de procesamiento están sustancialmente reducidos por la automatización que nos permite rápidas respuestas en situaciones clínicas urgentes.

El IMMUNOPREP es un conjunto de tres sistemas de reactivos específicos que consiste en:

- IMMUNOPREP A: agente de lisado para eritrocitos.
- IMMUNOPREP B: estabilizador de leucocitos.
- IMMUNOPREP C: un fijador de membrana celular.

JUSTIFICACION

Las fallas en la capacidad intrínseca de las células madre pluripotenciales de experimentar apoptosis puede provocar que las células sufran mutaciones, sobrevivan en forma inadecuada, o se tornen malignas. Este defecto puede ser responsable de la resistencia a la muerte celular observada en las células leucémicas luego del tratamiento quimioterápico. Cuando las células hematopoyéticas adquieren cambios genéticos que bloquean el envejecimiento, pueden ser incapaces de morir. Del mismo modo, las alteraciones a nivel del ciclo celular pueden contribuir a la transformación leucémica.

La apoptosis es un proceso de autodestrucción programada de las células que no induce respuesta inflamatoria. A nivel molecular, se produce por activación de las caspasas, proteasas intracelulares que se encuentran en estado latente y que se activan en respuesta a diversos estímulos. La regulación de la muerte celular en el cáncer es compleja, y las drogas quimioterápicas actúan en diferentes moléculas y procesos celulares.

En la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) la apoptosis se encuentra inhibida, promoviendo así, la proliferación de células neoplásicas.

La expresión de FAS/CD95, nos ayudará a la determinación de la respuesta apoptótica, misma que puede ser un factor predictivo en el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica ph (+)

La importancia de este trabajo, radica en conocer la respuesta apoptótica del paciente al tratamiento con mesilato de Imatinib mediante la expresión de FAS/CD95 que se corroboró con la expresión de anexina v.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la señal de expresión de Fas (Cd95) mediante Citometría de flujo en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica ph (+) tratados con Mesilato de Imatinib.

OBJETIVO ESPECIFICO

- Determinar la expresión de anexina V en pacientes con LMC tratados con mesilato de Imatinib
- Determinar la expresión de nucleosomas en pacientes con LMC tratados con mesilato de Imatinib
- Determinar la relación de Fas CD95 con expresión de anexina V y nucleosomas
- Determinar la relación de los marcadores de apoptosis con la obtención de respuesta hematológica

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA

- No existe la expresión de FAS/CD95 en pacientes con leucemia mieloide crónica Ph (+) tratados con Imatinib.

HIPÓTESIS ALTERNA

- Existe la expresión de FAS/CD95 en pacientes con leucemia mieloide crónica Ph (+) tratados con Imatinib.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico confirmado de Leucemia mieloide Crónica filadelfia positivo.
- Mayores de 18 años
- Pacientes sin tratamiento previo con Mesilato de Imatinib (Glivec).
- Pacientes sin ingesta de citoreductores (citarabina, hidroxiurea, busulfán e interferón) mínimo 48 horas antes del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes que no tengan diagnóstico confirmado de Leucemia Mieloide Crónica, filadelfia positivo.
- Pacientes menores de 18 años
- Pacientes con tratamiento previo con Mesilato de imatinib (Glivec).
- Pacientes que tomen medicamentos citoreductores (Citarabina, hidroxiurea, Busulfán e interferón) 48 horas antes del estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó estudio prospectivo experimental, donde se incluyeron a 10 pacientes pero solamente se estudiaron 7 pertenecientes al Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la ciudad de México durante el período de Agosto 2006 a Julio 2007, con diagnóstico reciente de LMC a los que se les inició tratamiento con IM a dosis de 400 mg vía oral por día

Para evaluar la expresión de los marcadores se solicitó consentimiento informado: Al paciente, se le solicitó una firma de aceptación para la toma de muestras de sangre en el presente estudio, la autorización fue redactada en un formato explicando el proyecto

Así mismo, se pidió autorización para poder revisar los expedientes del paciente, para el control la evolución de la enfermedad, por el tiempo que dure el estudio.

Las muestras recolectadas serán de pacientes pertenecientes al Instituto Nacional de Cancerología que comiencen un tratamiento con Mesilato de imatinib, dichas muestras fueron recolectadas por el personal autorizado del Instituto.

La toma de muestras se realizó mediante la utilización un catéter periférico corto, el cual se utilizó hasta la finalización de las tomas.

Se tomaron 7 muestras de sangre periférica una basal y posteriormente cada hora durante las 2 primeras tomas después de la ingesta de IM, y cada media hora hasta completar 4 horas.

Para determinar la expresión de Fas/CD95 se utilizó citometría de flujo (Citometro de flujo BECKMAN COULTER Epics XL) realizando previa incubación con anticuerpos monoclonales. Se determinaron los siguientes antígenos en leucocitos: CD10, CD13, CD33, CD34, y HLA. Se utilizaron los siguientes marcadores: CD95, Ioduro de propidio y anexina V

Se correlacionaron los resultados con esta última, marcador de apoptosis que se determino mediante citometría de flujo utilizando los mismo antígenos.

Al utilizar los fluorocromos para los diferentes marcadores y el ioduro de propidio IP como colorante supravital, ambos fueron negativos frente a las células vivas, mostrando así coloración cuando se presentó la respuesta apoptotica, esto se observó en los histogramas, que emitieron un porcentaje de células vivas y otro de células en apoptosis, así mismo en la prueba por Elisa se observó el cambio de coloración debido a la diferencia de concentración. El grupo control será medido mediante la utilización de un control, IMMUNO-TROL CELLS (ver anexo I), proporcionado por la compañía de reactivos.

Fundamento del immuno-trol cells. Es un ensayo, de control de calidad lisable de sangre entera para el análisis de inmunofenotipo usando reactivos de anticuerpos monoclonales y la citometria de flujo. Esto nos proporciona un control positivo celular que se procesa de la misma forma que una muestra de sangre entera. Esto nos permite

verificar el funcionamiento del reactivo y de los métodos usados para el marcaje de coloración de las células, lisado de eritrocitos y análisis de muestra por citometría de flujo. El IMMUNO-TROL CELLS es una preparación líquida de eritrocitos y leucocitos estabilizados humanos (linfocitos, monocitos y granulocitos), que contiene ligera dispersión, antígeno de expresión y anticuerpos de coloración representativos de aquellos encontrados en la sangre entera normal humana.

Este ensayo consiste de dos componentes mayores celulares: leucocitos y eritrocitos. Los leucocitos funcionan como un componente positivo del IMMUNO-TROL y tiene antígenos de superficie presentes sobre las células marcadas que se unen al componente del anticuerpo del reactivo del anticuerpo monoclonal. Los eritrocitos funcionan como un componente lisable del IMMUNO-TROL CELLS. Las muestras de IMMUNO-TROL están primeramente coloreadas con el reactivo del anticuerpo monoclonal y luego son lisadas para remover los eritrocitos. Las fluoroesferas están adicionadas para la determinación directa de las cuentas absolutas.

El análisis citométrico de las muestras coloreadas y lisadas del IMMUNO-TROL determina el porcentaje y la cuenta absoluta de las células marcadas. Los resultados esperados están determinados por la valoración y estandarización por citometría de flujo por COULTER EPICS XL™/XL-MCL™ utilizando el IMMUNOPREP™ con el TQ-PREP™, equipo con el que cuenta el área de Citometría de Flujo.

Control de calidad del citómetro de flujo

Para saber si el funcionamiento de nuestro equipo está correcto debemos conocer el estado de nuestro fotomultiplicador, que día a día son evaluados mediante un reactivo llamado FLOW CHECK, el cual contiene partículas de látex que tienen el mismo tamaño, se encuentran cubiertas con inmunoglobulinas marcadas con diferentes fluorocromos.

La utilización del Reactivo FLOW CHECK, nos comprueba que el fotomultiplicador esté funcionando correctamente, así en este control de calidad se evidencia una cuenta total de eventos (granulocitos, monocitos y linfocitos), delimitamos la población.

Fundamento de FAS/CD95: doble marcaje

FAS o CD95 es un receptor proapoptótico y cuando se une a la molécula ligando Fas o L Fas, se forma un receptor complejo que induce la incorporación de una nueva proteína FADD. La interacción entre Fas activado y FADD, permite que la procaspasa 8 se una al complejo fas-FADD. La procaspasa 8 se divide inmediatamente para formar caspasa 8, que a su vez activa la caspasa 3, que desencadena la apoptosis.

Este mecanismo de acción se aprecia en citometría de flujo utilizando fluorocromos de color verde y naranja, además del yoduro de propidio IP, para evidenciar la apoptosis.

Procedimiento

1. Se marcó un tubo que contuvo 10 microlitros de: CD4 (para población linfocitaria)
2. Se añadió a cada tubo 10 microlitos de CD 95 a cada tubo.
3. Posteriormente se adicionaron 100 microlitros de sangre periférica.
4. Se dejó de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, sin exponer a la luz.
5. Al cabo del tiempo, se procedió al lisado de los eritrocitos, a la estabilización de los leucocitos y a la fijación de la membrana celular de los leucocitos, este proceso se realiza de corrido en el equipo Beckman coulter TQ.
6. Finalmente, la muestra obtenida se llevó a la lectura al citómetro de flujo, el cual nos mostró las diferentes poblaciones celulares, acompañadas de la expresión de Fas, por el diferente color que tiene cada marcador.

Método para determinar el inicio de apoptosis por anexina v: doble marcaje

Fundamento teórico

La apoptosis es caracterizada por una variedad de características morfológicas, tales como la pérdida de la asimetría y unión de la membrana, la condensación del citoplasma y núcleo y por la división internucleosomal de ADN. Una de estas tempranas indicaciones de apoptosis es la translocación del fosfolípido fosfatidil serina (PS) de la membrana, que se traslada desde el interior al exterior de la hojilla de la membrana plasmática. Una vez expuesto al ambiente extracelular, el sitio de encadenamiento de PS esta viable para la Anexina V, de 35 – 36 kDa, calcio dependiente; es un fosfolípido que encadena proteína con una alta afinidad por la PS.

La translocación de PS precede a otro proceso apoptotico, como es la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina. Así, la anexina V puede ser conjugada con fluorocromos como FITC, PE, APC, Cy5 o Cy5.5, y ser utilizada fácilmente por citometría de flujo, identificando células en los primeros estadios de apoptosis.

Procedimiento

1. Se marcó un tubo que contuvo respectivamente 10 microlitros de: CD4 (población linfocitaria).
2. Se añadió a cada tubo 10 microlitos de Anexina V
3. Posteriormente se adicionaron 100 microlitros de sangre periférica.
4. Se dejó de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, sin exponer a la luz La fijación de la membrana celular de los leucocitos, este proceso se realizó de corrido en el equipo Beckman coulter TQ.

5. Finalmente, la muestra obtenida se llevó a la lectura al citómetro de flujo, el cual nos mostró las diferentes poblaciones celulares, acompañadas de la expresión de Fas, por el diferente color que tiene cada marcador.

RESULTADOS

Se realizó estudio prospectivo experimental donde se incluyeron a 10 pacientes con diagnóstico reciente de leucemia mieloide crónica que cumplieron con criterios de inclusión, 2 pacientes no aceptaron participar en el estudio, 1 paciente no acudió a sus citas para toma de muestras.

Se estudiaron a 7 pacientes, 3 de ellos hombres y 4 mujeres, con una media de edad de 41 años, 6 pacientes se encontraron en fase crónica al momento del diagnóstico, 1 paciente en fase acelerada, (**cuadro2**) firmaron consentimiento informado y se procedió a la toma de muestras sin complicaciones, se determinó la expresión de Fas/CD95 mediante los antígenos CD13, CD33, CD34, CD10 así como anexina V utilizando CD13, CD33, CD34 y CD10. Se obtuvieron los siguientes resultados (**gráfica 6 y 7**)

PACIENTE	SEXO	EDAD	FASE AL DIAGNÓSTICO
1	M	26	CRÓNICA
2	F	32	CRONICA
3	M	27	CRONICA
4	F	50	CRONICA
5	F	45	CRONICA
6	F	52	ACELERADA
7	F	57	CRONICA

Cuadro 2. Características de los pacientes

En el paciente 1 todos los marcadores se mantuvieron en porcentajes similares durante las 4 horas excepto el CD13 que aumentó de 60% en la toma basal a 80% a las 4 horas (**gráfica 8**), los resultados de anexina V se mantuvieron en 60% en relación a CD13 a las 0 y 4 horas. El resto de los porcentajes fue mayor comparado con el resultado de CD95

Se muestra el reporte gráfico de citometría de flujo (**figura 6**)

El paciente 2 no presentó un aumento significativo de porcentaje, en el reporte gráfico de citometría de flujo no se muestra apoptosis prácticamente. (**figura 7**)

En el paciente 3 el CD33 aumentó de 0.96% A 3.42% a las 4 horas, en el reporte gráfico tampoco se observó apoptosis

En paciente 4 el porcentaje de expresión de apoptosis fue nulo prácticamente (**figura 8**)

En paciente 5 el CD33 se mantuvo en el mismo porcentaje durante las 3.5 horas CD10 aumento de 61% basal a 74% a las 3.5 horas

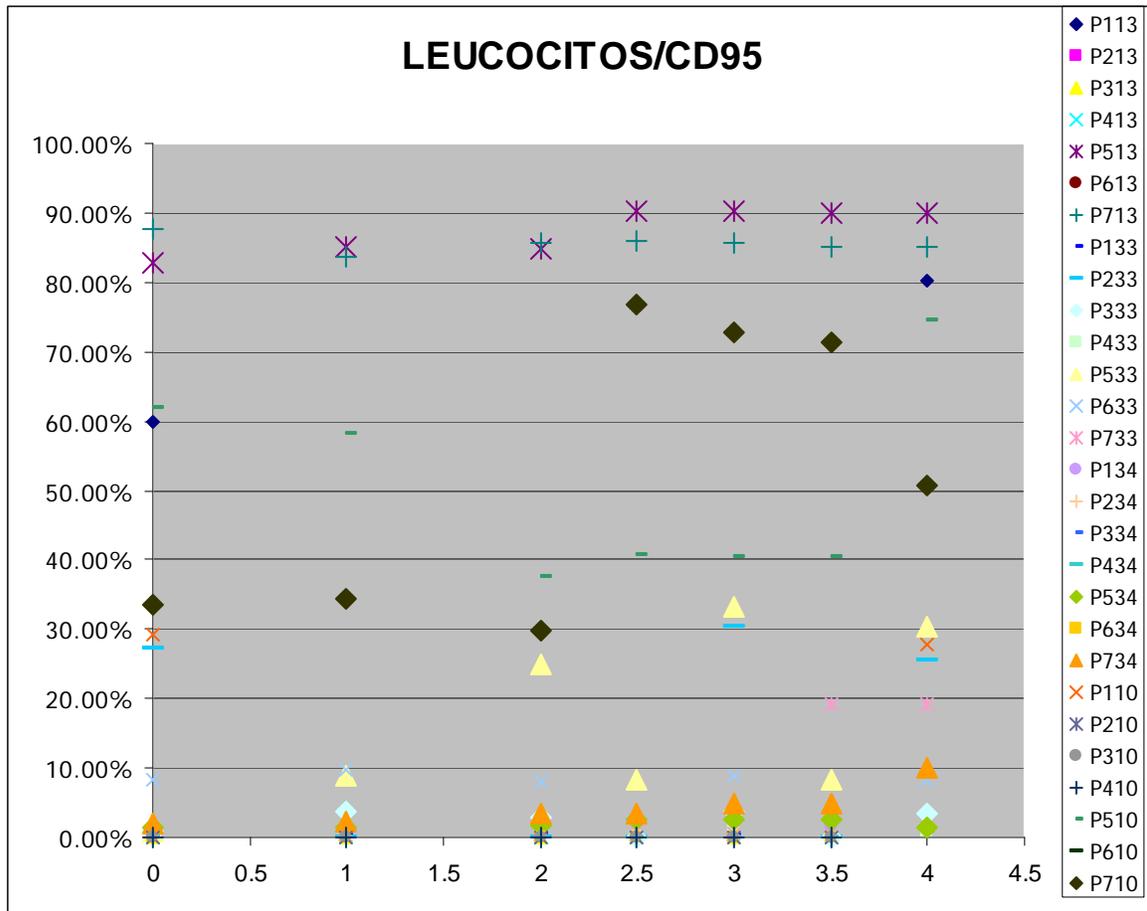
En paciente 6 el porcentaje de CD33 se elevó de 0.7% basal a 33% a las 4 horas aunque en el gráfico de citometría de flujo no se observa población en apoptosis

En paciente 7 el CD 33 de 0.1% basal aumentó a 19% a las 3.5 hr . CD34, CD10 comenzaron a elevarse a las 2 horas CD13 se mantuvo en 85-87% .En la medición con

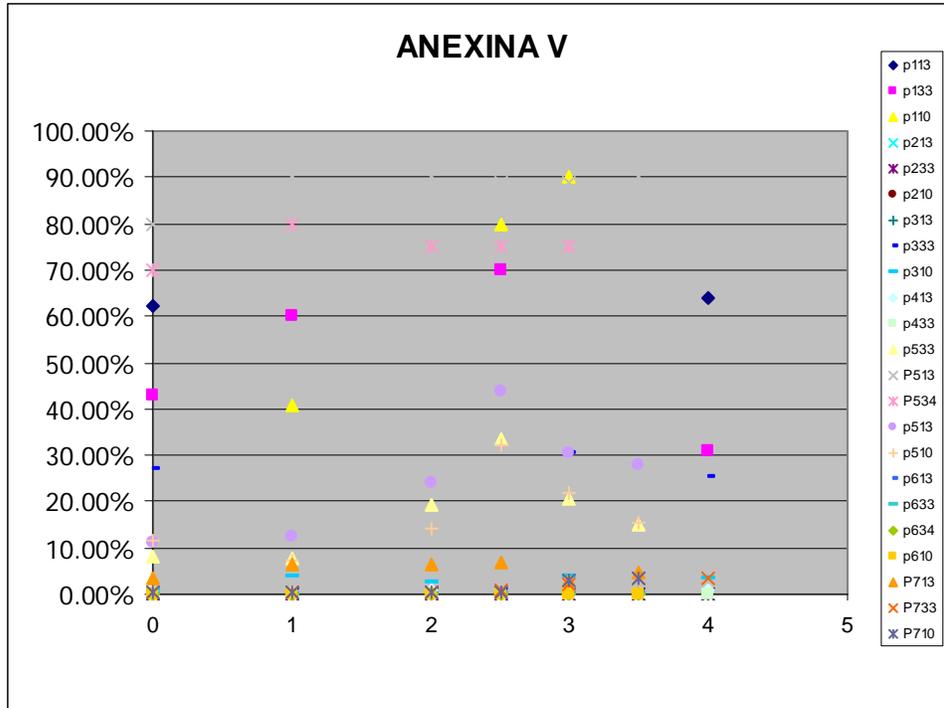
anexina el CD 20, CD 33 y CD 10 aumentaron a las 2.0 hr. CD 33 de 0.5 a 3.3% a las 3 horas. Por tanto se correlaciono el aumento de CD95 con el de anexina.

En CD33 y CD13 se obtuvieron los porcentajes más altos de expresión de Fas/CD95 (gráfica 9)

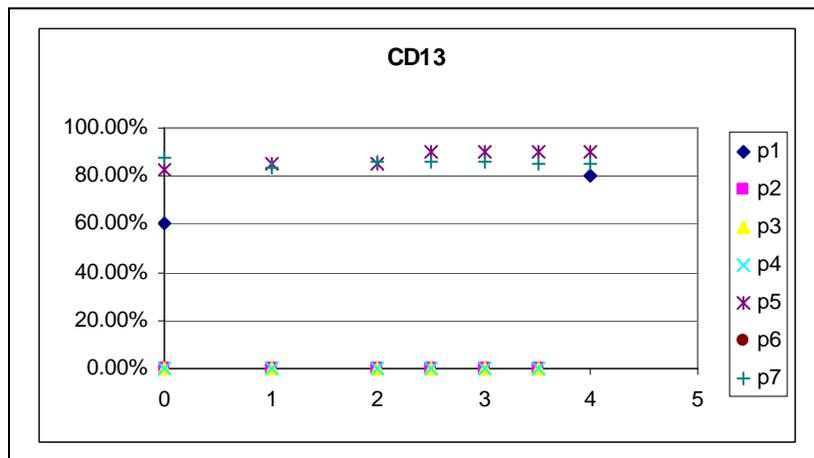
El mayor porcentaje de apoptosis se expresó a partir de las 2 horas a las 4 horas después de haber iniciado tratamiento con mesilato de Imatinib



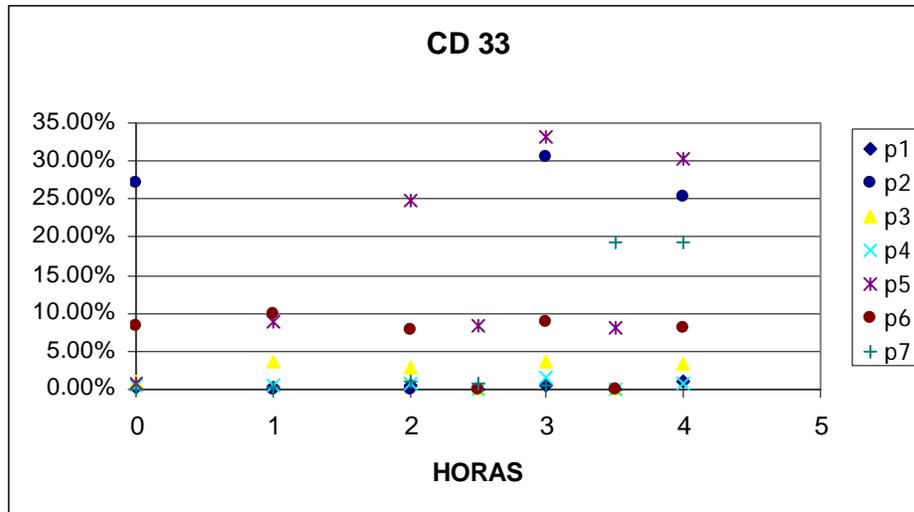
Gráfica 6.-Se muestra la expresión de Fas/CD95 en porcentaje a las 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 horas en correlación con CD 13, CD33, CD34 y CD10 en cada paciente. Se observa mayor porcentaje de expresión (>50%) en paciente 1, 5 y 7 en relación a CD13,el resto se encuentra por debajo del 50% de expresión.



Gráfica 7 Se muestra el porcentaje de expresión de Anexina V a las 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 horas con CD13, CD33, CD34 Y CD10, se observa mayor porcentaje de expresión (>50%) en el paciente 1, 5 y 7 es decir si se correlaciona con la expresión de CD95.

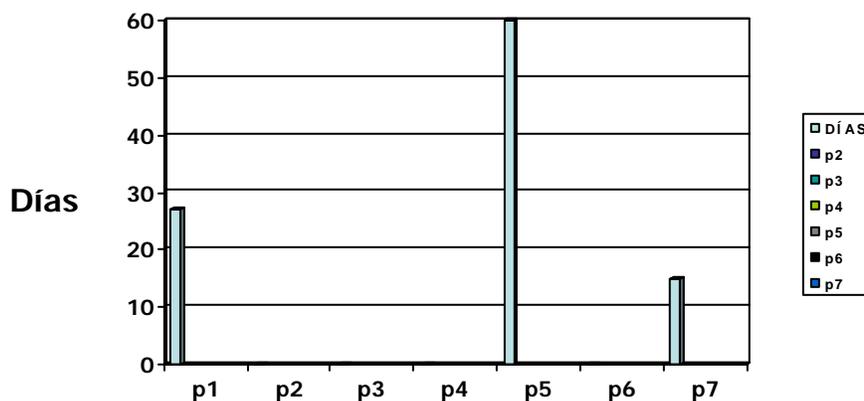


Gráfica 8. Se muestra los resultados de expresión de Fas/CD95 en CD13 en el cual se obtuvo el mayor porcentaje de apoptosis en 3 de los pacientes (p1,p5,p7) que obtuvieron respuesta hematológica.



Gráfica 9. Se muestra el porcentaje de expresión de FAS/CD95 en CD33 el cual fue mayor a 25% en p2, p5 y p7

La respuesta hematológica (RH) se definió como cuenta de plaquetas $<450 \times 10^9$ leucocitos $<10 \times 10^9$, diferencial sin granulocitos inmaduros, basófilos $<5\%$, en médula ósea $<5\%$ blastos, y ausencia de esplenomegalia, se alcanzó en el paciente 1 a los 27 días de haber comenzado tratamiento con Imatinib, el paciente 2 continúa con leucocitosis y trombocitosis a 1 mes de seguimiento al igual que el paciente 3 a 1 mes de seguimiento, el paciente 4 continúa con leucocitosis y esplenomegalia, el paciente 5 alcanzó la RH a los 60 días, el paciente 6 continúa con leucocitosis y esplenomegalia a los 2.5 meses de seguimiento y por último el paciente 7 alcanzó RH a los 15 días. (Gráfica 3)



Gráfica 3. Las columnas muestran los días en los que se alcanzó respuesta hematológica presentándose solamente en 3 pacientes (p1, p5 y p7)

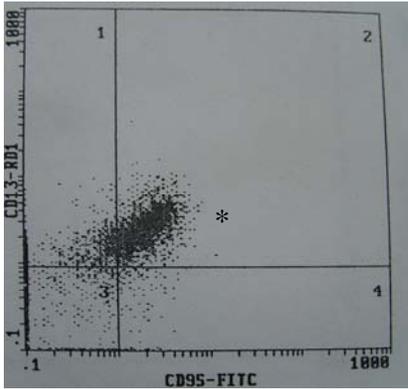


Figura 6 Se muestran los resultados de expresión de Fas/ CD95 en CD13 en paciente 1, donde se reporta mayor expresión de apoptosis (columna no.2 *)

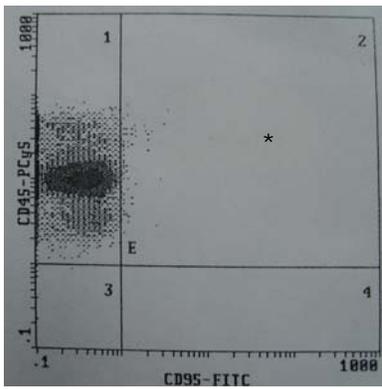


Figura 7 Muestra los resultados de expresión de Fas/CD95 en CD13 en paciente 2 ,donde no hay apoptosis Columna2

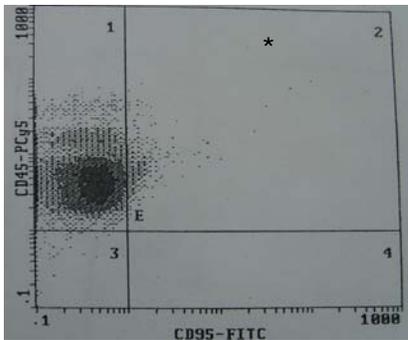


Figura 8 Se muestran los resultados de Fas/CD95 en CD13 en paciente 4 que no mostró expresión

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.000	1	.008		
Continuity Correction	3.512	1	.061		
Likelihood Ratio	9.561	1	.002		
Fisher's Exact Test				.029	.029
Linear-by-Linear Association	6.000	1	.014		
N of Valid Cases	7				

Tabla 2 Se muestra resultados significativos estadísticamente en el test de Pearson Chi Square .008, test exacto de Fisher de .029

a 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.29.

Se han realizado estudios previos para determinar la expresión de Fas/CD95 en pacientes con mieloma en donde se encontró mayor porcentaje de apoptosis en pacientes con mieloma agresivo que cursaron con DHL elevada, así también en pacientes con leucemia mieloide aguda en correlación con CD34 y CD38 donde se presentó la expresión en mayor porcentaje en LAM M2, M4, y se mencionó una probable relación con la respuesta clínica y a tratamiento, en síndrome hipereosinofílico relacionado a la ingesta de imatinib donde se observó el mayor porcentaje de apoptosis a las 96 horas, siendo factor predictivo para respuesta a tratamiento.

En pacientes con leucemia mieloide crónica no existen estudios previos para dicha determinación por lo que surgió la idea de realizarlo. Los resultados en la pequeña muestra de pacientes expresan una relación con el porcentaje de apoptosis y la respuesta hematológica, lo cual podrá corroborarse en estudios con mayor número de pacientes.

Comparando el porcentaje de apoptosis de CD13, CD33, CD34 y CD10 se obtuvieron los mayores porcentajes en los 2 primeros es decir en los marcadores mieloides. El hecho de utilizar la determinación de anexina V nos permite obtener resultados más fidedignos, se demostró que sí hay correlación entre estos marcadores.

Con los resultados anteriores podemos concluir que la mayor expresión de CD95 y anexina V ocurren a las 2 a 4 horas por tanto sí hay relación.

En los pacientes estudiados también hubo relación entre el porcentaje de apoptosis y la respuesta hematológica ya que los 3 pacientes que la alcanzaron tuvieron los más altos porcentajes de expresión en CD13 y CD33, aunque por la pequeña muestra de pacientes será necesario continuar la presente investigación para corroborar los datos mencionados así como dar seguimiento a largo plazo a los pacientes y sería interesante valorar la respuesta citogenética y molecular.

En la **tabla 2** se muestra resultados significativos estadísticamente en el test de Pearson Chi Square .008, test exacto de Fisher de .029. pero se hace énfasis en que se tendrá que continuar mediante estudio de un mayor número de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Carlos G. Ferreira,¹ Mirjam Epping, Frank A. E. Kruyt, and Giuseppe Giaccone² Apoptosis: Target of Cancer Therapy 2024 Vol. 8, 2024–2034, July 2002
- 2) Ernesto Alfaro Moreno,* Claudia García Cuéllar,* Alfonso Dueñas González*, Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones Vol. 46, N.º 4 Octubre-Diciembre 2000 pp 275-280
- 3) Carmen Martha Elinos-Báez,* Vilma Maldonado,** Jorge Meléndez-Zajgla** Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis MG Gac Méd Méx Vol. 139 No. 5, 2003
- 4) G Klein* Cancer, apoptosis, and nonimmune surveillance ,Cell Death and Differentiation (2004) 11, 13–17
- 5) Avi Ashkenazi and Vishva M. Dixit Death Receptors: Signaling and Modulation Science Vol 281 28 August 1998
- 6) Ting-Jun FAN*, Li-Hui HAN, Ri-Shan CONG, and Jin LIANG Caspase Family Proteases and Apoptosis Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2005, 37(11): 719–727
- 7) Brady HJ Apoptosis and Leukaemia British Journal of Haematology 123:577-585, 2003
- 8) Michor¹, Timothy P. Hughes², Yoh Iwasa³, Susan Branford², Neil P. Shah⁴, Charles L. Sawyers⁴, & Martin A. Nowak¹ Dynamics of chronic myeloid leukaemia NATURE Vol 435 :30 June 2005
- 9) Vincenzo Pitini, Carmela Arrigo, Giuseppe Altavilla, Claudia Naro Imatinib-induced apoptosis in the eosinophils of patients with a hypereosinophilic syndrome: A surrogate marker of response? Leukemia Research 31 (2007) 719–726
- 10) Gerald M. COHEN Caspases: the executioners of apoptosis Biochem. J. (1997) 326, 1–16 (Printed in Great Britain)
- 11) Nagafuji K, Shibuya T, Harada M, Mizuno S, Takenaka K, T, Okumura T, Gondo H, Niho Y Functional expression Apo-1 (CD95) and apoptosis in tumor cells from patients with plasma cell disorders. Blood 86:1939, 1995
- 12) Debatin KM, Goldman CK, Waldmann TA, Krammer PH: APO-1-induced apoptosis of leukemia cells from patients with adult T-cell leukemia Blood 81:2972, 1993

- 13) Friessen C, Herr I, Krammer P, Debatin K-M: Involvement of the CD95(APO1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med* 2:574, 1996
- 14) Sanchez Torres Luvia Enid, Diosdado Vargas Fernando. Apoptosis y su determinación. *Tc Pecu Mex.* 2003;41 (1):49-62.
- 15) Jimenez Maria, R. William, G Watson, Jean Parodo, David Evans, Debra Foster, Marilyn Steinberg, Ori D. Rotstein, John Marshall.: Dysregulated Expression of Neutrophil Apoptosis in the Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Arch Surg* 1997; 132: 1263-70.
- 16) Egon R. Casanova. Apoptosis. *Cl. Mayo* 2003. 2191-2194.
- 17) Camarillo Ortega Clara, Diaz flores Margarita, Avalos Rodríguez Alejandro. Apoptosis y su importancia biomédica. *Gac. Med. Mex.* 2001; V 137 (6) México DF.
- 18) Porfirio Hernández. Nueva opción terapéutica en la Leucemia mieloide Crónica. *REv. Cubana Hematol Hemoter.* 2001; 17(3): 205-210.
- 19) Brandan Nora, Juaristi Julián, Aguirre Victoria, Romero B. Margarita. Oncogenes y genes supresores de tumores. *Journal of Biochemistry.* 2001; Vol. 130. 1-18.
- 20) Carlos Miret Mas. Alteraciones de la apoptosis como mecanismo patógeno en el lupus eritematoso sistémico. Trabajo de tesis. Barcelona, España. 2003. 7-25.
- 21) Valerie Fadok. Apoptosis. *Nature Insight.* 2000; Vol.407 (6805).
- 22) 17. Rizzo Maria Teresa, Regazzi Ester, Graun Daniela, etal. Inducción of apoptosis by arachidonic acid in chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Research.* 1999; 59: 5047-5053.
- 23) 18. Perkins Charles, Kim Caryn, Guofu Fang, and Kapil N. Bhalla. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x_L. *Blood.* 2000; Vol. 95 (3): 1014-1022.
- 24) 19. Sellerj Carmine, Sato Todatsugu, etal. Involvement of Fas-Mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferón-gamma in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1997;Vol 89 (3): 957-964.
- 25) 20. Antonio Gascon Mariño. Citometria de flujo. *Boletín Oncologico.* 1998. No 8.
- 26) 21. Inmunofenotipo:Generalidades. *Cytometry.* 1998; 34:39-42.

- 27) 22. Prieto Alfredo, Diaz David, Barcenilla Hugo, et al. Apoptotic Rate: A New Indicator for the Quantification of the Incidence of Apoptosis in Cell Cultures. *Cytometry*. 2000; 48: 185-193.
- 28) 23. Darzynkiewicz Zbigniew, Bednerand Elzbida, Smoleski Piotr. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*. 2001; Vol 38(2): 179-193.
- 29) Carlo B Gambacorti-Passerini, Rosalind H Gunby, Rocco Piazza. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias *Lancet Oncol* 2003;4:75-85