



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA**

**“Expresión de Granzima B en Linfocitos CD8+
periféricos y de Médula Ósea, en diferentes etapas de
la Leucemia Linfoblástica Aguda en población
pediátrica”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

Santiago Cristóbal Sigrist Flores

DIRECTOR DE TESIS: DR EN C. RAFAEL JIMÉNEZ FLORES



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MÉXICO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

Esta tesis la dedico a toda mi familia.

Para mis padres Juliana y Arturo, por su comprensión y ayuda en momentos malos y menos malos. Me han enseñado a encarar las adversidades sin desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

A mi hermana Diana, que con su amor me ha enseñado a salir adelante. Gracias por tu paciencia, cariño y tolerancia, gracias por preocuparte por tu hermano menor, gracias por compartir tu vida y en especial por compartir a Camila y Valentina mis queridas sobrinas, que has permitido que sean una gran alegría en mi vida.

También dedico y agradezco el apoyo y consejos recibidos a lo largo de los últimos años de mis tíos Francisco, Leo, Oco, Toña, primos y a mis abuelitas Tere y Viviana, aunque ya no está con nosotros.

Agradecimientos

Agradezco de manera especial al Dr. Rafael Jiménez, mi director de tesis, porque acrecentó el gusto y la pasión por la investigación, la búsqueda de las respuestas que requieren de empeño y dedicación, y en especial a su ayuda y consejos que en los momentos difíciles estuvo ahí para ayudarme.

A todos los integrantes del laboratorio de inmunología maestros y alumnos, por su apoyo y enseñanzas que ayudaron en mi formación.

Agradezco la colaboración de la Dra. Tera Dueñas, Dra. Elva Jiménez y la Dra. Berges, así como a la química Wendy y en especial a los niños del servicio de hemato-pediatría de la raza, que sin saberlo fueron los integrantes indispensables de este trabajo de tesis.

Fuera de la FES-Iztacala quiero dar las gracias al Dr. Leopoldo Flores Romo así como a los integrantes de su laboratorio por el apoyo brindado, al M. en C. Víctor Rosales del CINVESTAV y al Dr. Arturo Cerbulo del INPer, por su ayuda y guía en el análisis de las citometrias.

A mis sinodales, gracias por la oportunidad y por el tiempo que me han dedicado para leer este trabajo.

Gracias a todos aquellos que no están aquí, pero que me ayudaron a que este gran esfuerzo se volviera realidad.

A mis amigos, que no son muchos, pero si los mejores, Myriam, Alberto, André, Vanessa, por pasar a mi lado los momentos de mi vida universitaria y estar siempre en las buenas y en las malas, ¡ jamás lo olvidare !

INDICE

Dedicatorias	2
Agradecimientos	3
Resumen	5
Introducción.....	7
Leucemia Linfoblástica Aguda.....	13
Clasificación de LLA.....	14
Morfológica.....	14
Inmunobiología	16
<i>Marcadores de células B</i>	18
<i>Marcadores de células T</i>	19
<i>Marcadores Citogenéticos</i>	21
Diagnóstico.....	23
Características clínicas	23
Tratamiento	24
<i>Inducción</i>	24
<i>Intensificación (consolidación)</i>	24
<i>Mantenimiento</i>	25
<i>Tratamiento del SNC</i>	25
<i>Recaída</i>	25
<i>Trasplante hematopoyético</i>	25
Patogénesis.....	26
Proteínas que regulan el ciclo celular.....	28
Alteraciones en el ciclo celular.....	30
Apoptosis.....	37
Apoptosis mediada por una cascada proteolítica intracelular.....	37
Vía receptor de la muerte y granzima	38
Cáncer y la respuesta inmune.....	39
Vigilancia Inmunológica	41
Células citotóxicas.....	43
Gránulo-excitosis.....	44
Mecanismos de escape tumoral a la respuesta inmune.....	49

Justificación.....	51
Objetivos.....	52
Objetivo general.....	52
Objetivo particular.....	52
Hipótesis.....	52
Material y Método.....	53
Resultados.....	58
Discusión.....	68
Conclusiones.....	72
Perspectivas.....	73
Referencias.....	74

Introducción

En México el Instituto Nacional de Cancerología establece que las neoplasias hematológicas engloba a una familia compleja de enfermedades cuya característica principal es la pérdida del control de la proliferación celular. Las células malignas experimentan cambios en su estructura y funciones, al multiplicarse dan origen a una colonia de células diferentes que se reproducen rápidamente, invaden y destruyen los tejidos normales (1). Estas enfermedades son ya una de las principales causas de muerte en nuestro país y a nivel mundial.

De acuerdo con las estadísticas oficiales, la leucemia aguda es el padecimiento hemato-oncológico más frecuente a nivel mundial; representan aproximadamente el 30% de todas las malignidades diagnosticadas en menores de 15 años (2) y el 25% de neoplasias en individuos de 15-20 años. En los Estados Unidos se diagnostican 3250 nuevos casos de leucemia cada año y la incidencia anual de leucemias agudas ajustada en todas las edades, es de 10 a 11 por 100.000/ habitantes. La Leucemia Linfoblástica Aguda es la malignidad más frecuente de la niñez, pero puede ocurrir en cualquier edad. En los Estados Unidos es más común entre la población Latina (1.5 a 2.5 por 100.000/habitantes); una frecuencia intermedia en los blancos (1 a 2 por 100.000/habitantes); y es más baja en negros (0.5 a 1 por 100.000/habitantes). Los hombres exceden en número a mujeres en todos los grupos raciales (3). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) representa aproximadamente el 80% de los casos (2500 casos por año). Cerca del 20% de los casos (800-900 casos por año) corresponden a leucemia mieloide aguda (LMA) y una pequeña fracción (el 1%) a leucemia mieloide crónica (LMC) (4). En México durante 2005 estas neoplasias fueron la segunda causa de muerte en niños de 5 a 14 años de edad, con una tasa de 2.7 por 100,000 habitantes (1, 5).

Las leucemias agudas son desordenes malignos de los precursores hematopoyéticos de la médula (3), donde estas células adquieren alteraciones genéticas que las lleva a una proliferación descontrolada (4), que interfieren con elementos normales de la medula ósea necesario para la supervivencia (3). Durante los últimos años, nuestra comprensión de la patogénesis molecular de las leucemias ha aumentado considerablemente (6-10).

La transformación maligna de las células es el resultado de un proceso muy complejo, que ocurre en varias etapas, y en el que intervienen factores múltiples en su origen y mecanismo, esto se ve reflejado en la complejidad de su tratamiento y diversidad el mismo, en el cual los resultados son variables, de allí que la investigación que se desarrolla en relación al cáncer involucre aspectos científicos básicos y clínicos (11,12).

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que comienza en la medula ósea y se distingue por la infiltración de estas células neoplásicas en sangre periférica, ganglios linfáticos, bazo, hígado, sistema nervioso central (cerebro y medula espinal), testículos y otros órganos (2, 3,11).

La leucemia fue descubierta hace casi 200 años, por lo que puede considerarse aparentemente como un problema reciente. Desde su descripción inicial, las leucemias han sido motivo de una vasta investigación médica, debido a varias razones: sus dramáticas manifestaciones clínicas, su frecuencia e impacto en la niñez, su hallazgo en animales, la sencillez de los análisis en la sangre periférica y de la médula ósea que permitieron comprender mejor la hematopoyesis, y su forma de tratamiento, adaptada posteriormente a otros tipos de neoplasias en el ser humano.

Virchow, fue uno de los pioneros en el estudio de la leucemia, la definió a mediados del siglo XIX como "un proceso *sui generis* debido a una alteración en la diferenciación normal de las células productoras de sangre. Conocemos las secuelas de la enfermedad pero no su causa". En 1845 Virchow describió un

paciente que presentaba un material blanquecino en los vasos sanguíneos, Virchow no estaba seguro de la causa que producía el exceso de glóbulos blancos, por lo cual decidió utilizar el término puramente descriptivo de leucemia (del griego, leukós blanco y haima sangre; “sangre blanca”) (13). Sin embargo, no había sido este el primer caso publicado: en 1827 Velpeau, observó un paciente de 63 años con fiebre, debilidad y crecimiento descomunal del abdomen. Él encontró en la autopsia un hígado y un bazo enormes (con peso de 18 veces mayor al habitual), y la “sangre era como una papilla de avena que recordaba la consistencia y el color de las levaduras del vino tinto” (Velpeau 1827). Otros casos similares fueron publicados por Barth en 1839 y Bennett en 1845. Estos autores los consideraron como procesos infecciosos, en Virchow recae el mérito al proponer que el problema no era infeccioso sino una patología diferente que afectaba a ciertos órganos (3).

En 1847 Virchow acuñó el término de leucemia y en 1856 publicó un trabajo en el que se describieron las características patológicas de esta entidad, refiriendo que se trataba de una proliferación de los corpúsculos descoloridos. Al mismo tiempo describió dos tipos de leucemia: la esplénica, asociada con esplenomegalia, y la linfática, donde se presentaba aumento de tamaño de los ganglios linfáticos.

En 1877, el bacteriólogo alemán Paul Ehrlich aplicó sus técnicas, en la hematología e hizo preparaciones secas de sangre y las tiñó con diferentes colorantes, comprobó que unas células tenían afinidad por los básicos, mientras otras lo hacían por los ácidos inclusive otras células mostraban afinidad a colorantes neutros. Este hecho fue de gran utilidad en el diagnóstico de la leucemia, ya que permitió describir con detalle y diferenciar los glóbulos blancos normales y anormales (2). Mosler en 1879, describió por primera vez una técnica para examinar la médula ósea y diagnosticar la leucemia. Sin embargo, no fue sino hasta 1930, que en Europa comenzaron a realizarse los aspirados de médula ósea, que permitió comprender mejor las alteraciones morfológicas de las células que producen esta enfermedad (7, 14).

Durante los últimos 20 años, el diagnóstico de las leucemias agudas resultaban de los hallazgos morfológicos encontrados en las células de médula ósea y sangre periférica, apoyados en las coloraciones citoquímicas y de diversos métodos, necesarios no sólo para el diagnóstico y la toma de decisiones individuales del tratamiento (8), también para la clasificación y categorización de las leucemia en: Leucemia Linfoide aguda (LLA) y Leucemia Mieloide Aguda (LMA); (Tabla 1) (12, 15,16).

	LMA	LLA
Tamaño de los blastos	Largos y uniformes	Pequeños a medianos
Cromatina	Dispersa	Abundante
Núcleo	1 a 4, a menudo prominentes	Ausentes o de 1 a 2; indistinto
Citoplasma	Moderadamente abundante, gránulos a menudo presentes	Escaso a moderado, gránulos escasos en casi todos los casos
Bastones de Auer	60-70 % de los casos	Ausente
Mielodisplasia	A menudo presente	Ausente

Tabla 1.- Citología usual de LMA y LLA

El diagnóstico de los diversos subtipos LMA y de LLA, constituyen un desafío importante. El diagnóstico correcto no es solamente esencial para la clasificación de este heterogéneo y complejo grupo de desordenes, además, desempeña un papel fundamental para la estratificación en el grupo de riesgo individual y para las decisiones terapéuticas. Los diagnósticos de leucemias agudas experimentaron un completo cambio desde los años 70's cuando la citomorfología y la citoquímica representaba la única herramienta disponible para el diagnóstico. Desde entonces se incorpora, la citogenética clásica al diagnóstico rutinario, la citogenética molecular (que comprende técnicas de hibridación in-situ (FISH), hibridación comparativa genómica (CGH), genética molecular (fundamentalmente con PCR) e inmunofenotipo por citometría de flujo (MFC) (15),

han permitido avances muy significativos para el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades. Las neoplasias hematológicas requieren de una comunicación y cooperación entre médicos oncólogos, hematólogos, cirujanos y patólogos, así como de profesionistas dedicados a la investigación, químicos en conjunto y con el apoyo de las diferentes técnicas de biología molecular, logren una clasificación ideal, científicamente precisa, reproducible, y que pueda predecir el comportamiento clínico en la mayoría de los casos (16,17).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las neoplasias hematopoyéticas incorporando e interrelacionando la morfología, citogenética, genética molecular y marcadores inmunológicos en un intento por construir una clasificación aplicable universalmente y válida para el pronóstico (16).

Clasificación de las leucemias propuestas por la OMS (16,12):

Leucemias agudas mieloides con alteraciones citogenéticas características.

LMA con t(8;21) (q22;q24).

LMA promielocítica t(15;17) (q22-q11-12) y variantes.

LMA con eosinófilos anormales en medula ósea, inv (16) (p13q22) o t(6;16) (p13;q11).

LMA con anormalidades en 11q23.

Leucemias agudas mieloides con displasia multilineal.

Con síndrome mielodisplásico previo.

Sin síndrome mielodisplásico previo.

Leucemias agudas mieloides y síndromes mielodisplásicos relacionados con tratamiento.

Relacionados con agentes alquilantes.

Relacionados con epipodofilotóxicas.

Otros tipos.

Leucemias agudas mieloides no incluidas en otra categoría

LAM mínimamente diferenciada.

LAM sin maduración.

LAM con maduración.

LAM mielomonocítica.

LAM Monocítica.

LAM eritroide.

LAM megacariocítica.

LAM de basófilos.

Panmielosis aguda con mielofibrosis

Leucemias agudas linfoblásticas de precursores B.

LAL-B con t(9;22) (q34;q11).
LAL-B con alteraciones de 11q23.
LAL-B con t(1;19) (q23;p13).
LAL-B con t(12;21) (p12;q22).
Otras LAL-B.

Leucemias agudas linfoblásticas de precursores T
Leucemia células de Burkitt

Enfermedades mieloproliferativas crónicas

Leucemia mielógena crónica
Leucemia neutrofílica crónica
Leucemia eosinofílica crónica/ síndrome hipereosinofílico
Policitemia vera
Mielofibrosis idiopática crónica
Trombocitopenia esencial

Enfermedades mieloproliferativas/ mielodisplásicas

Leucemia mielomonocítica crónica
Leucemia mielomonocítica juvenil
Leucemia mielógena crónica atípica

Los términos linfocítica (o Linfoblástica) y mieloide (o mielógena) se refieren a dos tipos de células diferentes, a partir de las cuales se originan las leucemias. Las leucemias linfocítica se desarrollan a partir de los linfocitos de la médula ósea. La leucemia mielógena (a veces llamada mielocítica) se desarrolla a partir de uno de los dos tipos de glóbulos blancos: los granulocitos o los monocitos.

El término *aguda* significa "de rápido desarrollo", aunque las células crecen rápidamente, no pueden madurar de forma adecuada; El término *crónica* se refiere a una condición en la que las células parecen ser maduras, pero no son completamente normales. Éstas viven demasiado tiempo y causan una acumulación de ciertos tipos de glóbulos blancos.

Leucemia Linfoblástica Aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) puede desarrollarse de cualquier célula linfoide bloqueada en una etapa particular de su desarrollo, incluyendo las células primitivas con potencial del multilinaje y son clasificadas como LLA entre linaje B y T. Las células se pueden subclasificar más a fondo según los estadios reconocidos de la maduración normal de las células T y B (7,16,39). Aproximadamente del 15 al 20 % de los nuevos diagnósticos de LLA en niños y adultos, las LLA de linaje T, se relacionan históricamente a un mal pronóstico. Comparada con la LLA de linaje B que es la más común. La LLA-T es definida por características clínicas y biológicas distintas y asociadas generalmente a características clínicas más desfavorables, tales como una elevada cuenta de células blancas, adenopatías y afectación del sistema nervioso central (6,18).

Clasificación de LLA

Existen distintas formas para clasificar las LLA. La más utilizada en la actualidad, distingue a las LLA según el estadio madurativo de sus blastos y tiene implicaciones pronosticas.

Morfológica

Aproximadamente del 80% al 85% de los casos de niños con LLA presentan la médula ósea totalmente sustituida por linfoblastos, las leucemias linfoblásticas agudas han sido clasificados de acuerdo al criterio Franco-británico-estadounidense (FAB, por sus siglas en inglés), que las divide en tres grupos (3, 17,19) (Tabla2).

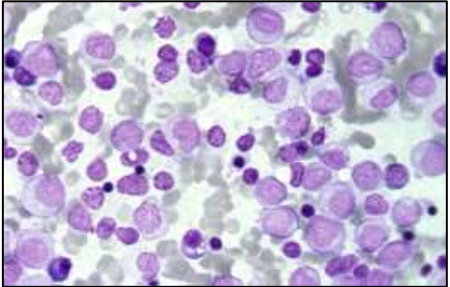
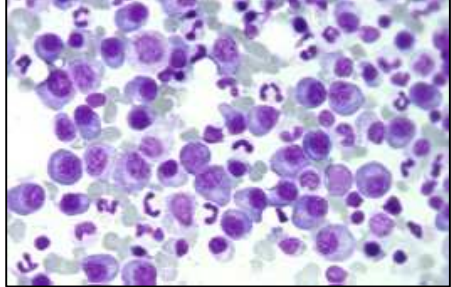
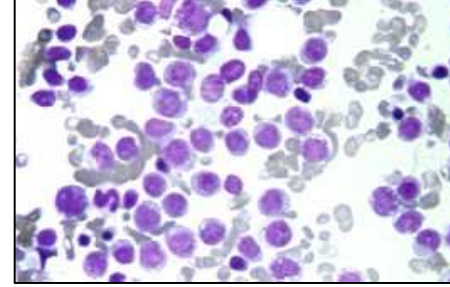
Morfología	L1	L2	L3
Tamaño de la célula	Predominante pequeño	Grande, Heterogéneo	Grande, uniforme
Características del núcleo	Contorno liso; en ocasiones hendiduras o pliegues	Irregular o con hendiduras	Contorno liso, oval o redondo
Cromatina	Homogénea, condensada	Variable; heterogénea dispersa	Homogénea y punteada
Nucléolo	Pequeño y discreto o no visible	Presentan uno o dos; a menudo grande	Prominente; uno o mas
Citoplasma	Escaso	Abundante a moderado	Moderadamente abundante
Vacuolas citoplasmáticas	Variable	Variable	A menudo prominentes
Porcentaje de incidencia	80	18	-
Imagen			

Tabla 2. Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda, según la FAB

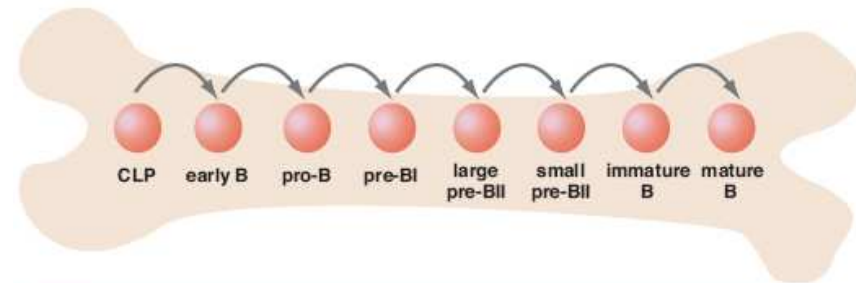
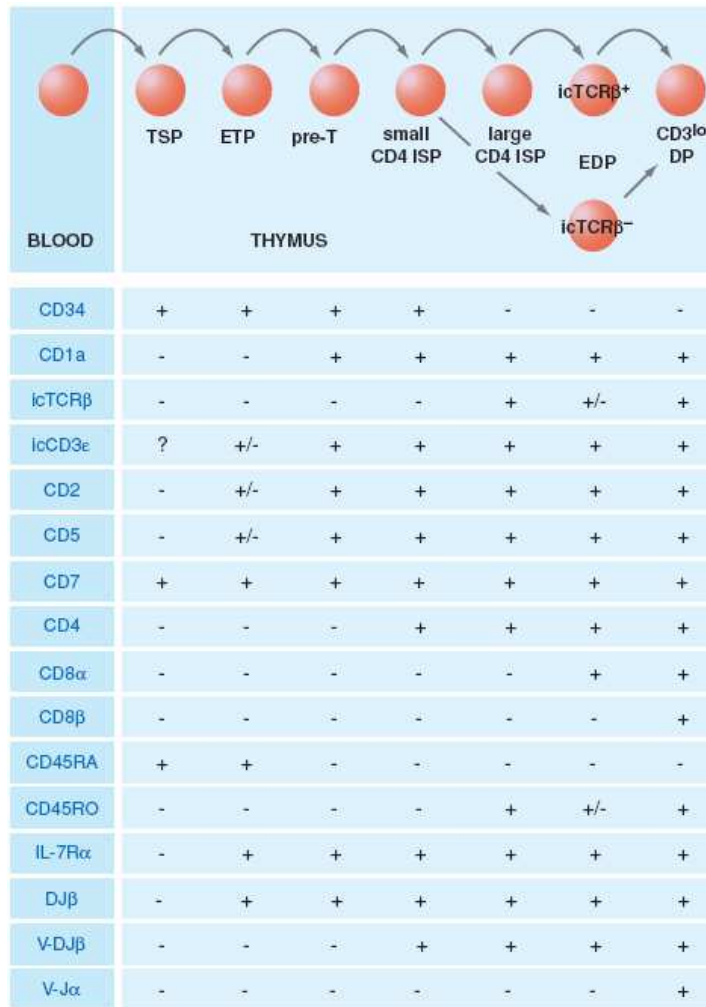
Inmunobiología

El inmunofenotipo por citometría de flujo evalúa las células individuales en suspensión para la presencia y la ausencia de antígenos específicos (fenotipo). En los últimos 10 años, se ha privilegiado para hacer diagnóstico el empleo de la citometría de flujo para el conocimiento del inmunofenotipo de la neoplasia, la creciente disponibilidad de una amplia gama de anticuerpos y fluorocromos han permitido obtener fenotipos más exacto de células (Figura 1) (20), resaltando la identificación de poblaciones anormales (Tabla 4) (21-23). Además, la citometría de flujo es considerada hoy una herramienta indispensable para hacer el diagnóstico de una neoplasia hematolinfóide y permite monitorear la respuesta al tratamiento, incluyendo la detección de la enfermedad mínima residual (21).

Linaje	Antígeno
Célula pre-B	CD10, CD19, CD20, TdT,
Célula B	CD19, CD20, CD22, CD25, CD79a, cCD22, cCD79a
Célula T	CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, cCD3, TdT

Tabla 4. Marcadores inmunológicos comúnmente usados en la clasificación de leucemias agudas

La clasificación de LLA por inmunofenotipo está basada principalmente en identificar los marcadores de superficie con anticuerpos monoclonales de los linfoblastos, que complementa las pruebas morfológicas y citoquímicas; el linaje de diferenciación entre LLA y LMA se puede precisar en más de un 95% de las leucemias agudas, y LLA. Además se subclasifica en base a su precursores, células B o T.



	CLP	early B	pro-B	pre-BI	large pre-BII	small pre-BII	immature B	mature B
CD34	+	+	+	-	-	-	-	-
CD10	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-7Rα	+	+	+	-	-	-	-	-
CD19	-	-	+	+	+	+	+	+
CD79a	-	+	+	+	+	+	+	+
TdT	-	-	+	-	-	-	-	-
RAG	-	-	+	+	-	+	+	-
Vpre-B	-	+	+	+	+	-	-	-
μH	-	-	+/-	+	+	+	+	+
pre-BCR	-	-	-	-	+	-	-	-
IgH	GL	DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H
κL	GL	GL	GL	GL	GL	V _L J _L	V _L J _L	V _L J _L
cycling	-	-	-	+	+	-	-	-
Pax-5	-	-	+	+	+	+	+	+
sigM	-	-	-	-	-	-	+	+
sigD	-	-	-	-	-	-	-	+

Annu. Rev. Immunol. 2006.24:287-320.

Figura 1. Modelo de diferenciación linfocitaria basado en los estados de maduración y desarrollo, por la presencia de antígenos en la membrana celular identificados por anticuerpos monoclonales y por la expresión de inmunoglobulinas en el citoplasma o en la membrana (Abreviaturas: PLC Progenitores Linfocíticos Comunes y DP dobles positivos)

Aproximadamente del 70% al 80% de las LLA en niños tienen origen en células B. De este linaje, del 2% al 5% de leucemias se originan de células B maduras (leucemia de Burkitt); el restante de los casos 15% comprende LLA derivada de precursores de T (4).

Marcadores de células B

Los receptores para antígenos de las células B (BCR) están constituidos por una proteína transmembranal de reconocimiento (IG) y dos proteínas asociadas (IG- α e IG- β). Con estos elementos realizan el reconocimiento de antígenos previamente expuestos y los de novo que se presentan a estas células, la célula B expresa una gran variedad de proteínas de membrana muy útiles con fines de diagnóstico. Algunas de estas moléculas funcionan como receptores de señales de maduración y de activación, otras como las moléculas CD10 son útiles en el diagnóstico (antígeno común de LLA "CALLA").

El diagnóstico por inmunofenotipo puede hacerse con precisión por medio de los antígenos y otras proteínas expresadas en la membrana celular de los leucocitos de manera normal, donde el diagnóstico de una neoplasia hematológica está basado en la presencia de estos marcadores en números significativamente más elevado de lo normal, o en la presencia de un fenotipo aberrante resultado de: la expresión de un marcador en un linaje en el que no es normalmente expresado, o la expresión de antígenos asincrónicos (por ejemplo, la expresión de un marcador en una fase de diferenciación donde normalmente no pertenece). Por ejemplo en el caso del precursor temprano de B expresa desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) y HLA-DRII.

CD19 y CD22 citoplasmático aparecen de manera temprana y son expresados prácticamente en todos los casos de LLA de precursor de B, lo mismo sucede con CD79a, donde la expresión de TdT coincide con la reorganización genética de la cadena pesada Ig la expresión CD10 y CD19 precede al reareglo de la cadena ligera de Ig, donde el inmunofenotipo CD10, CD19, CD34 y TdT representa aproximadamente dos terceras partes de LLA de precursor de B.

La siguiente etapa pre-B, expresa CD20, inmunoglobulinas citoplasmáticas (cIg) y la ausencia de inmunoglobulinas de superficie (slg). La última etapa de la leucemia aguda. La etapa de célula B presenta slg, frecuente pérdida de CD10 y TdT negativa; esta etapa corresponde al linfoma de Burkitt. La frecuencia relativa de la expresión de antígenos precursores de B en LLA se presenta en la tabla 6(41).

Antígeno	Casos positivos en %
HLA-DR	99.8
CD19	98
CD24	97
CD10 (antígeno común en LLA)	92
CD9	90
CD22	74
CD34	64
CD20	36
CD21	4

Tabla 6. Frecuencia de expresión de antígenos de linfocitos B en LLA de precursores de B.

Marcadores de células T

La LLA de células T comprende aproximadamente el 15% de los casos (4). Las células T son reconocidas con anticuerpos monoclonales por su arreglo de los genes del receptor (TCR). Los heterodímeros de TCR son expresados en células T, estos receptores están compuestos por las subunidades alfa (α) y beta (β) se expresan en la mayoría de las células T, otros TCR están compuestos por las subunidades gama (γ) y delta (δ) que representan una pequeña fracción de LT circulantes. Ambos tipos de TCR están asociados no covalentemente con CD3, un complejo de proteínas implicadas en la transducción de señales. El TCR, a diferencia de los anticuerpos que se unen directamente con los antígenos, reconoce antígenos en forma de péptidos unidos a moléculas del

complejo principal de histocompatibilidad (HLA) en la superficie de células presentadoras de antígenos (CPA), lo cual es fundamental para la respuesta de los linfocitos T. Además, la interacción del TCR con las moléculas del MHC durante distintas etapas de la vida de los linfocitos T en la periferia y en la maduración de sus precursores en el timo, conforman el repertorio inmunológico de lo propio y lo no propio. El rearreglo de los genes de la cadena delta TCR- δ es seguido por una relativa sincronización de los genes gama y beta, para finalizar el rearreglo del gen alfa.

Los genes del TCR- δ son usualmente modificados alrededor en un 80% los casos en los precursores de T en la LLA pero los genes de alfa, beta y gama pueden permanecer en un estado de línea germinal. Los pre-timositos solo expresan CD3 citoplasmático, el rearreglo de los genes del TCR-beta es seguido por la expresión CD7. Los antígenos CD2, CD5 y CD7 son expresados de manera temprana y persistente a través del desarrollo de las células T. Las células T normales son caracterizadas por la expresión de TCR/CD3 en su superficie y de un grupo de marcadores que se muestra en la figura 1, pero como ya se mencionó el diagnóstico de una neoplasia hematológica está basada en la presencia de estos marcadores en números significativamente más elevado de lo normal o en la presencia de un fenotipo aberrante resultado de la expresión de un marcador en un linaje en el que no es normalmente expresado, o la expresión de antígenos asincrónicos. El fenotipo de LLA-T corresponde a las fases tempranas de diferenciación de células-T dentro del timo, donde los casos que corresponden a la fase 1 de la diferenciación de células T son CD34+/CD7+/CD2+, y algunos de ellos también son CD10+. Este fenotipo corresponde a la célula del pre-T, de precursores detectados en la médula ósea. Los fenotipos de células más maduras son caracterizados por la falta de CD34 y CD10, y en una fase de transición son CD4⁻/CD8⁻/CD7⁺ (fase 2), esto está relacionado con la resistencia a la quimioterapia y una escasa sobrevivencia. La ausencia de la expresión de CD2 identifica un grupo de pacientes con un mal pronóstico. Muchos de los casos de LLA-T son HLA-DR negativo.

Aproximadamente un 10 al 20% de los niños con LLA expresa antígenos mieloides como CD13 y CD33.

Marcadores Citogenéticos

La caracterización citogenética de las células leucémicas es una parte integral de la evaluación inicial de LLA, se describe que en más del 40% de los casos, presentan anormalidades cromosómicas (2,3). Los análisis citogenéticos de los linfoblastos, revelan recurrentes translocaciones en regiones que activan a un grupo pequeño de oncogenes (entre un 25% a 50% de los casos de LLA-T). Por otra parte una gran proporción de LLA-T muestra cariotipos normales (4, 18). Las translocaciones cromosómicas que ocurren en los casos de LLA-T frecuentemente involucra la yuxtaposición de los elementos del promotor y del receptor de la célula-T (TCR) genes en el cromosoma 7 (TCRB y TCRG) y cromosoma 14 (TCRA y TCRD) con los genes de los factores de la transcripción, tales como TAL1 (leucemia linfocítica aguda 1 de células-T; también conocido como SCL), LYL1 (secuencia derivada 1-leucemia linfoblástica) y HOX11 (Homeobox-11; también conocido como TLX1) (1). La frecuencia de cada trastorno cromosómico en LLA se presenta en la Tabla 7.

Poliploidias en células blasticas	Frecuencia (%)
46,diploidia (normal)	10-20
46, Pseudoploidia (anormalidades estructurales)	30-40
< 45, Hipodiploidias	7-8
23-29,cercano a la haploidia	<1
30-40, baja hipodiploidia	<1
>46, hiperdiploidia	40-50
47-50, baja hiperdiploidia	10-15
51-65, alta hiperdiploidia	30-55

66-80, cercano a la triploidia	1
>80, cercano a la tetraploidia	1

Tabla 7. Frecuencia de trastornos en el número de cromosomas en leucemia Linfoblástica en niños

Los arreglos estructurales o traslocaciones están presentes en 40% de los casos de LLA, las anomalías más comunes se enlistan en la Tabla 8 (4,17, 24), donde los métodos para la caracterización genética de LLA, tal como el cariotipo o la tinción de cromosomas, proporciona información precisa y fiable sobre la ubicación de material cromosómico que participa en la reorganización de genes asociados a leucemia (17). Anomalías genéticas adicionales en célula T de los individuos con LLA incluyen traslocaciones cromosómicas que genera la fusión de genes que codifican nuevas proteínas quiméricas con características oncogénicas, tales como el SIL (SCL) - TAL1 y MLL (mixed-lineage leukemia) (6,10). Recientemente, se ha encontrado que más de 50% de los casos de LLA-T se originan al activar mutaciones en el principal regulador de la célula-T NOTCH1. Las proteínas Notch - Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4 - son los reguladores esenciales de los progenitores hematopoyéticos de linaje T (6, 10, 18, 25).

Trastorno citogenético	Inmunofenotipo	Fusión de genes	Frecuencia (%)
t(12;21)(p13;22)	Linaje-B	TEL-AML-1	20-25
t(1;19)(q23;p13)	Linaje-B	PBX1-E2A	5
t(9;22)(p34;q11)	Linaje-B	BCR-ABL	4
t(4;11)(q21;q23)	Linaje-B	MLL-AF4	3
t(8;14)(q24;q32)	Linaje-B (maduro)	MYC-IgH	2-3
t(17;19)(q22;p13)	Linaje-B	HLF-E2A	<1
t(11;19)(q23;p13.3)	Linaje-B	MLL-ENL	<1
t(8;22)(q24;q11)	Linaje-B (maduro)	MYC-IgL	<1

t(2;8)(p12;q24)	Linaje-B (maduro)	MYC-IgK	<1
t(1;14)(p32;q11)	Linaje- T	TAL1-TCR δ	<1
t(1;7)(p32;q34)	Linaje- T	TAL1-TCR β	<1
t(1;7)(p34;q34)	Linaje- T	LCK-TCR β	<1
t(7;9)(q34;q32)	Linaje- T	TAL2-TCR β	<1
t(7;9)(q34;q34)	Linaje- T	TAN1-TCR β	<1
t(8;14)(q24;q11)	Linaje- T	MYC-TCR α/δ	<1
t(14;11)(p15;q11)	Linaje- T	LMO1-TCR δ	<1
t(11;14)(p13;q11)	Linaje- T	LMO2-TCR δ	<1
t(7;10)(q34;q24)	Linaje- T	HOX11-TCR β	<1
t(7;11)(q34;p13)	Linaje- T	RHOM2-TCR β	<1
t(7;9)(q34;p13)	Linaje- T	LYL1-TCR β	<1
t(10;14)(q24;q11)	Linaje- T	HOX11-TCR δ	<1

Tabla 8. Frecuencia de las anomalías en los cromosomas más comunes en niños con leucemia linfoblástica.

Diagnóstico

El diagnóstico de una leucemia aguda siempre se debe realizar mediante el análisis morfológico, molecular y citogenético del aspirado de la médula ósea. La característica de la leucemia aguda es la presencia de números elevados de blastos en la sangre periférica o la médula ósea. El número de blastos debe exceder el 30% en sangre periférica o el 30% de los elementos nucleados totales en la médula ósea para establecer un diagnóstico de leucemia aguda (3); donde el subtipo de LLA se define con los estudios morfológicos, inmunofenotipo, y citogenéticos de dicho aspirado.

Características clínicas

Los síntomas más comunes en niños incluyen: fatiga, pérdida de peso generalmente no severa, fiebre, petequias (puntitos hemorrágicos de la piel), equimosis (moretones), dolores óseos. Entre los signos más frecuentes están el

crecimiento de hígado, bazo y ganglios linfáticos puede también estar presente masas mediastinal (común en LLA-T) (3,4), tos y otros síntomas respiratorios, que se pueden confundir desde neumonía, bronquitis y asma. La leucemia dentro del sistema nervioso central (CNS), puede manifestarse como dolor de cabeza y datos de meningismo (4).

Tratamiento

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

Inducción

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

Intensificación (consolidación)

Una vez lograda la reinstauración de la hematopoyesis normal los pacientes en remisión son candidatos para la terapia de intensificación. Este tratamiento, administrado tempranamente después de la terapia de inducción, hace referencia a altas dosis de agentes quimioterapéuticos, no usados en la fase de inducción o la reutilización de los agentes del régimen de inducción.

Mantenimiento

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

Tratamiento del SNC

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

Recaída

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

Trasplante hematopoyético

Los pacientes con criterios de muy alto riesgo al diagnóstico, así como aquellos que sufren una recaída, tienen en general una mala evolución si se les trata sólo con quimioterapia convencional. Es en estos pacientes en los que el

trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) ha conseguido aumentar su supervivencia. Actualmente las indicaciones de TPH en la LLA se resumen en: LLA con t9:22, pacientes que no alcanzan la remisión completa tras el tratamiento de inducción y pacientes con recaída (sobre todo si la recaída es precoz) (17, 19)

Patogénesis

El cáncer lo entendemos como la proliferación incontrolada de células, lo cual da como resultado el inadecuado funcionamiento de la población normal de células (26), por lo tanto uno de los principales factores involucrados en la génesis del cáncer, es la alteración del ciclo celular, el cual en condiciones normales consta de mecanismos que le permiten controlar su división (27,28). Estos mecanismos dependen de señales tanto intracelulares como extracelulares que regulan procesos de transducción de señales, permitiendo de esta forma que una célula entre o no en un ciclo de división celular.

Todas las células hematopoyéticas derivan de una célula madre hematopoyética (HSCs). Estas células se diferencian hasta células maduras a través de varios intermediarios celulares que se definen por la expresión de diferentes antígenos celulares de superficie. Tradicionalmente, los investigadores han asumido que el primer paso en el desarrollo de las células hematopoyéticas es la diferenciación de las HSCs en los precursores mieloides y linfoides, donde el linaje mielóide en la sangre corresponde a eritrocitos, megacariocitos, monocitos y granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos); y los precursores de las células linfoides desarrollaran células NK, T, y B. La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que los linfocitos T, B, y células de NK se originan de un precursor común, generalmente llamado precursor linfoide común (CLP). El número correcto de células hematopoyéticas maduras y células hematopoyéticas no maduras de cada linaje son producidas por un balance entre la división celular, la muerte celular programada

(apoptosis), la senescencia replicativa, y la diferenciación gobernada por los factores de crecimiento apropiados (20)

Para que una célula prolifere, debe llevarse a cabo una serie ordenada de procesos en los cuales el material genético (ADN) es duplicado y los cromosomas son después segregados a cada célula hija. El ciclo celular básico se divide en cuatro fases; Durante dos de estas fases, las células realizan los dos acontecimientos básicos de la división celular: generación de una sola y fiel copia de su material genético (fase de síntesis o fase S), y la división de todos los componentes celulares en dos idénticas células (mitosis o fase M). Las otras dos fases del ciclo G1 y G2 representan los períodos, durante los cuales las células se preparan para un adecuado término de las fases S y M, respectivamente. Cuando las células detienen su proliferación, debido a cualquiera de las señales anti-mitogénicas específicas o bien la ausencia de una señalización mitogénica apropiada, salen del ciclo y se incorporan a un estado de no-división, estado conocido como G0 (28). La homeostasis de las células es dependiente de las relaciones apropiadas entre la proliferación celular, la diferenciación, y la muerte celular. Es decir que, mientras que las células somáticas proliferan, la progresión mitótica del ciclo de la célula es regulada firmemente por una red intrincada de señales positivas y negativas, que mantienen un número de células dentro de parámetros normales (28, 29).

Para asegurar la progresión apropiada del ciclo celular, las células han desarrollado una serie de puntos de comprobación que le evitan entrar en una nueva fase, hasta que termine con éxito la fase anterior (27). También es probable que las células en Fase de G0 o células quietas deban pasar ciertos puntos de comprobación antes de que puedan incorporarse al ciclo (24,28). Por ejemplo, ciertas células, CD34+, son células progenitoras tempranas de T, en sangre periférica no están activadas, se mantienen en un estado inmóvil llamado G0, aquí no se están dividiendo, hasta que entren al ciclo celular y se dividan en respuesta a factores de crecimiento y mitogénicos. Por ejemplo las células T

humanas requieren de la coestimulación de CD3/CD28 por un periodo de 2 a 5 horas para promover la entrada a la fase G1, de lo contrario las células permanecen en la fase G0, además, las células en G0 carecen de muchas de las proteínas que son necesarias para continuar a la fase S (20).

Durante la proliferación celular activa, el ciclo celular puede ser detenido, durante la fase G1 o G2: por ejemplo, si el ADN tiene que ser reparado. El arresto también puede ocurrir cuando una célula susceptible se expone a factores negativos de crecimiento, lo que causa alteraciones en el ciclo celular. Sin embargo, en ausencia de factores de supervivencia o de factores de crecimiento negativos, la suspensión de factores de crecimiento, activará factores apoptóticos. Por lo tanto es crucial mantener un orden de manera individual en las fases del ciclo celular y el fracaso para mantener el orden temporal entre la replicación del ADN y mitosis G1-S-G2-M, resulta de un cambio en el número de copias de los genes (ploidías).

Proteínas que regulan el ciclo celular.

La progresión del ciclo es de suma importancia para la célula y el organismo, por lo que es altamente monitoreada y regulada. El sistema de control del ciclo celular se basa en dos familias de proteínas: las cinasas dependientes de ciclinas (cyclin-dependent kinases-Cdks) y las ciclinas. Cdks permite la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular fosforilando los sustratos. La abundancia de ciclinas específicas aumenta durante la fase del ciclo celular en donde se requieren y disminuye durante las fases en las cuales no son necesarios (26,27, 29). (Figura. 2)

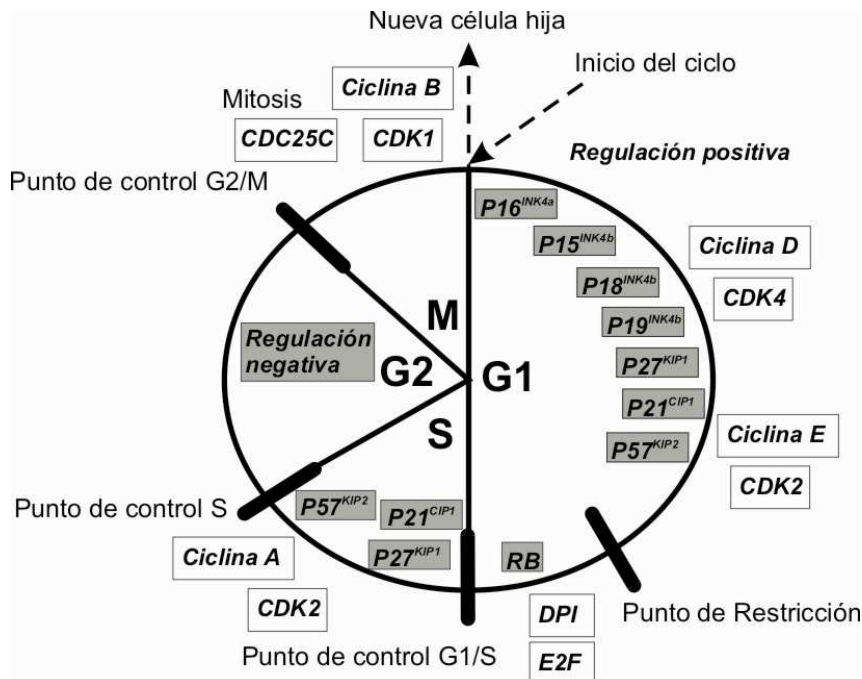


Figura 2. Etapas del ciclo y las proteínas que regulan la transición entre cada etapa

Una gran variedad de proteínas participan en la regulación del ciclo celular respondiendo a los estímulos mitogénicos (Tabla 9). Las primeras en descubrirse fueron las ciclinas, que son proteínas que aparecen y desaparecen durante el ciclo celular; ellas son reguladores claves en la transición del ciclo celular. Después se descubrieron las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). En realidad la ciclina y la quinasa dependiente de ciclina constituyen una sola macromolécula con actividad de cinasa; ninguna de las dos son funcionales cuando están separadas. Finalmente, se descubrieron los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas. Todas las cinasas dependientes de ciclinas están estructuralmente relacionadas unas con otras, y requieren estar asociadas con sus respectivas ciclinas para constituir la holoenzima y ejercer su actividad. Entendiendo los mecanismos moleculares que permiten a las células entrar al ciclo debe proporcionar pistas importantes, de los elementos determinantes de una proliferación normal, contra una proliferación anormal en los organismos multicelulares (27, 28).

Ciclinas	Quinasas	Inhibidores	Fase que regulan
Ciclina A	Activa CDK2 y CDC2	p21, p27	S a M
Ciclina B1	Activa CDC2	p21,p27	Progresión a M
Ciclina B2	NC	NC	Progresión a M
Ciclina C	Activa CDK8	p21, p27	G1-NC
Ciclina D1	Activa CDK4	p15, p16, p18, p19, p21,p27	G1
Ciclina D2 y D3	Activan CDK6	p15,p16,p21,p27	G1
Ciclina E	Activa CDK2	p21,p27	Progresión a S
Ciclina F	NC	NC	G2 a progresión a M
Ciclina G1 y G2	Reparación del DNA	NC	S-NC
Ciclina H	Activa regulación de la transcripción y reparación del DNA	CDK7, NC	G1-S

Tabla 9. Ciclinas, quinasas e inhibidores de quinasas y su relación con las fases del ciclo celular.

Alteraciones en el ciclo celular

La comprensión de los puntos de control a nivel molecular, su alteración y su relación con el cáncer es, en este momento, un tema inconcluso y de gran relevancia, debido a que está permitiendo diseñar estrategias terapéuticas más eficaces para el tratamiento del cáncer.

Normalmente el ciclo celular procede sin interrupciones, bajo el monitoreo, control y regulación de los mecanismos mencionados. Las células

normales tienen la capacidad de interrumpir el ciclo celular, cuando ocurre un daño celular y se afecta la maquinaria bioquímica o la información genética involucrada en el ciclo. Esta interrupción, es comúnmente denominada detención de la proliferación; y puede ocurrir en las fases G1, S y G2. La detención del avance del ciclo, tiene la finalidad de brindar el tiempo necesario para reparar los daños. Una vez que los daños han sido reparados, el ciclo continúa hasta la división de la célula. Cuando ésta no es capaz de reparar los daños, se activan los mecanismos de muerte celular programada para impedir que se produzcan células hijas con alteraciones en la información genética. En caso contrario, si la célula no muere y queda con un ADN alterado entonces continúa hacia la transformación maligna (30).

El análisis molecular de las neoplasias en humanos ha revelado que los reguladores del ciclo celular, y sobre todo los reguladores de la transición G1-S están frecuentemente mutados (31) (Figura 3), lo que muestra la importancia del ciclo celular en la prevención o el comienzo del cáncer humano.

Entre las alteraciones más frecuentes se incluyen la sobreexpresión de ciclinas (sobre todo D1 y E1), de CDKs (sobre todo CDK4 y CDK6), así como pérdida de expresión de CKIs (sobre todo p16, p15 y p27) y de pRB. Los cambios en la expresión de estos reguladores suelen ser consecuencia de alteraciones cromosómicas (amplificación de ciclina-D1 o de CDK4, translocación de CDK6 y delección de genes p16, p15 o pRB) o inactivaciones epigenéticas (mutilación de los promotores de p16 o pRB). También se han identificado, aunque con baja frecuencia, mutaciones en CDK4 o CDK6 que dan lugar a la pérdida de su capacidad de unirse a los inhibidores INK4 (27,31).

Las alteraciones genéticas o epigenéticas en CDK2 y en sus reguladores han sido raramente descritas en tumores humanos, aunque son frecuentes la pérdida de expresión de CDKN1B (gen que codifica p27 en humanos) y la sobreexpresión de ciclina E1. Ambas mutaciones se correlacionan con un peor

pronóstico. Los mecanismos que alteran la expresión de p27 y ciclina E1 en las células tumorales no son todavía bien comprendidos. La degradación de p27 es mediada, al menos en parte, por SKP2, una proteína del complejo SCF. La proteína SKP2 tiene capacidad oncogénica y su expresión está alterada en algunas células tumorales. De manera similar, la proteína responsable de la degradación de la ciclina E1 (CDC4/FBW7/AGO) está inactivada en algunas líneas celulares de cáncer. Alternativamente, la sobreexpresión de ciclina E asociada a cáncer puede ser explicada por la inactivación de pRB, que es mediada por la actividad CDK4/6 (26, 28,31). La inactivación o pérdida de pRB es un evento frecuente en tumores humanos.

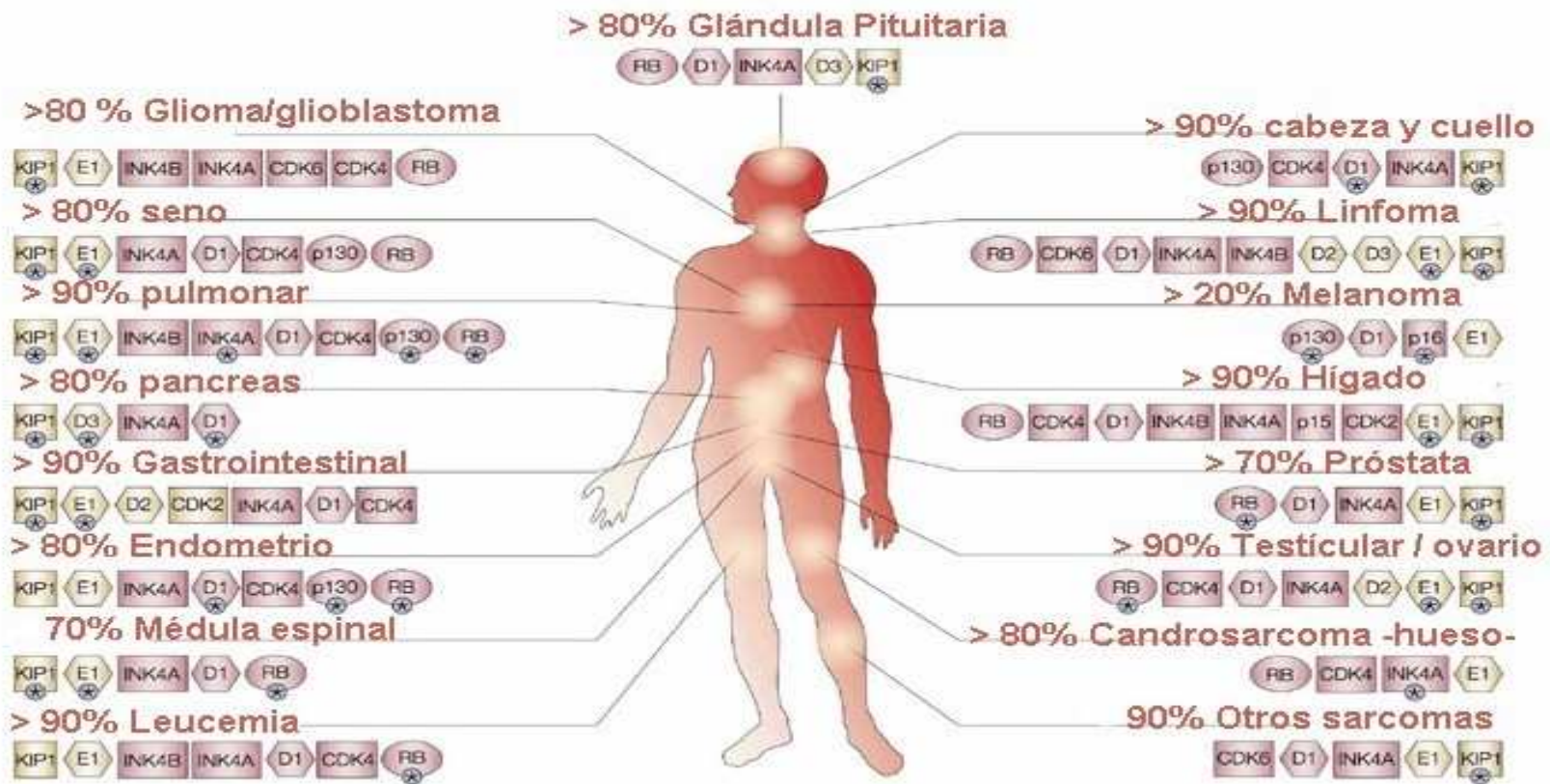


Figura 3. Mutaciones de los reguladores G1-S en cáncer humano. Solo han sido consideradas en esta figura las mutaciones que ocurren en más del 10% de los cánceres humanos. Los números representan el porcentaje de tumores con alteraciones en alguno de los reguladores del ciclo celular que aparecen en la lista. Los *loci* en los que se ha podido definir mutaciones genéticas o epigenéticas aparecen con fondo claro. Las alteraciones para las que no se ha encontrado una explicación mecanística aparecen con fondo más oscuro. Las alteraciones relevantes para el pronóstico tumoral aparecen marcadas con asterisco.

Otras alteraciones menos frecuentes son la pérdida de p130, y no se ha descrito la inactivación de la p107. Esto indica que p130 y p107 pueden ser más importantes para la diferenciación que para la proliferación.

El gen de p53 ha sido llamado el “guardián” del genoma humano porque transmite una gran cantidad de señales cuando hay daño en el ADN, provocando el arresto del ciclo celular o la apoptosis. El principal regulador de p53 es MDM2. La proteína MDM2 inhibe la transcripción y estimula la degradación de p53. Los sitios de unión de MDM2 incluyen varios sitios de fosforilación, aunque el mecanismo exacto por el cual MDM2 regula la degradación de p53 no es aun claro. Las anomalías de p53 son encontradas en poco mas del 50% de los tumores humanos. Tales anomalías, así como la sobreexpresión, ausencia o mutaciones en las proteínas clave del ciclo celular ya mencionadas, principalmente las que están relacionadas en fase G1, pueden afectar el balance entre la proliferación celular, la senescencia, la apoptosis o la diferenciación, y en malignidades hematopoyéticas provocan una expansión de clones malignas, esto es causado en parte por la inhibición de la proliferación y actividad de células normales; por ejemplo alteración en las vías de las proteínas CKI, cdk, pRb y E2b, y su relación con leucemias son representadas en la figura 4 (24,32).

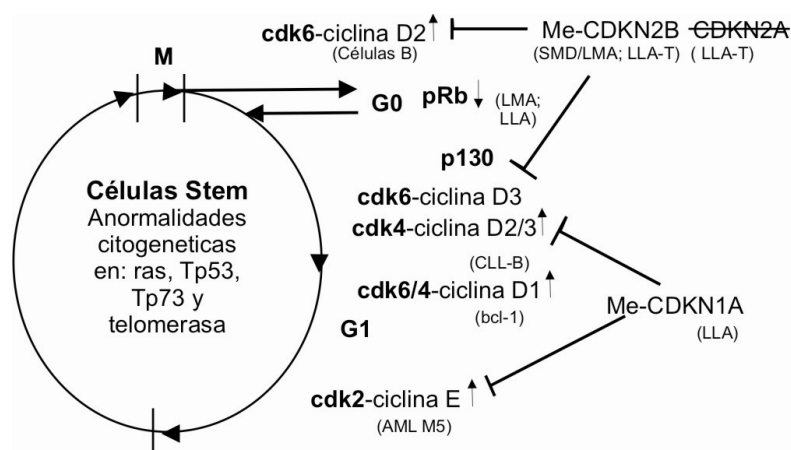


Figura 4. Trastornos en proteínas del ciclo celular en leucemias.

En resumen y como ya se mencionó, en condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de oncogenes, donde el producto de los oncogenes, sus oncoproteínas, llevan o facilitan la transformación de una célula normal en una célula maligna. Las oncoproteínas pueden actuar directamente con las proteínas que regulan el ciclo celular o pueden controlar su actividad por fosforilación o desfosforilación. La identificación y caracterización de los oncogenes y sus respectivas oncoproteínas, involucradas en el cáncer ha sido uno de los principales avances biomédicos, las alteraciones citogenéticas ocurren en una mayoría sustancial de las malignidades linfoides. Las anomalías citogenéticas son clasificadas en estructurales o numéricas: cambios estructurales incluye translocaciones e inversiones; cambios numéricos incluye deleciones o aumento de regiones o genes completos en los cromosomas. En la Tabla 10, se muestran algunos ejemplos más frecuentes de los tipos principales de proteínas que son activadas por desplazamientos de los cromosomas en malignidades linfoides (24)

Clase	Proteína	Translocación	Función
Factor de transcripción	c-MYC	t(8;14)(q24;q32)	Involucra genes reguladores en el ciclo celular y apoptosis
	E2A-PBX1	t(1;19)(q23;p13)	Heterodímeros con proteínas Hox, bloquea diferenciación, y transforma células linfoides
	TAL1/SCL	t(1;14)(p32;q11)	Requerido en la hematopoyesis, regula genes involucrados en la proliferación de progenitores mieloides

	HOX11	t(7;10)(q35;q24)	Inmortalización de las células hematopoyéticas
	LMO2	t(11;14)(p13;q11)	El complejo con otras proteínas regulan la hematopoyesis
Factor de crecimiento	IL-3	t(5;14)(q31;q32)	La desregulación en la producción de citocinas produce efectos autocrinos y paracrinos en progenitores tempranos hematopoyéticos
Quinasa	BCR-ABL	t(9;22)(p34;q11)	La acción de la quinasa tiene función proliferativa y anti-apoptótica.
	NPM-ALK	t(2;5)(p23;q35)	La vía de actividad de la quinasa ALK involucra proliferación celular, transformación y supervivencia
Proteínas del ciclo celular	CCND1	t(11;14)(q13;q32)	Activa la progresión del ciclo celular de células centrociticas
Regulador de la apoptosis	BCL2	t(14;18)(q32;q21)	La translocación desregula la expresión de supresores apoptóticos

Tabla 10. Principales clases y ejemplos de mutaciones causantes de malignidades linfoides.

Apoptosis

El término 'apoptosis' que es la muerte celular programada, fue acuñado originalmente para describir las características morfológicas de cierto tipo de muerte celular, en contraste con el proceso incontrolado de la necrosis. En este último, las células se hinchan y estallan, derramando su contenido entre las células vecinas, lo cual representa potencialmente una respuesta inflamatoria perjudicial; en el primero, las células se “encogen” y su contenido citoplasmático y nuclear también se condensa, el DNA se degrada para dar lugar a los cuerpos apoptóticos.

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica. El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de *iniciación*, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de *ejecución*, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, en la tercera etapa o de *eliminación*, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes.

Apoptosis mediada por una cascada proteolítica intracelular

La maquinaria intracelular responsable de apoptosis parece ser similar en todas las células animales. Esta maquinaria depende de una familia de proteasas que presentan una cisteína en su sitio activo y se unen a sus proteínas blanco en los residuos de ácido aspártico específicos. Estas proteínas son llamadas caspasas. Las caspasas se sintetizan en la célula como precursores inactivos, o pro-caspasas, estas se pueden activar mediante proteólisis mediada por otras caspasas activas o por procaspasas o mediante cambios conformacionales inducidos por caspasas activas. Una vez que están activadas, las caspasas se unen, de tal manera que activan a otras pro-caspasas, dando por resultado una cascada proteolítica. Algunas de las caspasas activadas interactúan con otras proteínas de la célula. Algunas se

unen a láminas nucleares, causando daño; otras caspasas activan DNAsas las cuales cortan el DNA en el núcleo de la célula; así la cascada de las caspasa es no sólo destructiva, sino también irreversible, de modo que una vez que una célula alcanza un punto crítico a lo largo de la trayectoria a la destrucción, no puede dar vuelta atrás y repararse (33)

Vía receptor de la muerte y granzima

Un papel importante de la apoptosis, se puede ubicar en el funcionamiento del sistema inmune. El cual está implicado en el desarrollo propio de los receptores de linfocitos (TCR), asegurando así el reconocimiento de lo propio y lo no propio, en otras palabras las células transformadas o infectadas. Los linfocitos pueden activar el proceso apoptótico de dos maneras. En primer lugar, secretan una gama de proteínas en la superficie de la célula blanco, entre estas proteínas se encuentran, perforinas, las cuales pueden hacer poros en la membrana de tal forma que permiten que otras proteínas se incorporen a la célula; por ejemplo la granzima B que se une y activa a pro-caspasas específicas para iniciar la cascada de caspasas. El segundo mecanismo es, probablemente el más significativo. Los linfocitos expresan proteínas tales como Fas y su ligando en la superficie celular. Éstos pueden funcionar recíprocamente como receptores en las células blanco. Los receptores al unirse reclutan proteínas tales como FADD (proteína Fas-asociada al dominio-muerte) para formar el dominio DISC (death-induced signalling complex), que alternadamente recluta moléculas de procaspasa-8 las cuales inician una cascada proteolítica por medio de las caspasas y conducen a la apoptosis (33, 34).

Las proteínas de la familia Bcl-2 y las proteínas del IAP son importantes reguladores intracelulares del programa de muerte celular, al igual estas proteínas intracelulares, regulan la activación de pro-caspasas. Algunos miembros de esta familia, como la propia Bcl-2 el Bcl-XL, inhiben la apoptosis,

bloqueando parcial o completamente la activación del citocromo c de las mitocondrias. Otros miembros de la familia Bcl-2 no son inhibidores de la muerte, sino que por el contrario promueven la activación de procaspasas y la muerte celular. Algunos de estos promotores de la apoptosis, tales como Bad, funcionan uniéndose y haciendo inactivas a las formas que están relacionadas con la inhibición de la apoptosis, mientras que otros, como Bax y Bak, estimulan la activación del citocromo c de las mitocondrias. Así, si los genes que codifican Bax y Bak están inactivos, las células son resistentes a la mayoría de los estímulos de inducción a la apoptosis, indicando la importancia crucial de estas proteínas en la muerte celular programada. Bax y Bak también son activados por otros miembros de la familia Bcl-2 tales como Bid.

Otra familia importante de reguladores intracelulares en la apoptosis es la familia del IAP (inhibidor de apoptosis). Estas proteínas aparentemente inhiben la apoptosis de dos maneras: se unen a algunas pro-caspasas para prevenir su activación, y otra vía es que se unan a las caspasas para inhibir su actividad. Cuando las mitocondrias liberan el citocromo c para activar Apaf-1, también lanzan una proteína que bloquea IAPs, aumentando la eficacia del proceso de activación de la muerte (29,40,35).

Cáncer y la respuesta inmune.

El desarrollo, migración, activación y maduración de linfocitos es dependiente de la interacción célula-célula, la cual es coordinada por moléculas de superficie celular y receptores de antígenos. Durante su desarrollo, las células linfoides migran a varios sitios en el cuerpo. Los progenitores de los linfocitos interactúan con células accesorias, como células epidermales en el timo o células estromales de la médula. Estas células nutren e instruyen a las células precursoras de células linfoides a expresar genes antígeno-receptor, para proliferar, y diferenciarse en células maduras. Los linfocitos recién formados a la circulación y en los tejidos linfoides periféricos, dentro de los órganos linfoides, las células se distribuyen de manera dispersa o agregadas

formando nódulos o folículos. Los folículos linfoides contienen exclusivamente linfocitos B, además de células dendríticas y células reticulares. Fuera de los folículos linfoides, predomina los linfocitos T, aunque también hay macrófagos y otras células accesorias. Cuando las células linfoides se encuentran en reposo, los folículos son de tamaño relativamente pequeño y tienen una apariencia homogénea; estos folículos se describen como primarios. Los folículos antigénicamente estimulados, cambian su apariencia, aumentan de tamaño, muestran centros germinales o germinativos y entonces se describen como secundarios. En los centros germinativos, los linfocitos B proliferan, expanden su repertorio inmunológico y adquieren la capacidad de producir anticuerpos de alta afinidad. La mayoría de las células proliferantes, emigran de los centros germinales hacia los cordones linfoides de la médula del ganglio y se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos, un pequeño número de estas células B se transforman en células B de memoria (20)

Una gran cantidad de familias de moléculas de superficie están involucradas en la interacción célula-célula, estas familias incluyen: integrinas, selectinas, inmunoglobulinas (Ig), los Factores de Necrosis Tumoral α y β (TNF α y β) y sus receptores TNF (TNFR), las proteínas del complemento, receptores "scavenger", y las proteínas tetraspan.

La respuesta inmunitaria contra células cancerosas se basa en la suposición de que expresan antígenos de-novo, que no se encuentran en las células normales del mismo tejido, lo que permitiría al sistema inmune identificarlas y montar una respuesta para eliminarlas. Para eliminar estas aberraciones, el sistema inmune posee diversos mecanismos que le facilitan reconocer y eliminar estas células transformadas, por ejemplo utilizando linfocitotoxinas contenidas en LT CD8+. Sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal, no se expresan los antígenos tumorales o no se tiene la

capacidad para identificarlos, lo que trae como consecuencia el desarrollo de una neoplasia.

Algunos antígenos presentes en las células neoplásicas corresponden a antígenos presentes en células normales durante su etapa de diferenciación, por ejemplo los antígenos embrionarios que desaparecen cuando el embrión madura, posteriormente alguno de estos antígenos reaparecen asociados con algunos tumores, por ejemplo los niveles de alfa-fetoproteína (α -AFP) suele estar aumentada en carcinoma de hígado, de testículo, mientras que el antígeno carcinoembrionario (CEA) se incrementa en el cáncer de colon.

Al igual CA125 es un marcador tumoral, que se expresa especialmente en los tumores del epitelio ovárico, CA15.3 es una glicoproteína que se asocia a carcinomas de la glándula mamaria; CD10 (CALLA) es un antígeno común de la leucemia linfocítica aguda, es una glicoproteína que se encuentra en las células de la leucemia humana, aunque también se ha detectado con valores mínimos en otras células como granulocitos y células renales.

Vigilancia Inmunológica

El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue propuesto inicialmente por Thomas y Burnet en 1957, con la teoría de la "vigilancia inmunológica". Esta teoría postula que, dentro de un organismo, continuamente se están generando células malignas, pero que estas son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmune. La vigilancia inmunológica ha sido comprobada en varios modelos experimentales por ejemplo, la timectomía neonatal incrementa la frecuencia de tumores en animales de experimentación, la incidencia de tumores es mayor durante las etapas avanzadas de la vida (cuando el timo esta morfológica y funcionalmente disminuido); aunque estas y otras observaciones sugieren que el control de las neoplasias depende de la respuesta inmunitaria, hay otras observaciones que dificultan identificar la población celular que realiza estas actividades y hace ver que este es un fenómeno muy complejo, por ejemplo se ha visto que en ratones

desnudos (*nu/nu*), los cuales son atímicos y por eso no tienen linfocitos T maduros, se pueden injertar algunos tumores, pero no presentan mayor incidencia de tumores que los ratones con timo normal. Esto sugiere la posibilidad de que las células responsables de la vigilancia inmunológica no sean exclusivamente las células T, sino algún otro tipo celular como las células asesinas (NK), ya que estas células se encuentran en números normales y son funcionales en los ratones (*nu/nu*); al igual cuando se presenta alguna deficiencia funcional de los linfocitos NK, esta asociada a una elevada incidencia de tumores, como ocurre en ratones “beige” (desorden autosómico recesivo). El sistema inmune de los mamíferos es una red intrincada y perfectamente regulada, en la que participan varias poblaciones celulares (linfocitos T y B, macrófagos, y otras células), así como moléculas solubles (citocinas), donde la interacción de todos estos elementos permite que se desarrolle una respuesta inmune contra las clonas transformadas.

Es de suponerse que la inmunidad contra los antígenos tumorales se induce de manera análoga a como se induce la respuesta inmunitaria contra cualquier otro antígeno: donde los antígenos liberados por las células malignas pueden ser manejados como otros antígenos solubles, y esto incluye, su procesamiento y presentación por células presentadoras de antígeno (APC), hasta la activación de las células mediadoras de la respuesta inmune celular (Th1 CD4+, Tc CD8+) y humoral (Th2 CD4+, LB). Se entiende también que la inducción de la respuesta anti-tumoral requiere de la apropiada presentación de los epítopos tumorales y su reconocimiento por células reactivas, de la secreción de citocinas proinflamatorias y de la expresión normal de moléculas coestimuladoras tanto en las APC como en las células efectoras específicas y de la función reguladora de todos estos procesos biológicos. Mediante este mecanismo de inducción de la respuesta inmunitaria se generan tanto células T CD8+ efectores citotóxicos, y las células T CD4+ que pueden diferenciarse en las células T inflamatorias (Th1), células T helper (Th2) y Treg. Las células tumorales son también reconocidas y destruidas de manera directa e inespecífica por células NK.

Células citotóxicas

Linfocitos T citotóxicos (CTLs) y células asesinas naturales (NK) son células efectoras que comparten vías citotóxicas, pero las primeras tienen la competencia de realizar un reconocimiento específico del “antígeno modificado” y las segundas actúan de manera inespecífica. Ambas funciones son necesarias para la defensa contra las células infectadas por virus o transformadas y tumorales. Ambos tipos de células matan sus blancos celulares por cualquiera de los dos mecanismos que requiere del contacto directo entre el efector y la célula blanco. En el primer caso, los gránulos citotóxicos contienen, una proteína que altera la conformación de la membrana por medio de poros conocida como perforina, y proteínas con capacidad citolítica conocidas como granzimas; Las granzimas son una familia de serina-proteasas altamente homólogas contenidas en los gránulos citotóxicos. Su función es inducir la muerte celular y eliminar células infectadas por virus, células neoplásicas y células alteradas

Las granzimas pueden también desempeñar un papel en la regulación inmune controlando la supervivencia de linfocitos activados y pueden también regular la inflamación actuando sobre substratos extracelulares. Hay cinco granzimas en humanos y diez en el ratón, en humanos los genes se encuentran en los cromosomas 5, 14 y 19 (figura 5). Granzima A y granzima B (GzmA, GzmB) son las granzimas más abundantes. La GzmB, se une a la derecha de residuos de ácido aspártico, utilizando muchos de los mismos substratos que las caspasas. Las células asesinas, incluyendo las células NK, células citotóxicas CD4 y CD8-T, e incluso algunas células T reguladoras (Tregs) (41), expresan patrones altamente variables y de granzimas que dependen de tipo de célula y del modo de activación (33,39). Las granzimas son secretadas por exocitosis e inducen apoptosis de la célula blanco. Esta vía apoptótica activa cistein proteasas apoptóticas, conocidas como caspasas; esta vía puede llevar a la célula blanco a apoptosis en ausencia de caspasas. La segunda opción implica la acción y la agregación de los receptores de muerte en la célula blanco, conocido como FAS (CD95), que deberá unirse a su ligando (FasL), en la

membrana de la célula efectora, dando lugar a la vía clásica de apoptosis dependiente de caspasas. La función principal de la vía FAS-FASL es eliminar células linfoides autoreactivas (34, 36, 37,38).

Gránulo-exocitosis

Los gránulos citotóxicos son lisosomas secretores especializados, que están presentes solamente en células con capacidad citolítica. Cuando una célula T reconoce a su blanco, utilizando el receptor de antígenos (TCR), se genera un área de convergencia de la célula T con su blanco y se establece “la sinapsis inmunológica”. En la región central de la sinapsis de la célula T, se encuentra el receptor de la célula T (TCR) y coligandos - CD3 , CD4, CD8 que identifican la subpoblación celular y su asociación con las señales moleculares de diferenciación, es rodeado por moléculas más grandes, tales como CD2 y LFA1 (leukocyte function-associated antigen 1), las cuales forman áreas que estabilizan la sinapsis. Esta sinapsis se forma minutos después de la interacción inicial del TCR con su antígeno y dura más de una hora, el movimiento de los gránulos es orquestado por el centro de organización de los microtúbulos (MTOC) (34).

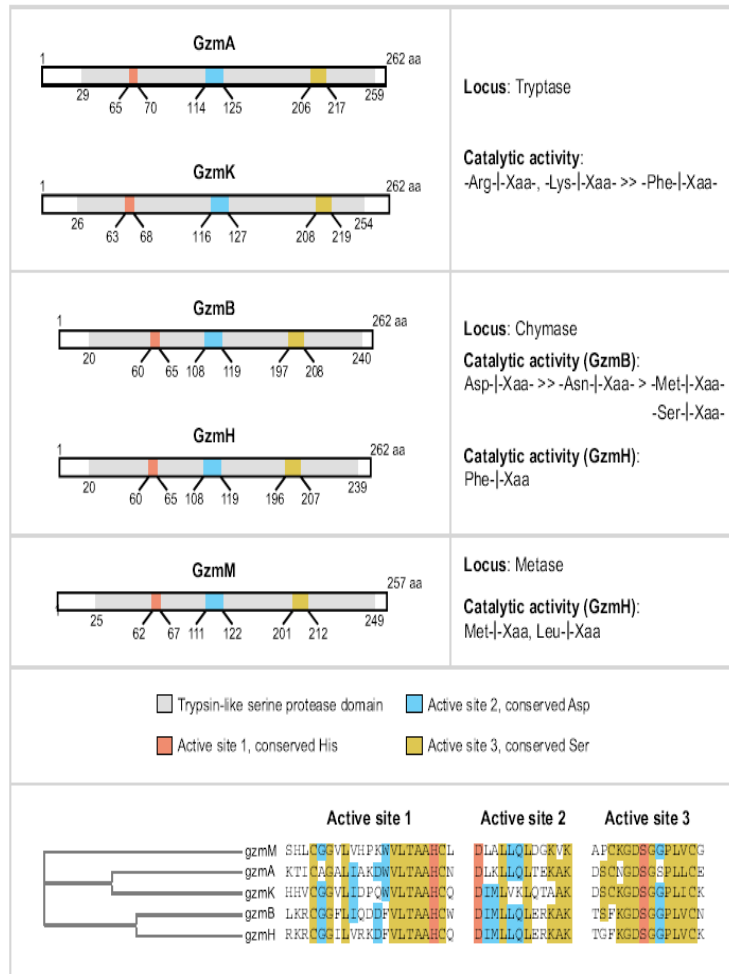
Los gránulos citotóxicos contienen proteínas formadora del poro (perforinas) y una familia de serina-proteasas conocidas como granzima A y B. Estas son las granzimas más abundantes en los humanos y han recibido la atención de diferentes autores particularmente, la granzima B porque activa la vía apoptótica dependiente de caspasas, estas se unen después de residuos de ácido aspártico. Los gránulos con las granzimas activas (proteínas básicas) se almacenan en asociación con sulfato proteoglicano de condroitina, los cuales se disocian al ser liberados, una vez realizada la sinapsis inmunológica donde el pH es neutro. Los dominios catiónicos conservados en la superficie de la granzima B parecen regular su aglutinamiento en la membrana que esta cargada negativamente y la subsecuente absorción en vesículas endocíticas. Después de encontrar Ca^{2+} extracelular, la perforina se une a lípidos de membrana de la

célula blanco. Si hay suficiente concentración de perforina, esta puede polimerizarse y complementar la formación de poros transmembranales de 10-20 nanómetros de diámetro, a través de los cuales las granzimas se pueden difundir en la célula. Alternativamente, las bajas concentraciones (sub-líticas) de perforina, facilitan la absorción y la acumulación de granzimas (figura 6) (33, 37,38,42).

Como ya sabemos una de las particularidades de la apoptosis es el daño al DNA, y esto ocurre durante la muerte celular inducida por las células citotóxicas. La inducción de la fragmentación rápida del DNA en células blanco se deteriora de manera importante cuando se lleva a cabo por medio de CTLs y granzima B. En las células blanco, la fragmentación del DNA se puede mediar por lo menos por dos endonucleasas: endonucleasa G, que es liberada por las mitocondrias, y DFF40/CAD (factor de la fragmentación de la DNA 40/ deoxynucleasa caspase-activada). El CAD está presente normalmente en un estado inactivo, y su activación requiere la proteólisis del inhibidor ICAD, actividad realizada por la caspasa-3, recientemente se reconoce que ICAD es sustrato de granzima B, dando por resultado la inducción de la fragmentación del DNA independiente de las caspasas.

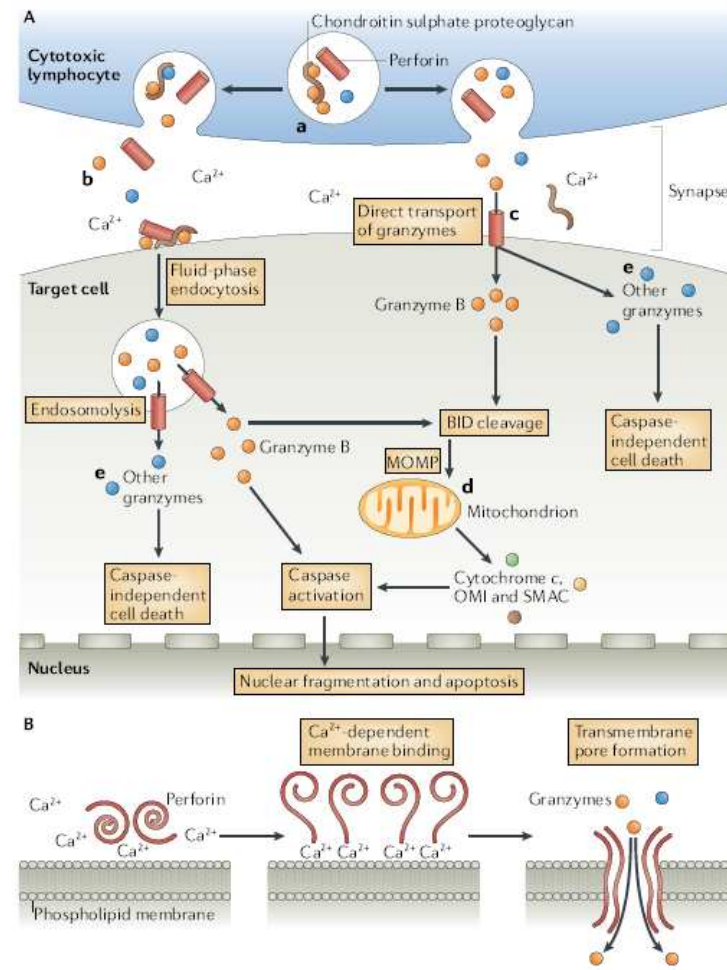
Otro blanco importante de la granzima B es la interacción con BID (BH3-dominio agonista de muerte), el cual destruye la integridad de la membrana externa mitocondrial activando BAD (BCL-2 antagonista de la muerte celular) y BAX (BCL-2proteína X asociada), lo que tiene como consecuencia la liberación al espacio intermembranal de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo c, endonucleasa G (ENDOG) y HtrA2/OMI (una serina proteasa recientemente identificada que inhibe al inhibidor de la proteína de la apoptosis (IAP), Sin embargo, el factor inductor de la apoptosis (AIF) no es liberado, el citocromo c que es liberado al espacio intermembranal se une al APAF1, que recluta pro-caspasa-9 para formar el apoptosoma. En el apoptosoma, es activada la caspasa-9 y alternadamente puede ser proteolíticamente activada la caspasa-3.

La pro-caspase-3 parcialmente activada puede también dimerizarse y activarse. Así los componentes de los gránulos citotóxicos pueden dañar a la mitocondria por la liberación de factores pro-apoptóticos al espacio intermembranal; afectando el potencial transmembranal de la mitocondria, llevando al colapso y a la posible muerte celular por necrosis (Figura 7) (42).



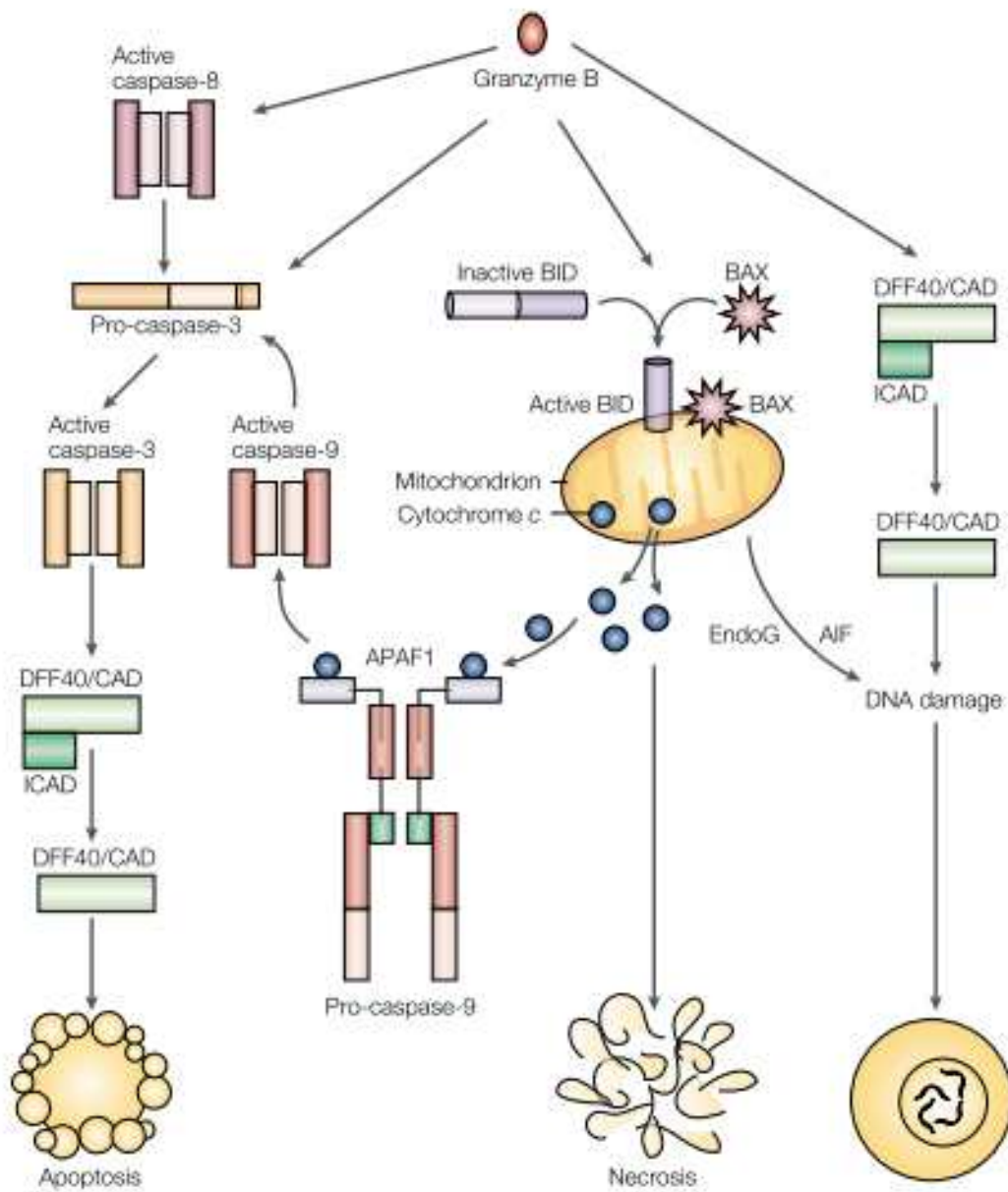
Annu. Rev. Immunol. 2008.26.

Figura 6. Familia de las granzimas humanas



Nat. Rev. Immunol. 2006.6.940-952

Figura 5. Modelos de la sinergia de la perforina y granzima en la célula blanco



Nat. Rev. Immunol 2006. 2.401-409

Figura 7. Vías de muerte celular por Granzima B.

Los diferentes estudios realizados hasta ahora, sobre todo *in vitro* han indicado que las células tumorales son susceptibles de ser destruidas por casi todos los mecanismos efectores de la respuesta inmunológica (Tabla 11). Es decir, pueden ser destruidas por efecto de la actividad lítica del complemento (en presencia de anticuerpo); por la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo ejercida por células NK, macrófagos y neutrófilos; por la citotoxicidad ejercida por linfocitos T citotóxicos CD8+, células NK y macrófagos activados con IFN γ y por efecto de los factores de necrosis tumoral alfa y beta (TNF α y TNF β)

- 1. Complemento (en presencia de anticuerpo).**
- 2. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), Células (NK, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares PMN).**
- 3. Linfocitos T (CD4+ y CD8+).**
- 4. Células NK (por citotoxicidad directa).**
- 5. Citocinas: IFN γ , TNF α y TNF β (linfotóxina).**

Tabla 11. Efectores de la respuesta inmunitaria que destruyen células tumorales.

Mecanismos de escape tumoral a la respuesta inmune

A pesar de que el sistema inmune es altamente eficiente en su respuesta contra el cáncer, existen mecanismos generados por los propios tumores que les permiten evadir dicha respuesta y desarrollarse en el organismo. Entre estos pueden mencionarse: a) falta de expresión de antígenos tumorales; b) disminución de la expresión de las moléculas de clase I del MHC; c) disminución de la expresión de genes que codifican para las proteínas TAP1/TAP2 (proteínas transportadoras de antígeno); d) secreción de bajos niveles de citocinas; e) células cancerosas que proliferan, de preferencia, durante periodos de inmunodeficiencia, aunque estos solo sean transitorios; f) durante los estados iniciales del tumor, la cantidad de antígeno tumoral es pequeña para estimular la respuesta inmunitaria del hospedero, aunque podría ser suficiente para inducir de

manera crónica un estado de tolerancia inmunológica; g) la función por ausencia o alteración de las NK.

Justificación

La leucemia linfoblástica aguda es la malignidad hemato-oncológica mas frecuente en niños menores de 15 años y la segunda causa de muerte en nuestro país con una tasa de 2.7 por cada 100,000 habitantes. La proliferación descontrolada de los precursores hematopoyéticos de la medula ósea en esta neoplasia, da como resultado un inadecuado funcionamiento de la población normal de células. Es probable que uno de los factores involucrados en la patogénesis, sean alteraciones en el control de la apoptosis, de ahí la importancia de conocer el grado de participación de algunos elementos de la respuesta inmune presentes en la LLA. La citotoxicidad mediada por granzima B es una de las vías para eliminar células transformadas, creemos importante conocer el grado de participación de esta vía apoptotica dentro del origen, recaída y vigilancia de la leucemia linfoblástica aguda. Es importante mencionar que en esta neoplasia se han descrito gran cantidad de alteraciones genéticas y factores de riesgo, hay muy poca información de las posibles alteraciones de la respuesta inmune en las leucemias, y en el caso particular del estudio de la apoptosis solo existe un artículo referente al comportamiento de la granzima B y perforina, pero en la leucemia mieloblastica aguda.

Objetivos

Objetivo General

Identificar la expresión de granzima B, en linfocitos CD8+ de niños mexicanos con diferentes estadios de leucemia linfoblástica aguda (LLA)

Objetivo Particular

Identificar mediante citometría de flujo, la presencia de Granzima B en la población de LT CD8+ en sangre periférica y de médula ósea de niños con diferentes estadios de LLA.

Hipótesis

En pacientes con leucemia linfoblástica aguda existe disminución en la expresión de Granzima B, en fases con actividad leucémica (recién diagnóstico y recaída), en comparación con la fase de control, tanto en médula ósea como en sangre periférica.

Ho

No existe alteración en la cantidad de granzima B de LTC CD8+ en las tres diferentes fases de la LLA, en las muestras de médula ósea y sangre periférica de niños con LLA

Material y Método

El presente proyecto se planteó en colaboración con la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAЕ) del Servicio de Hematología Pediátrica de Centro Médico Nacional “La Raza” IMSS , para el estudio y cuantificación de granzima B en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), en 3 diferentes estadios de la enfermedad (recién diagnóstico, recaída y vigilancia o control), para lo cual los enfermos remitidos al servicio de hematología pediátrica por sospecha de LLA, fueron hospitalizados para su revisión clínica exhaustiva, realizar estudios de laboratorio y gabinete que el grupo de hematólogos responsables determinaron. Las tomas de médula ósea (MO), se utilizaron para análisis citomorfológicos, citogenéticos e inmunotipificación por citometría de flujo. La toma de sangre periférica, para los siguientes estudios: Biometría Hemática completa, Química sanguínea y electrolitos séricos, policultivos y serología para virus de: hepatitis B, hepatitis C, virus de inmunodeficiencia humana VIH, citomegalovirus CMV, virus Epstein-Barr VEB y Toxoplasma; con todos estos elementos se establece el diagnóstico de aquellos niños en los que se demuestra LLA, se nos proporcionó una parte de la muestra de MO y de sangre periférica y se incluye en el grupo de recién diagnóstico o de novo.

Los pacientes que presentaron recaída son aquellos quienes estando en control, reinician con manifestaciones clínicas y alteraciones de laboratorio, se sigue el procedimiento referido anteriormente, se concluye recaída de LLA y se incluyen en el proyecto como casos de recaída.

Los pacientes en vigilancia, fueron citados por el médico hematólogo, se puso en contacto con el paciente y explicó ampliamente los motivos para la obtención de las muestras, consintiendo el procedimiento, se reitera que esta población tiene cuando menos tres años sin enfermedad.

En la muestra se incluyeron un total de 22 pacientes independientemente de su género (Tabla 8), menores de 16 años al diagnóstico y en las siguientes

etapas de la enfermedad LLA: diagnóstico reciente (Novo), pacientes con Recaída y en Vigilancia con mínimo de tres años de remisión completa continua; ninguno de los pacientes presentaron alteraciones en los resultados de serología viral

	DIAGNOSTICO RECIENTE		RECAIDA		VIGILANCIA	
MEDIANA DE EDAD EN AÑOS Al diagnóstico	8.5		7		7.2	
TOTAL	11		4		7	
	N	%	N	%	N	%
GENERO						
Masculino	10	90.9	2	50	5	71.42
Femenino	1	9.09	2	50	2	28.57
DIAGNOSTICO FAB						
L1	11	100	4	100	6	85.71
L2	0	0	0	0	1	14.28
DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO						
Células B	11	100	4	100	7	100
Células T	0	0	0	0	0	0
RIESGO AL DIAGNOSTICO						
Alto	5	45.45	2	50	2	28.57
Estándar	6	54.54	2	50	5	71.42
BIOMETRIA HEMATICA	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max
Hemoglobina gr/dl	8.7	3.6-14.4	11,45	8.6-14.2	14	12.7-15.4
Hematocrito %	38.35	11.5-31.3	33.32	23.7-42.2	41	36.2-44.1
Leucocitos/ μ l	33352.9	1080-429720	58017.5	7110-195300	6101.4	2900-8200
Neutrófilos/ μ l	5371	40-21480	6225	3610-11718	3132	1102-4740
Blastos/ μ l	76641.5	0-365200	42979.5	0-167958	0	0-0
Plaquetas/ μ l	133875	20000-359000	127500	49000-213000	23000	70000-276000

Tabla 8. Características generales de los pacientes por grupo de estudio

En la muestra de Mo como en la de SP se midió la expresión de Granzima B por citometría de flujo; las tinciones se realizaron en el laboratorio de inmunología de la Unidad de Morfología y Función en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM y las lecturas en el Laboratorio de citometría de flujo de los Laboratorios Centrales en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

Criterios de inclusión

Diagnostico reciente (Novo)

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

Recaída

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

Remisión completa (vigilancia)

Ausencia de datos clínicos de leucemia, restauración de la hematopoyesis en la medula osea con menos de 5% de blastos y biometría hemática con hemoglobina mayor de 10gr/dL (sin transfusión), neutrófilos totales \geq 1500/mcL y plaquetas \geq 100,000/mcL.

Tinciones

Para realizar la tinción de las células de MO, y SP se reviso que esta no presentara fibrina o coágulos, resuspendiendo la muestra después de cada paso para homogenizar y asegurar la buena realización de la metodología.

- 1) Colocar 25 μ L de la suspensión de células obtenidas de MO o SP en cada uno de los 4 tubos para FACS a utilizar.
- 2) Se realizan los marcajes con los anticuerpos correspondientes de cada muestra:

Tubo 1	Blanco
Tubo 2	Isotipo (SC-3738 Lot HQ007)
Tubo 3	Isotipo (SC-2339 Lot G1107)
Tubo 4	CD 3 (EXBIO PC-202-T100 Lot 12-2009), CD 8 (BD 347313 Lot 19203) y Granzima B (SC-1969 Lot H0207)

- 3) Se incubó los tubos con CD3 y CD8 durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 4) Se realizó un lavado agregando 500 µL de PBS (4°C), resuspendiendo y centrifugando a 2000 rpm.
- 5) Se agrego 50 µL de Buffer de permeabilizado (sc-3623 Lot #F2102), y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 6) Se realizó un segundo lavado agregando 500 µL de PBS (4°C), resuspendiendo y centrifugando a 2000 rpm.
- 7) Se elimino el sobrenadante y agregó la granzima B, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad
- 8) Se realizó un tercer lavado agregando 500 µL de PBS (4°C), resuspendiendo y centrifugando a 2000 rpm
- 9) Se agregó 100 µL de Buffer de Lisis (SC 3621 Lot #F2102) y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- 10)Se realizó un cuarto lavado agregando 500 µL de PBS (4°C), resuspendiendo y centrifugando a 2,000 rpm.
- 11)Se eliminó el sobrenadante y agregó 50 µL de Buffer de Fijación (SC 3622 Lot #F2102)
- 12)Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 13)Se realiza un cuarto lavado agregando 100 µL de PBS (4°C) resuspendiendo y centrifugando a 2,000 rpm.
- 14)Se elimino el sobrenadante y agregó 200 µL de Buffer de Lavado (SC 3624 Lot #F2102).

La lectura de las muestras se llevó a cabo en un citómetro FACS Calibur BD de cuatro canales, midiendo 20,000 eventos. Los datos fueron analizados con el software de la empresa Dako MoFlo and CyAn ADP versión 4.3, en el cual con ayuda de los isotipos y el blanco se seleccionó una región en un Dot plot FSC vs CD3 seleccionando la región que correspondía a los eventos negativos. En el tubo 4 con ayuda de esta región se seleccionaron todos los eventos CD3 positivos posteriormente en un segundo Dot plot se pudieron seleccionar la región CD8+ y GZM-B+, obteniéndose así el número y porcentaje de células además de la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI)

Resultados

En la figura 10 se muestra la calibración del blanco (10a), isotipo de chivo (10b) e isotipo de Mouse (10c), así como la selección de las células CD3 (10d) y la posterior selección de las células CD8+/GZM-B+(10e) de una muestra de sangre periférica de un paciente con diagnóstico reciente(novo).

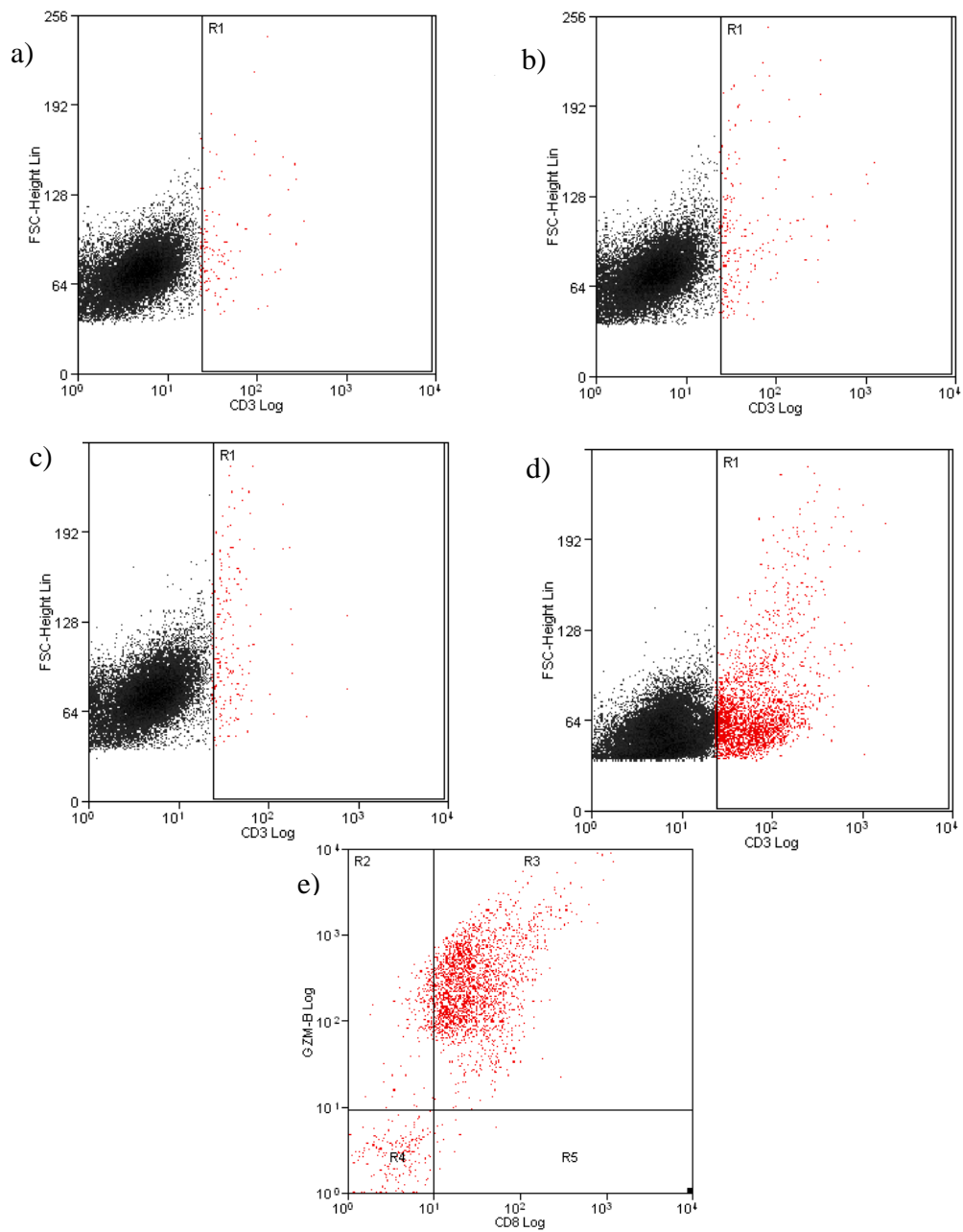


Figura 10. Dot-Plots muestra de sangre periférica, de un paciente con diagnostico reciente

En la figura 11 se muestra la calibración del blanco (11a), isotipo de chivo (11b) e isotipo de Mouse (11c), así como la selección de las células CD3 (11d) y la posterior selección de las células CD8+/GZM-B+(11e) de una muestra de medula ósea de un paciente con diagnóstico reciente (novo).

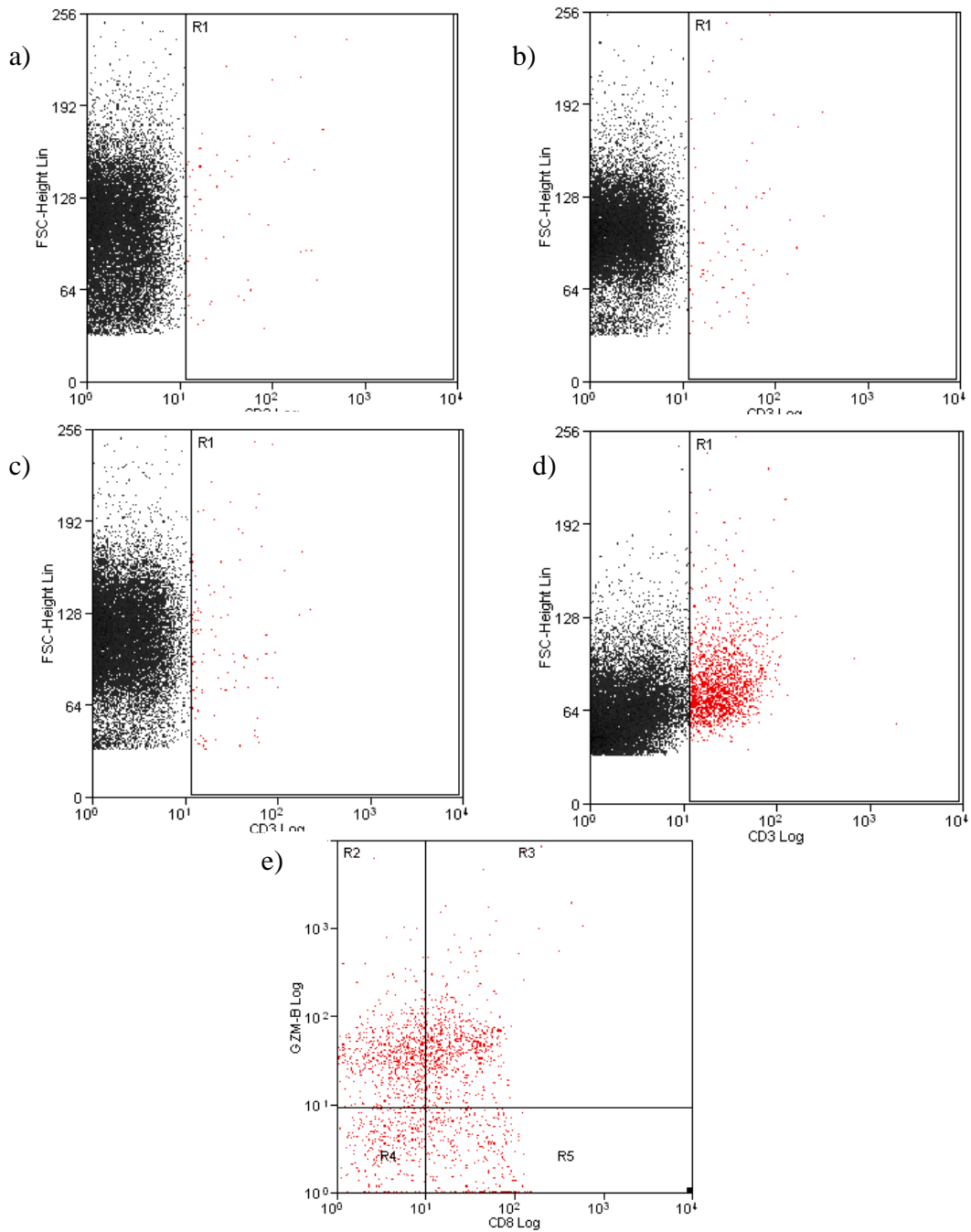


Figura 11. Dot-Plots de una muestra de medula ósea, de un paciente con diagnostico reciente

En la figura 12 se muestra la calibración del blanco (12a), isotipo de chivo (12b) e isotipo de Mouse (12c), así como la selección de las células CD3(12d) y la posterior selección de las células CD8+/GZM-B+(12e) de una muestra de sangre periférica de un paciente con recaída.

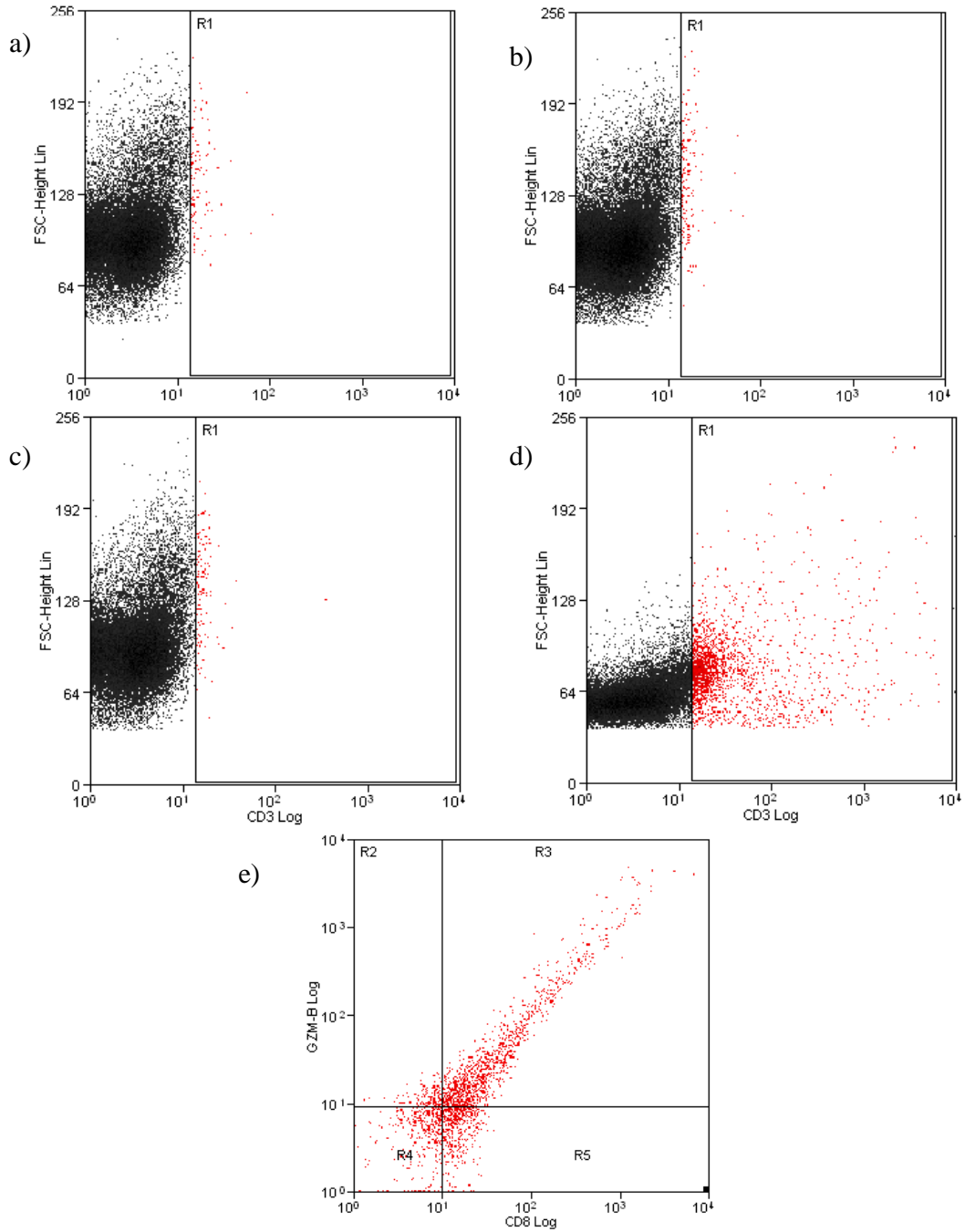


Figura 12. Dot-Plots de una muestra de sangre periférica, de un paciente con recaída

En la figura 13 se muestra la calibración del blanco (13a), isotipo de chivo (13b) e isotipo de Mouse (13c), así como la selección de las células CD3 (13d) y la posterior selección de las células CD8+/GZM-B+(13e) de una muestra de medula ósea de un paciente con recaída.

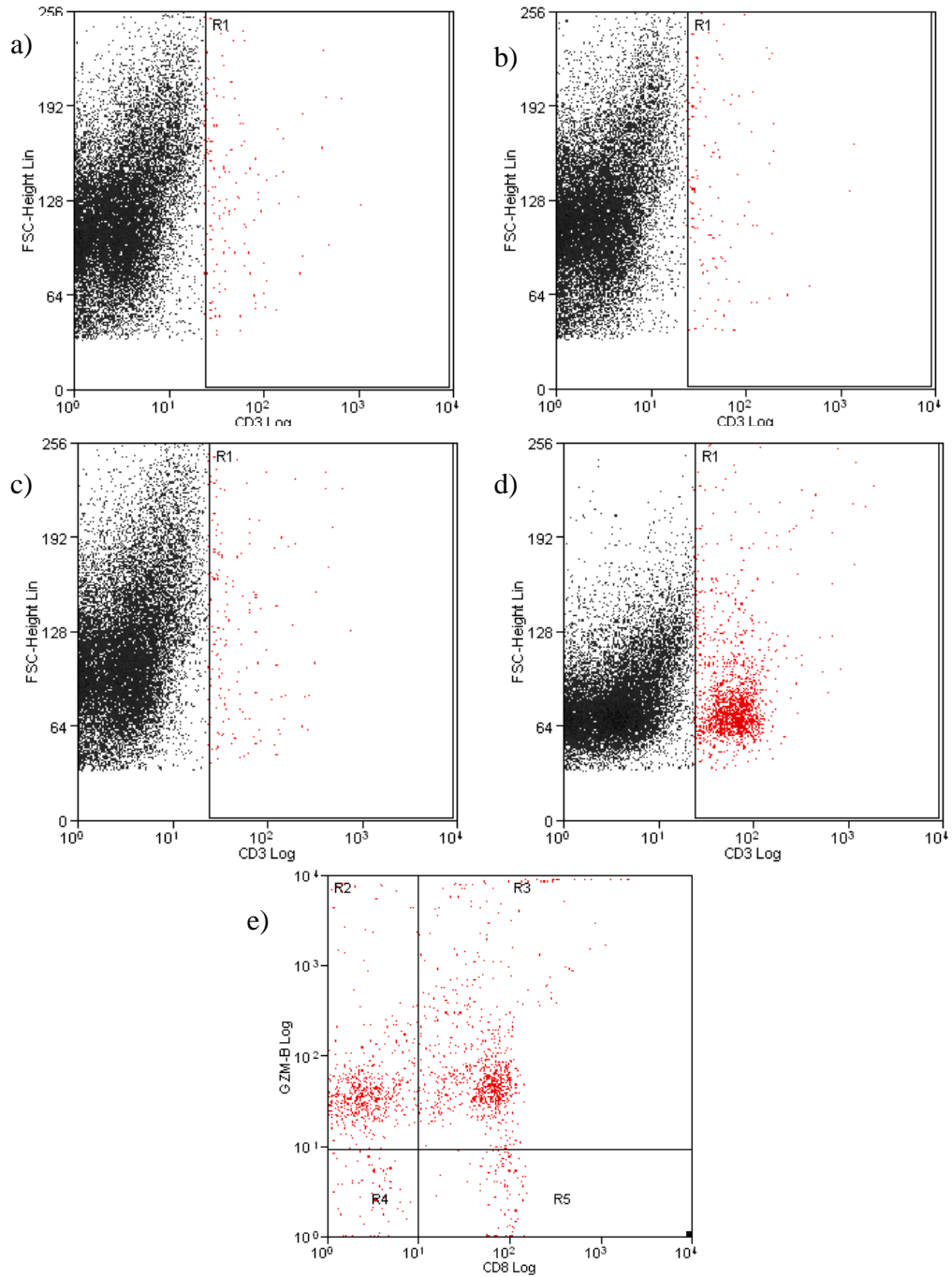


Figura 13. Dot-Plots de una medula ósea, de un paciente con recaída

En la figura 14 se muestra la calibración del blanco (14a), isotipo de chivo (14b) e isotipo de Mouse (14c), así como la selección de las células CD3 (14d) y la posterior selección de las células CD8+/GZM-B+(14e) en sangre periférica de un paciente en vigilancia.

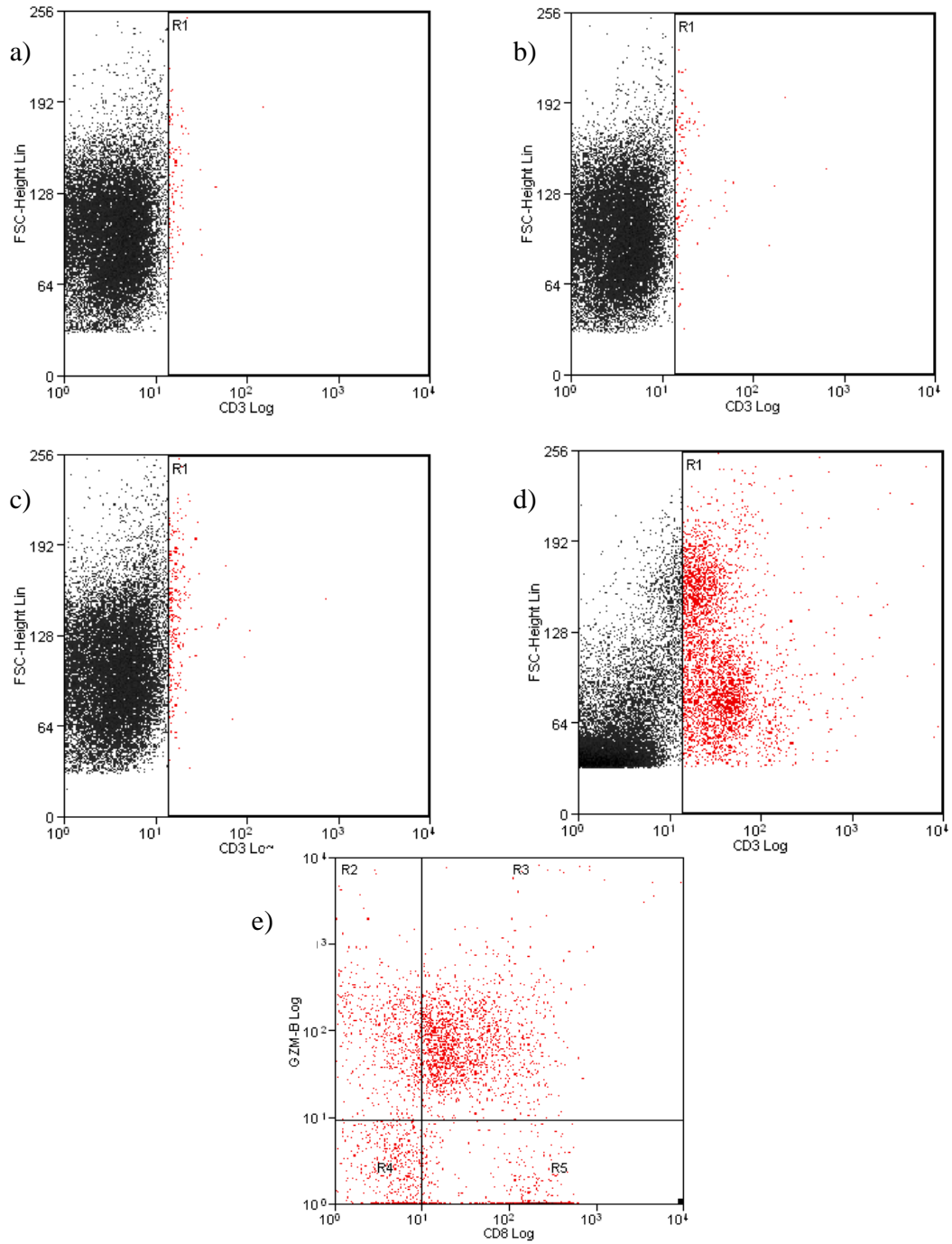


Figura 14. Dot-Plots de una sangre periférica, de un paciente en vigilancia

En la figura 15 se muestra la calibración del blanco (15a), isotipo de chivo (15b) e isotipo de Mouse (15c), así como la selección de las células CD3(15d) y la posterior selección de las células CD8+/GZM-B+(15e) de una medula ósea de un paciente en vigilancia.

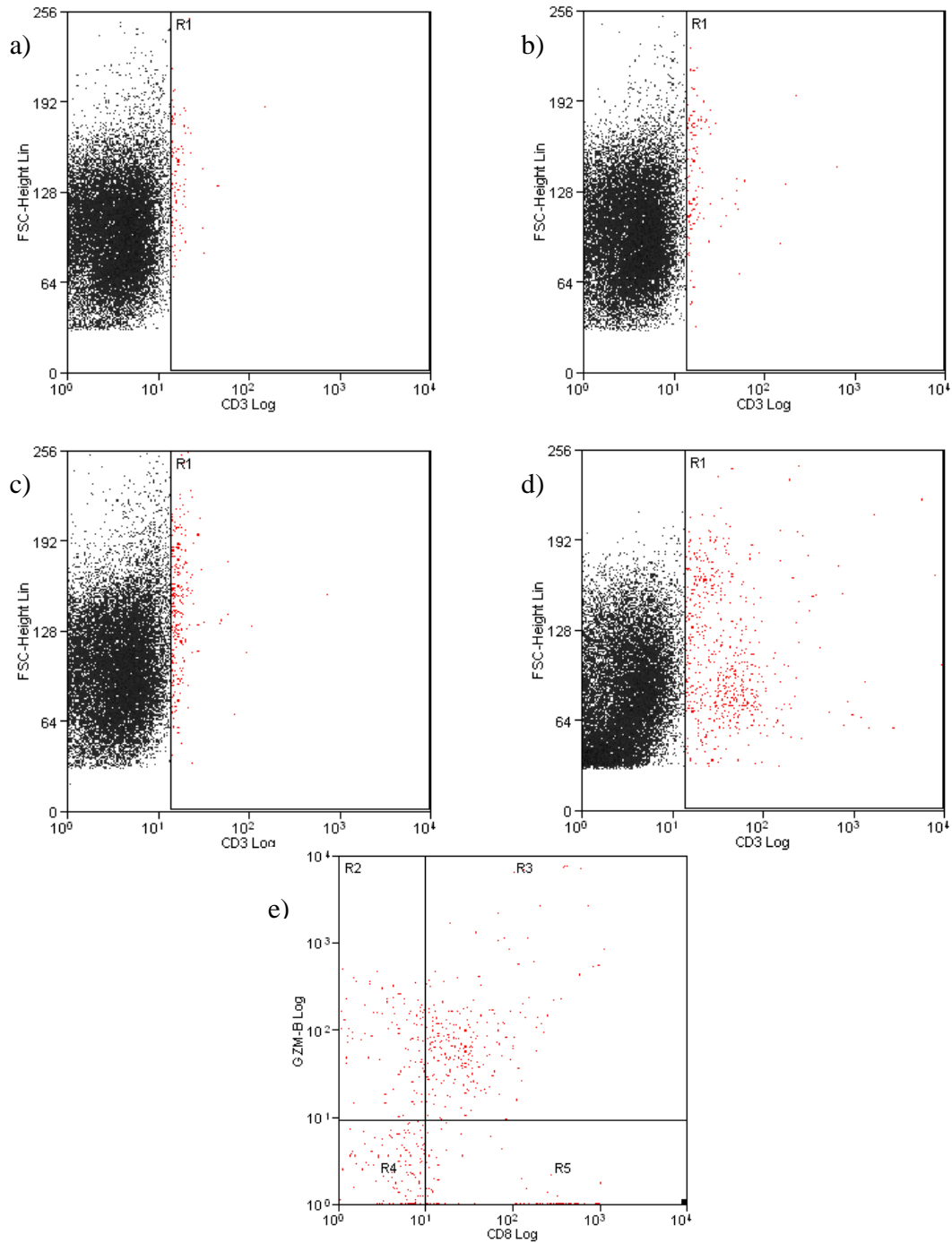


Figura 15. Dot-Plots de una medula ósea, de un paciente en vigilancia

En las figuras 10 a 15, se muestran los resultados representativos (dot-plots) de las citometrías realizadas con las muestras de sangre periférica y medula ósea de los 22 pacientes incluidos en esta tesis. El análisis de los 20,000 eventos y de la MIF de cada experimento, muestra que el promedio de células que expresan granzima B, tanto de SP como en MO no son estadísticamente significativas (tabla 9), para este análisis se aplicó (Prueba Kruskal-Wallis, valor en tablas 6.265, valor estadístico 1.84, $P > 0.005$ en SP y Kruskal-Wallis, valor en tablas 6.844, valor estadístico 2,768, $P > 0.005$ en MO). Numéricamente parecería presentar diferencias en los tres estadios de la enfermedad, sin embargo estas diferencias con las pruebas aplicadas no se validan.

	Vigilancia	Novo	Recaída
SP	1439.29 ±681.35	1475.11 ±1098.8	687 ±290.4
MO	652 ±596.85	813.4 ±288.12	527.66 ±179.78

Tabla 9. Promedio de expresión en número de células en SP y MO en los diferentes estadios de la LLA

Al comparar la expresión de granzima B entre pacientes de diagnóstico reciente, con sus muestras de MO contra las de SP y utilizando la prueba t-Student, si existe diferencia estadísticamente significativa ($t=2.196$, $P < 0.05$) (Figura 8)

Por su parte la expresión de granzima B, en MO y SP de pacientes en vigilancia y aplicando la misma prueba estadística, también presenta diferencia significativa ($t=4.480$, $P < 0.05$) (Figura 9)

En contraste, los paciente con recaída, no muestran diferencia significativa entre las muestras estudiadas, probablemente debido al tamaño de la muestra ($n=3$) (Figura 10).

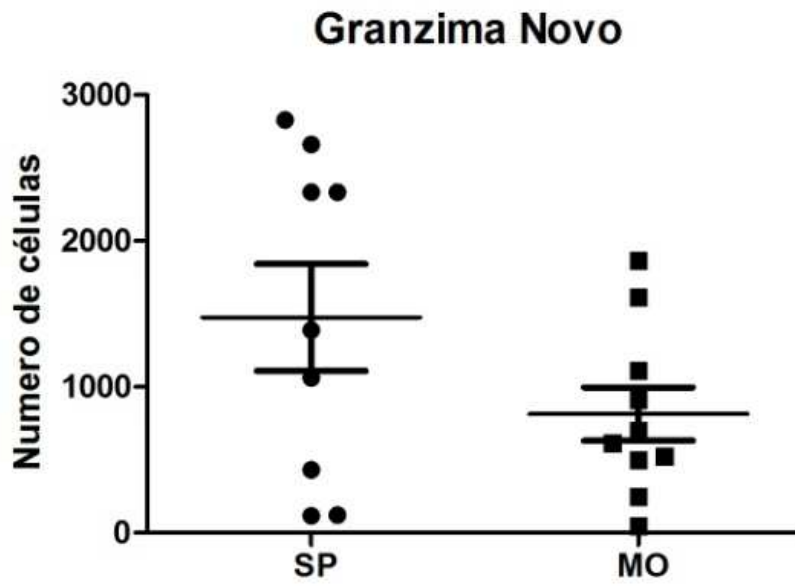


Figura 8. Número de células que expresan granzima B en pacientes en fase de recién diagnóstico

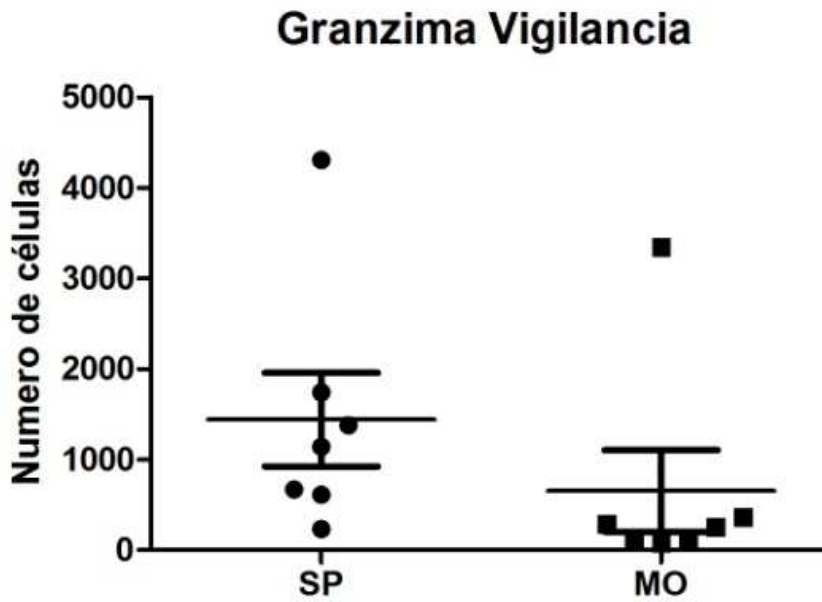


Figura 9. Número de células que expresan granzima B en pacientes en fase de vigilancia.

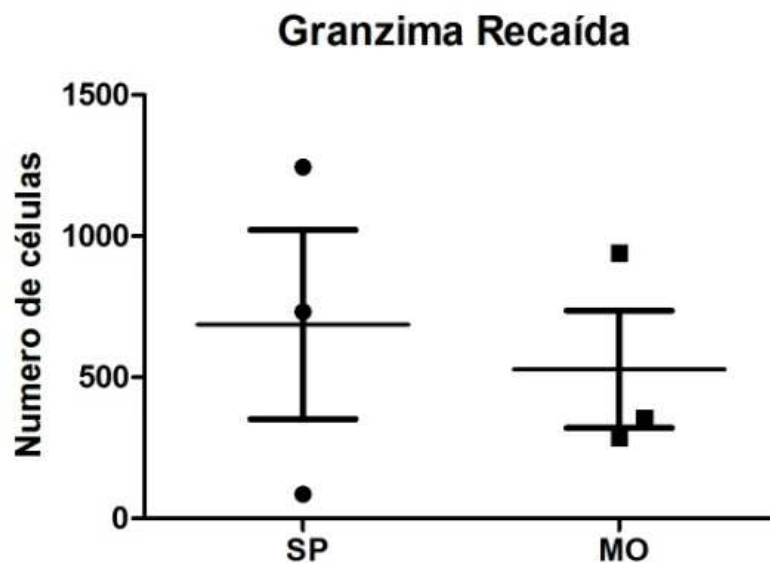


Figura 10. Número de células que expresan granzima B en pacientes en fase de recaída.

Cuando comparamos los resultados de SP y MO entre los tres grupos de pacientes: diagnóstico reciente, vigilancia y en recaída, no resultaron diferencias estadísticamente significativas; de tal forma que aplicamos estrategias diferentes en el análisis de estos resultados, como la MFI que mide la intensidad media de fluorescencia de la molécula en estudio. El promedio de la MFI de granzima B en las tres fases de la LLA en SP como en MO se muestra en la tabla 10. Hay diferencias numéricas en los tres estadios de la enfermedad; sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas (Prueba Kruskal-Wallis, valor en tablas 6.265, valor estadístico 1.432, $P > 0.005$ en SP y Kruskal-Wallis, valor en tablas 6.844, valor estadístico 1,509, $P > 0.005$ en MO).

	Vigilancia	Novo	Recaída
SP	461.04 \pm 278.72	929.54 \pm 561.9	582.27 \pm 200.8
MO	549.88 \pm 466.06	1139.21 \pm 763.07	462.48 \pm 91.56

Tabla 10. Promedio de expresión en número de células en SP y MO en los diferentes estadios de la LLA

Con la intención de demostrar la participación de la granzima B en la LLA, realizamos un análisis que denominamos de “exclusión positiva”, este análisis se fundamenta en que la expresión de la proteína en estudio, solamente se realiza en LT CD8+ y en células NK, de tal manera que al estar identificando la población CD8+, dejamos fuera del “gate” aquellas células que no expresan CD8, pero si expresan Granzima B, esta población debe corresponder a células NK y nos permitiría aproximarnos al número de células NK con expresión de granzima, lógicamente sabemos que esta aseveración no es concluyente porque no se utilizaron marcadores para definir a la población NK y además recientemente se ha reportado que una población de linfocitos “Treg” también expresan esta proteína, hechas estas consideraciones se realizó el llamado análisis por “exclusión positiva” en los diferentes estadios de la enfermedad y tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de granzima B en SP y MO (gráficos no mostrados).

Discusión

La leucemia Linfoblástica Aguda en niños mexicanos es un problema de salud con una elevada tasa de mortalidad. En esta neoplasia como en otras enfermedades hematológicas, no se conocen de manera precisa los mecanismos fisiopatológicos, como ya describí antes, el control de la apoptosis, y la respuesta inmune debe participar en el principio, el control y las recaídas que presentan estos enfermos, pero no sabemos el grado de participación y las células involucradas.

La apoptosis es uno de los mecanismos que el hombre tiene para eliminar las células que han sido infectadas por virus o que presentan alteraciones en su material genético, logrando eliminarlas sin inflamación.

Independientemente de los factores participantes en LLA, se causa una proliferación descontrolada de células linfoides, que se encuentran bloqueadas en una etapa particular de su desarrollo, y que al multiplicarse dan origen a una colonia de células diferentes tanto en sus funciones como en su estructura; que se reproduce rápidamente, invaden y destruyen los tejidos normales; lo cual nos indica que uno de los factores involucrados en la patogénesis, es la posible alteración en el control de la apoptosis.

Las alteraciones del sistema inmunológico en LLA no han sido descritas de manera precisa, lo más probable es que se trate de la suma de alteraciones genéticas y del ciclo celular, en diferentes niveles, de variadas líneas celulares y de sus productos, de tal manera que es necesario continuar con proyectos de investigación que aclaren los mecanismos participantes en cáncer.

Los linfocitos participan activamente en el control de las neoplasias, la apoptosis, es una posibilidad, si se considera que este mecanismo elimina las células malignas por dos vías. Uno de ellos es por medio del complejo Fas/Fas-L; y el otro utiliza la síntesis de gránulos que contienen proteínas citolíticas conocidas

como granzimas y perforina ésta última, es una proteína que como lo indica su nombre forma poros en la membrana cuando se logra polimerizar.

Las granzimas son una familia de proteínas que tienen la capacidad de activar vías de muerte celular programada, (apoptosis) dependiente de caspasa o de manera independiente de estas proteínas. En particular la granzima B es una de las proteínas con propiedades citolíticas de mayor presencia, en los gránulos sintetizados en linfocitos citotóxicos CD8+, cuando se activan por medio de la interacción TCR - MHC-I de las células que han sufrido una transformación.

La identificación de granzima B en estas células, traduce que se llevo a cabo de manera correcta la presentación del péptido por el MHC-I y un apropiado reconocimiento del TCR, ya que la síntesis de estos gránulos requiere de un serie de señales que son liberadas a partir de la función de esta sinapsis, en particular la transcripción del gen de la granzima B, inicia 48 horas después de la activación de los LTc CD8+ alcanzando sus niveles máximos de expresión después de 5 días. Por lo tanto la identificación de la granzima B en LT CD8+ de LLA permite inferir que la presentación o interacción del TCR y el MHC-I se esta llevando a cabo, sin que esto permita hablar de citotoxicidad de la granzima B en las células transformadas ya que no se realizaron pruebas de citotoxicidad que nos permitiera conocer si la granzima mantenía sus propiedades en la activación de la muerte celular programada; sin embargo su cuantificación en las tres fases de la LLA nos permiten decir que, los diferentes valores de expresión de granzima B en linfocitos T CD8+ no parece tener una relación en el origen, recaída y control de esta neoplasia.

Es importante mencionar que el numero de muestras de este proyecto representa el trabajo del servicio de hemato-pediatría durante el tiempo de 1 año. Sin embargo, los individuos de la fase de recaída fueron solo 4, lo cual al compararlo con las otras 2 fases en donde contamos con un número mayor de muestras, era de esperar que al realizar los estadísticos para el análisis tanto del

número de células como de la intensidad media de fluorescencia estos valores no resultaran significativos.

Con nuestros resultados no podemos concluir de manera contundente que la muerte celular programada (apoptosis) por medio de la granzima B, esté o no relacionada, con la evolución de la LLA, ya que existe una gran cantidad de eventos biológicos que pueden estar relacionados en esta patología y que no fueron evaluados en este proyecto, estos eventos comprenden desde la correcta funcionalidad y exocitosis de la granzima, hasta mecanismos propios de autoprotección de la célula maligna que realice y provoque resistencia contra el efecto citotóxico de la granzima, evadiendo la apoptosis. Todo esto es importante por que no podemos atribuir la aparición y desarrollo de una neoplasia, a un solo proceso, esto sería ignorar la complejidad de los eventos biológicos implicados en los diferentes procesos que participan en el origen de una neoplasia, por lo tanto considero muy importante seguir trabajando sobre este tópico, con un número mayor de muestras y estudios de funcionalidad, ya que existen trabajos que reportan la vía de apoptosis perforina/granzima B alterada en las neoplasias, por ejemplo en cáncer de mama, se reporta una sobre expresión de la granzima B en correlación de una sobreexpresión de la proteína de retinoblastoma (pRB), no solo ha sido cuantificada en tumores sólidos, al igual ha sido cuantificada en leucemia mieloblastica aguda en la cual se describió que la exposición de las células leucemicas a agentes genotóxicos (radiación ionizante, aracitina y etoposide) adquieren una potente citotoxicidad dependiente de perforina/granzima B, potencialmente dirigido contra progenitores mieloides. Además es importante mencionar que en este proyecto, no se logro incluir un grupo control, el cual no presentaran ningún antecedente de neoplasia, que nos permitiera conocer la expresión de la granzima B, en un estado donde no esté alterada la función del sistema hematopoyético, este grupo no fue posible incluirlo al estudio ya que en la unidad médica donde obtuvimos las muestras, no era posible su obtención.

Con respecto a la diferencia encontrada entre los participantes de los mismos grupos novo y vigilancia hemos buscado con los datos disponibles de la

biometría hemática, alguna correlación y no se encontró y tampoco disponemos de datos clínicos en el grupo de novo que nos permitiera proponer alguna explicación. En relación a los niños que se encuentran en fase de control, se reportan sin otras enfermedades y con buenas condiciones generales, de tal manera que estas diferencias halladas parecen corresponder solo a variaciones individuales.

Conclusiones

- En niños mexicanos con LLA no existe diferencia en la intensidad media de fluorescencia (MIF) y número de células que expresan Granzima B en medula ósea y sangre periférica en ninguno de las fases (novo, recaída y vigilancia).
- La diferencia en el número de células que expresan granzima B en MO y SP de los grupos de novo y vigilancia, probablemente corresponden al necesario proceso de recirculación que atraviesan los linfocitos T, posterior a su maduración encontrándose una mayor cantidad de células activadas en la periferia.
- Los resultados de la expresión de granzima B, no indica de manera contundente el grado de participación de esta proteína en la LLA

Perspectivas

- Aumentar el número de participantes en el grupo de pacientes en recaída, para así poder tener un mejor entendimiento de la LLA.
- Agregar un grupo control de pacientes sanos y un grupo de pacientes que presente una respuesta favorable al tratamiento de la LLA.
- Evaluar la presencia de las células NK por medio de anticuerpos monoclonales específicos como CD3, CD56, CD16, en la LLA.
- Analizar in situ, el origen y maduración de las células T citotóxicas, para así tener una visión más clara del posible origen y desarrollo de la LLA

Referencias

1. Tirado-Gomez LL. and Betacourt MA., Epidemiologia de las neoplasias Hemato-Oncologicas. *Cancerologia*, 2007: p. 109-120.
2. Basso G, Case C, and Dell'Orto MC, Diagnosis and genetic subtypes of leukemia combining gene expression and flow cytometry. *Blood Cells, Molecules, & Diseases*, 2007. 39: p. 165-168.
3. Schumacher HR, et al., Acute Luekimia. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2002. 22(1): p. 153-191.
4. O'Brien MM. and Lacayo NJ., Acute Leukemia in children. *Disease Month.*, 2008. 54: p. 202-225.
5. www.salud.gob.mx, sistema nacional de información en salud (SINAIS),
6. Aifantis I, Raetz E, and Buonamici S, Molucular Pathogenesis of T-cell leukemia and lymphoma. *Nat. Rev Immunology*, 2008: p. 1-10.
7. Camós M. and Colomer D., Molecular biology in acute leukemia. *Blue series*, 2006. 8: p. 550-559.
8. Haferlanch T, et al., Modern Diagnostic in acute leukemias. *Oncology Hemetology*, 2005. 56: p. 223-234.
9. Haferlanch T, et al., Gene expression profiling fo the diagnosis of acute leukemias. *British Journal of Cancer*, 2006. 96: p. 535-540.
10. Teitell MA. and Pandolfi PP., Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Annu Rev Pathol*, 2008: p. 175-198.
11. Haferlanch T, et al., Modern Diagnostic in acute leukemias. *Oncology Hemetology*, 2005. 56: p. 223-234

12. McKenna RW, Multifaceted Approach to the Diagnosis and Classification of Acute Leukemias. *Clinical Chemistry*, 2000. 46: p. 1252-1259.
13. Virchow R. *Cellular Pathology: Lecture VIII. Blood and Lymph. Cancer.*
14. William d. and Frederick G. , *Leukemia.usa*
15. Haferlach T, et al., Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Annu Hemmatol*, 2007. 86: p. 311-327.
16. Harris LN, et al., The world health organization classification of hematological malignancies report of the clinical advisory committee meeting, Airlie house, Virginia, november1997. *Pathology*, 2000. 13: p. 193-207.
17. Beutler (2001). *Williams Hematologyl, U.S.A.*
18. Graux C, et al., Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia*, 2006. 20: p. 1496-1510.
19. Greer John P, Foerster John, et al. (2004). *Wintrobe's Clinical Hematology, U.S.A.*
20. Blom B. and Spits H., Development of Human Lymphoid Cells. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 287-320.
21. Craing FE. and Foon KA., Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008. 111: p. 3941-3967.
22. Kalem Z, et al., Flow cytometry analysis of acute leukemias. *Arch Pathol Lab Med*, 2003. 127: p. 42-48.
23. Olsen JA, et al., Acute Leukemia Immunohistochemistry- A systematic diagnostic approach. *Arch Pathol Lab Med*, 2008. 132: p. 462-475.

24. Degos Laurent, Linch David C, et al. (2000). Malignant Hematology, USA.
25. Staal FJ. and Langerak AW., Signalling pathways involved in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2008. 93: p. 493-497.
26. Matushansky I, Radparvar F, and S. Al., Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1. *PNAS*, 2000. 97: p. 14317-14322.
27. Johnson DG. and Walker CL., Cyclins and Cell Checkpoints. *Annu Rev Pharmacol*, 1999. 39: p. 295-312.
28. Malumbres M. and Barbacid M., To Cycle or Not to Cycle: A Critical Decision in Cancer. *Nat. Rev Cancer*, 2001. 1: p. 222-231.
29. King KL. and Cidlowski., Cell Cycle Regulation ana Apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 1998. 60: p. 601-617.
30. Alvarado-Moreno JA. and Mayani H., El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas. *Gac Med Mex*, 2007. 143: p. 149-161.
31. Malumbres M. and Barbacid M., Cell cycle kinase in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2007. 17: p. 60-65.
32. Jahnke U, et al., Cell Death in leukemia: Passenger protein regulation by topoisomerase Inhibitors. *BBRC*, 2007. 361: p. 928-933.
33. Catalfamo M. and Henkart Pierre., Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Current Opinion in Immunology*, 2003. 15: p. 522-527.
34. Lieberman J, The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev Immunology*, 2003. 3: p. 361-370.

35. Rudin MC. and Thompson CB., Apoptosis and Disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med*, 1997. 48: p. 267-381.
36. Barry M. and Bleackley RC., Cytotoxic T Lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev Immunology*, 2002. 2: p. 401-409.
37. Trapani JA. and Smyth MJ., Functional Significance of the Perforin/Granzyme Cell Death Pathway. *Nat. Rev Immunology*, 2002. 2: p. 735-747.
38. Voskoboinik L, Smyth MJ, and Trapani JA, Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat. Rev Immunology*, 2006. 6: p. 940-952.
39. Chowdhury D. and Lieberman J., Death a Thousand Cuts: Granzyme Pathways or Programmed Cell Death. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 389-420.
40. Andersen MH, Becker JC, and Straten PT, Regulators of Apoptosis: Suitable Targets for Immune Therapy of Cancer. *Nat. Rev Drug Discovery*, 2005. 4: p. 399-409.
41. Grossman WJ, et al., Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 2004. 104: p. 2840-2848.
42. Lord SJ, et al., Granzyme B: a natural born killer. *Immunological Reviews*, 2003. 193: p. 31-38.