



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UMAE HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA

DESCRIPCIÓN DE LA
MODIFICACIÓN EN LOS NIVELES DE
TIMIDINA QUINASA SERICA EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
LEUCEMIA AGUDA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO
DE
ESPECIALISTA EN:
PATOLOGÍA CLINICA

PRESENTA:

DRA. TERESA DEL PILAR DÍAZ LÓPEZ



ASESOR:
DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D. F

AGOSTO 2010



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.

Título:

**DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN EN LOS NIVELES
DE TIMIDINA QUINASA SÉRICA EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA**

INSTITUCIONES:

LABORATORIO CLINICO

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FÉDERICO GÓMEZ

HOSPITAL DE CARDIOLOGIA CMN SXXI

ASESOR:

DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTINEZ

FIRMA

DR. JESUS SALVADOR VALENCIA SANCHEZ
Director de Educación e Investigación en Salud
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI

DRA. NOHEMI PATRICIA CASTILLO TORRES
Titular de la Especialidad Patología Clínica
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI

DRA. TERESA DEL PILAR DIAZ LOPEZ
Residente de Tercer año de Patología Clínica
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Cardiología, CMNSXXI

DEDICATORIA:

A MI TUTORA DE TESIS: Dra. Briceida López Martínez por su paciencia y confianza depositada en mí,

1	RESUMEN	7
2	ANTECEDENTES	9
2.1	Aspectos epidemiológicos	9
2.2	Aspectos epidemiológicos de la enfermedad en México	11
3	ETIOLOGIA	12
4	HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	14
4.1	Generalidades	14
4.2	Supervivencia	14
5	FACTORES PRONOSTICOS	15
5.1	Factores pronósticos en Leucemia linfoblástica aguda	
5.2	Factores pronósticos en Leucemia mieloblástica aguda	21
6	METODOS DIAGNOSTICOS DE LABORATORIO	21
7	TIMIDINA QUINASA	22
8	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
9	OBJETIVOS	29
9.1	Objetivo principal	29
9.2	Objetivos secundarios	29
10	HIPOTESIS	29
11	METODOLOGÍA DEL ESTUDIO	29

11.1	Diseño del estudio	29
11.2	Población blanco	30
11.3	Método de muestreo	30
11.4	Criterios de selección de pacientes	30
11.5	Ensayos de laboratorio	31
11.5.1	Determinación de TK sérica	31
11.5.2	Investigación del inmunofenotipo por citometría de flujo	32
11.6	Definición operativa de las variables y su escala de medición	34
11.7	Instrumentos para la recolección de datos	35
12	DESARROLLO DEL ESTUDIO	35
12.1	Descripción de las variables estudiadas	35
12.2	Pruebas realizadas	36
12.3	Seguimiento y progresión	36
13	RESULTADOS	37
14	DISCUSION	39
15	CONCLUSIONES	40
16	BIBLIOGRAFIA	44

1.-RESUMEN

Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La timidina quinasa (TK) es una enzima celular que está involucrada en la síntesis de DNA y se ha considerado como marcador de proliferación celular en algunos tumores sólidos.

Este trabajo tiene como objetivo describir los niveles de timidina quinasa (TK) sérica en pacientes con leucemia aguda, medición realizada en suero antes del inicio de la quimioterapia de inducción.

Se estudiaron 32 pacientes con leucemia aguda (27 con leucemia aguda linfoblástica, 5 con leucemia aguda mieloblástica) a quienes se les realizó la medición de los niveles de TK sérica al diagnóstico, utilizando el inmunoensayo indirecto modificado por quimioluminiscencia (LIAISON® Thymidine Kinase).

En 12 de los 32 pacientes se hizo una segunda medición el día 14 de iniciada la quimioterapia.

Nuestros resultados mostraron que los niveles de TK sérica al momento del diagnóstico fueron de extremadamente altos y hubo un decremento considerable de estos niveles con respecto a la segunda medición.

Este trabajo de tesis es exploratorio y es la base de una línea de investigación en la que se propone estudiar a la TK en el espectro de la leucemia aguda.

2.-ANTECEDENTES

La leucemia aguda (LA) se define como la proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en una estirpe celular con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos. En las leucemias agudas la población celular predominante esta formada por células inmaduras (blastos).¹

2.1.-ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA ENFERMEDAD

La LA constituye del 25 – 30% de todos los canceres en la infancia. Esta enfermedad constituye el 97% de todas las leucemias de la infancia y esta clasificada de la siguiente forma:

- Leucemia linfoblástica aguda (LLA) 75%
- Leucemia mieloblastica aguda (LMA) 20%
- Leucemia indiferenciada aguda <0.5%

-Leucemia aguda de linaje mixto

La leucemia mieloide crónica constituye el 3% de todas las leucemias de la infancia.

La incidencia anual de LA en Estados Unidos es de 3 – 4 casos por 100,000 niños en la población blanca. Existe un pico de incidencia de los 2 a los 5 años de edad.²

2.2.-ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA ENFERMEDAD EN MÉXICO

Un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría durante el periodo de 1980-1995 informa que las leucemias de origen linfoide son las más frecuentes en la edad pediátrica y se presentan en el 81.6% de los casos.³

4

Diagnóstico	Instituto Nacional de Pediatría %	Estudio multicéntrico en México %	USA %
Leucemia aguda	35	34.4	30
Linfoma	16	19.5	13
Retinoblastoma	12	8.5	3
Tumores de sistema nerviosos central	10	10	19
Tumores óseos	6	6.5	5
Tumores renales	5	5.6	6
Tumores de células germinales	3	5.1	-
Histiocitosis	3	1.5	-
Sarcomas	3	4.8	7
Neuroblastoma	2	2.7	8
Otros	5	1.4	9

Tabla 1 frecuencia de neoplasia en pacientes menores de 15 años

En la Ciudad de México representan alrededor del 40% de todas las neoplasias, mientras que en otros países constituyen entre el 30 y 34%, de 1982 a 1991 en la Ciudad

de México se observó un incremento importante en la incidencia de las leucemias agudas, en 1982 se reportó una tasa de incidencia de 7.75 por millón de niños menores de 15 años y para 1991 se alcanzó una tasa de 22.19 por millón, en el Instituto Mexicano del Seguro Social se encontró una frecuencia de 34 por millón entre 1993 y 1994 y entre 1996 y 1998 incrementó a 60.3 por millón

3.-ETIOLOGIA

La etiología de la LA es desconocida, sin embargo, se reconocen factores importantes en su patogénesis como son: la radiación iónica, ciertos químicos como los derivados del benceno. Se han identificado pocos factores que estén relacionados con un aumento en el riesgo de Leucemia aguda linfoblástica (LAL). Entre los factores de riesgo no genéticos primarios aceptados son la exposición prenatal a los rayos X y la exposición postnatal a altas dosis de radiación.⁵ También existen consideraciones genéticas como la estrecha asociación de las LLA y algunas traslocaciones cromosómicas (t 12:21 en el 25 de las LLA pre B) la frecuencia de leucemia aguda es mayor en los familiares de pacientes con LA, Por otro lado,

determinadas enfermedades genéticas cursan con mayor incidencia de LA (síndrome de Down, Klinefelter, neurofibromatosis)

Los niños con trisomía 21 tienen un aumento en el riesgo de desarrollar no solo LAL sino también leucemia aguda mieloide (LAM), con un riesgo acumulado de desarrollar leucemia de 2.1% al llegar a los cinco años de edad y de 2.7% al llegar a los 30 años.⁶

4.-HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

4.1.-GENERALIDADES

Las manifestaciones sistémicas más frecuentes son: Fiebre (60%), adinamia (50%), síndrome anémico (40%). Una vez establecida la invasión en medula ósea, con frecuencia se presenta anemia, manifestada por taquicardia, y en algunas veces insuficiencia cardiaca congestiva. La neutropenia puede condicionar la predisposición a infecciones, la aparición de úlceras en la mucosa oral y la trombocitopenia se evidencia por el sangrado que va desde el sangrado en membranas mucosas hasta hemorragia intracraneal.⁷ De uno a 2% de los pacientes presentan inicialmente pancitopenia que puede ser erróneamente diagnosticada como una anemia aplásica o disfunción medular (que representa el 5% de la anemia aplásica adquirida) y finalmente se llega a desarrollar leucemia aguda. En estos casos la enfermedad se caracteriza por pancitopenia o citopenia de una sola línea, medula ósea hipocelular, no presentan hepatoesplenomegalia y el diagnóstico finalmente se hace uno a nueve meses después del inicio de los síntomas.

4.2.-SUPERVIVENCIA

Entre los niños con LLA, más de 95% presentan remisión y 75% a 85% sobreviven al menos cinco años sin recaídas después del diagnóstico, con tratamientos actualizados que incorporan terapia sistémica (por ejemplo, quimioterapia combinada) y terapia preventiva específica al sistema nervioso central (por ejemplo, quimioterapia intratecal con radiación craneal o sin esta). En la leucemia aguda mieloide entre 75% y 85% de los niños que la padecen logran una remisión completa luego de recibir la quimioterapia de inducción adecuada. Los niños con LMA recientemente diagnosticada tienen una tasa de supervivencia a 5 años libre de eventos que se aproxima al 50%⁸

5. FACTORES PRONOSTICOS

5.1.- FACTORES PRONÓSTICOS EN LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA

Se han factores asociados al pronóstico de los pacientes por que se sugiere a los clínicos se consideren los siguientes puntos: EDAD. Inicialmente se describió

por el grupo cooperativo pediátrico CCG (por sus siglas en inglés: Childrens Cancer Group) ⁹ y el Dana Farber Cancer Institute, ¹⁰ que una edad <2 y >9 años constituía un factor de mal pronóstico, sin embargo estas investigaciones excluyeron la presencia de masa mediastinal-síndrome linfomatoso. En el Instituto Nacional de Pediatría¹¹ en un análisis prospectivo de 10 años se corroboró la observación del grupo cooperativo POG (por sus siglas en inglés: Pediatric Oncology Group) y el St. Jude's Children's Research Hospital, en los cuales se ha determinado como desfavorable una edad <1 y >10 años. (Figura 1)

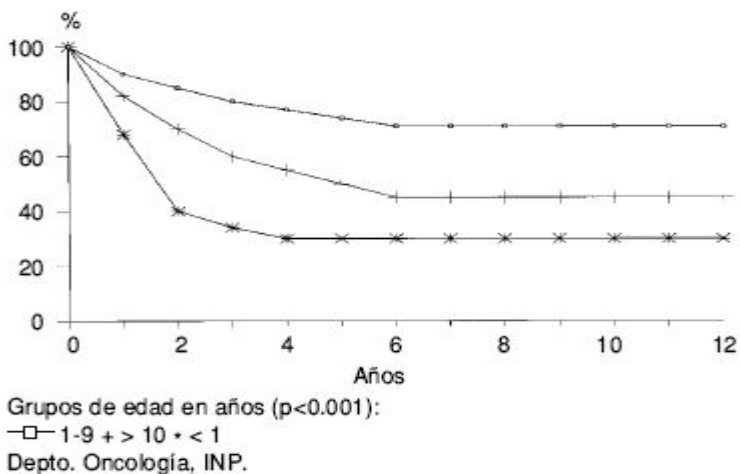


Figura 1. Supervivencia libre de enfermedad por grupos de edad en niños con leucemia aguda linfoblástica. Tomado de Rivera-Luna (2000).

SEXO Ser masculino es un factor para menor sobrevida libre de enfermedad por el riesgo de infiltración testicular. Esto quedó señalado en el estudio de Shuster y cols (1998) después de que evaluaron 3,717 pacientes pediátricos con LAL pre-B, donde demostraron que la sobrevida libre de enfermedad en niños fue 38% menor que en las niñas a los 2 y 5 años del diagnóstico.¹²

CITOMETRÍA HEMÁTICA La cuenta de leucocitos es un factor de gran importancia al momento del diagnóstico ya que en los estudios del grupo cooperativo CCG y el POG concluyeron que una cuenta de leucocitos total en sangre periférica al diagnóstico por debajo de 50,000/uL constituye un factor de pronóstico favorable, por arriba de esta cifra, además de ser un factor desfavorable se suele asociar a edad desfavorable (<1 año y >10 años). Para pacientes con hiperleucocitosis (>100,000/ \square L) la sobre vida es aun más reducida.

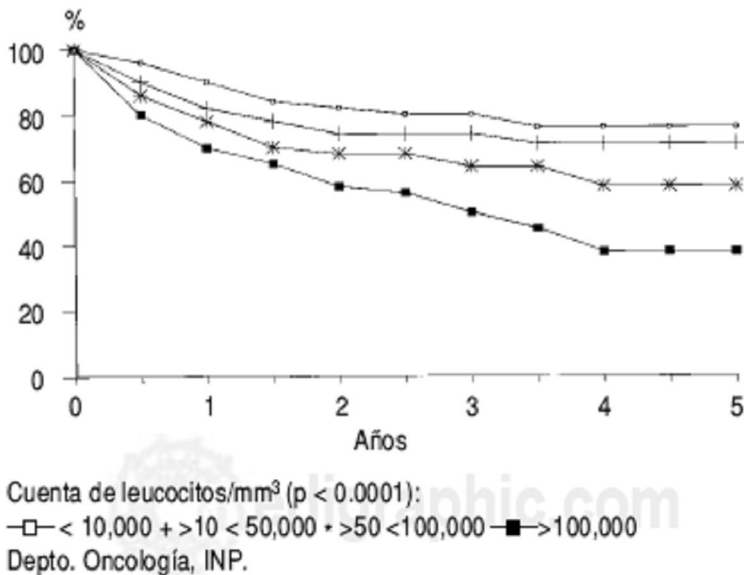


Figura 2. Sobrevida libre de enfermedad en niños con leucemia aguda, linfoblástica y cuenta de leucocitos al diagnóstico. Tomado de Rivera-Luna (2000).

Serie trombocítica Una trombocitopenia <math>< 30,000/mm^3</math> es un factor desfavorable y condiciona a infiltración al sistema nervioso central.

INMUNOGLOBULINAS Los niveles bajos de IgG, IgA, e IgM al momento del diagnóstico se han correlacionado con una sobrevida corta libre de enfermedad. Específicamente, niveles bajos de IgG se asocian a respuesta deficiente al tratamiento de inducción a la remisión.¹³

ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA Se ha descrito que encontrar >5% de linfoblastos en el aspirado de médula ósea al día 14 de haber iniciado el tratamiento de inducción a la remisión, constituye un factor pronóstico predictivo desfavorable independiente de otros factores.¹⁴

INMUNOFENOTIPO Este estudio es necesario para definir el linaje de células malignas, tiene implicaciones pronósticas y terapéuticas, para su realización se utilizan anticuerpos monoclonales por citometría de flujo. En la tabla 1 se muestran las características inmunofenóticas de pacientes con LAL

Fenotipo	Expresión Antigénica	Frecuencia %	Pronóstico
Pre-B temprana	CD19, CD22 CD 79 ^a , CD10 \pm	50-60	Bueno, sin incluir pacientes con t(9;22) y t(4;11)
Pre-B	CD19, CD22 CD79a, CD10 \pm clgm	20-25	Bueno, sin incluir pacientes con t(9;22) y t(4;11)
Pre-B transicional	CD19, CD22 CD79a, CD10 \pm , clgm slgm	3-5	Bueno, sin incluir pacientes con t(9;22) y t(4;11)
Células B	CD19, CD22 CD79a, CD10 \pm clgm, slgm, slgk ó lg1	2-3	Moderado
Células T	CD3, CD7, CD5 o CD2	13-15	Malo

Tabla 1. Inmunofenotipo de pacientes con LAL. Tomado de Rivera-Luna (2000).

ÍNDICE DE ADN (ácido desoxirribonucleico) Se estudia por citometría de flujo, permite medir los linfoblastos que se encuentran en fase "S" del ciclo celular. Si el índice es >1.6 se dice que el paciente tiene hiperdiploidía (>50 cromosomas) y esto es un buen pronóstico ya que hay mayor sensibilidad a agentes quimioterapéuticos fase-específicos. Si el índice es <1.6 se dice que hay

hipodiploidía (<45 cromosomas). El peor pronóstico lo presentan los pacientes cercanos a la haploidía.

5.2.-FACTORES PRONOSTICOS EN LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA

Los factores pronósticos de la LMA son menos claros que la LLA, entre ellos se menciona la edad, la cuenta leucocitaria, alteraciones citogenéticas como t(8:21) o inv 16, el sexo femenino con el mejor pronóstico, enfermedad extramedular, la clasificación según la FAB.¹⁵ Los protocolos pediátricos contemporáneos eficaces de la LMA se acompañan de tasas de remisión completa de 75 a 90%. De aquellos pacientes que no entran en remisión, alrededor de la mitad tiene leucemia resistente y la mitad muere de las complicaciones propias de la enfermedad o se su tratamiento.

6.-METODOS DIAGNOSTICOS DE LABORATORIO EN LEUCEMIA AGUDA.

El diagnóstico de LAL se establece por medio de aspirados de médula ósea en donde se evalúa la citomorfología, se ha establecido que más del 30% de las

células nucleadas de la médula ósea deben ser blastos para establecer el diagnóstico (Bernácer, et al, 1985). Otro hallazgo fundamental es el incremento en la cuenta de leucocitos en sangre (entre 10 y 200 leucocitos/10⁹/L), con claro predominio de elementos celulares inmaduros (Bernácer, et al, 1985, Ruíz-Argüelles, 1994). La clasificación más recomendable que se puede llevar a cabo es la que incluye criterios citomorfológicos, inmunológicos y citogenéticos según las recomendaciones de la asociación Franco Americana Británica.

7.-TIMIDINA KINASA

La timinidina quinasa (TK por sus siglas en inglés: thymidine kinase) es una enzima celular que está involucrada en la síntesis de DNA. La TK es activada en la fase G1/S del ciclo celular. El DNA se forma siguiendo una de dos posibles vías: 1) de novo y 2) vía secundaria, en la cual la TK cataliza la conversión de desoxitimidina (dT) a desoxytimidina fosfato (dTMP). La reacción catalizada por TK es llamada vía de salvamento, ya que utiliza dT exógena o endógena como sustrato. La actividad de la TK

sérica en pacientes con cáncer se considera que refleja la actividad proliferativa del tumor.¹⁶

La TK se forma en las células antes de la división celular y es considerada un indicador de proliferación celular.¹⁷ Las células de mamíferos contienen al menos dos isoenzimas de TK. TK1 constituye el 95% de la actividad de esta enzima encontrada en la mayoría de las situaciones normales o patológicas.¹⁸

Desde la introducción de TK sérica, se han investigado sus niveles en una variedad de neoplasias. Ha sido utilizada en el diagnóstico y clasificación de masas tumorales y proliferación celular antes del tratamiento de varias neoplasias hematológicas. La TK se emplea para evaluar la respuesta al tratamiento y en la monitorización de la remisión o la exacerbación de la enfermedad.

En un grupo de pacientes con Leucemia linfocítica crónica (LLC) temprana se realizó un análisis de regresión múltiple por etapas, solo tres parámetros proporcionaron información pronóstica independiente sobre la supervivencia libre de progresión: TK por arriba de 7.0U/l, la presencia de

linfadenopatía, y el conteo de leucocitos mayor a 75 000 uL. Entre los pacientes en estadio A, aquellos con valores de TK mayor de 7.0U/l tuvieron una supervivencia libre de progresión de 8 meses, mientras que los pacientes con s-TK menor de 7.0U/l tuvieron una supervivencia libre de progresión de 49 meses, similar al grupo de LLC (42meses). El estudio sugiere que la determinación de los niveles de TK podría mejorar el abordaje del pronóstico individual en pacientes con LLC temprana.¹⁹

TK EN LEUCEMIA AGUDA En la LAM, se ha encontrado que los niveles séricos de TK pretratamiento están elevados y correlacionan con la cuenta de leucocitos, los blastos y los niveles de deshidrogenasa láctica (DHL). Además se ha encontrado que TK está más baja en pacientes que alcanzaron una remisión completa.^{20 21}

Un estudio reciente de 81 pacientes con LMA mostró que 67% alcanzaron una remisión completa. Un valor inicial de s-TK de más de 300U/l parece tener un valor pronóstico significativo para predecir una remisión completa. Usando un análisis de regresión múltiple, la edad y los niveles pretratamiento de TK fueron los únicos

factores predictivos independientes de sobrevida. Entre los pacientes con un nivel inicial de TK de 300U/l o menos, el tiempo de sobrevida promedio fue de 18 meses comparado con 4 meses, de aquellos con niveles superiores. Una cuenta alta de leucocitos, niveles altos de DHL y TK se encontraron como predictores de un pronóstico desfavorable. Entre estos, TK parece ser el predictor más significativo de los resultados del tratamiento. Pacientes con valores iniciales de TK bajos, tuvieron un pronóstico relativamente bueno.

En un estudio realizado por Votava y Cols.²² En el que incluyó 38 niños con leucemia aguda (34 linfoblástica y 4 mieloblásticas), se determinó la TK antes de iniciar el tratamiento y por lo menos dos veces durante el seguimiento, los niveles de TK pretratamiento fueron altos (rango 78-5826 U/l, media 403 U/l, normal <8U/l), mientras que durante la remisión los niveles bajaron considerablemente (rango 5-80 U/l, media 31 U/l). Durante la recaída (5 casos), la s-TK incrementó considerablemente en un rango de 120-800 U/l. Con estos hallazgos los autores concluyeron que la elevación de TK durante el

seguimiento, es un marcador útil para reconocer estadios tempranos de recaída.

Es importante describir que no existen estudios con diseño y estructura metodológica para definir a la TK como; un marcador de proliferación tumoral, la TK como prueba diagnóstica de enfermedad residual mínima y en México no se tiene acceso a pruebas de este tipo por lo que proponemos de forma inicial en este estudio de exploración describir los datos encontrados en el suero de los pacientes con leucemia aguda en niños.

8.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leucemia linfoblástica es la causa más común de cáncer en la población infantil de México y del mundo, se ha demostrado cierta eficiencia de los agentes terapéuticos, sin embargo; el desarrollo de resistencia a fármacos por las células tumorales, la aparición de enfermedad mínima residual y el desarrollo de infecciones, ponen en riesgo el éxito del tratamiento modificando de esta forma el pronóstico de la enfermedad. Ante esta situación es evidente que la leucemia aguda es un problema importante de salud en niños, por lo que es necesario siga siendo estudiada en todo su espectro. En esta fase del proyecto nos planteamos describir las modificaciones de la TK sérica en leucemia aguda con el propósito de proponer en un futuro una prueba diagnóstica de proliferación tumoral y aplicar este biomarcador en la enfermedad residual mínima de leucemia aguda. La TK como marcador de proliferación celular permitirá proponer en un futuro herramientas de diagnóstico y pronóstico para los pacientes con leucemia aguda. Por otro lado, aplicar esta herramienta como auxiliar de diagnóstico antes y

durante el tratamiento en un laboratorio clínico, permitirá que las instituciones de salud con limitación en los recursos económicos y humanos puedan implementar de forma rápida y segura esta prueba.

9.-OBJETIVOS

9.1.--OBJETIVO PRINCIPAL:

Describir los niveles de TK sérica en pacientes con LA.

9.2.--OBJETIVOS SECUNDARIOS

Describir los niveles de TK en leucemia aguda linfoblástica

Describir los niveles de TK en leucemia aguda mieloblástica

Describir los cambios en los niveles de TK sérica en la evolución de la enfermedad

10.-HIPOTESIS

La TK es un marcador de proliferación celular

11.-METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

11.1-DISEÑO DEL ESTUDIO

Para la realización de esta tesis ha llevado a cabo un análisis descriptivo, longitudinal y ambispectivo, de la siguiente población de pacientes.

11.2.-POBLACIÓN BLANCO

Pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda sin tratamiento previo que acudan al hospital Infantil de México Federico Gómez, al Hospital de la niñez Oaxaqueña y al Hospital de especialidades del ISSEMYN del estado de México.

11.3.-METODO DE MUESTREO

Muestreo de casos consecutivos en toda la población accesible de mayo del 2009 a mayo 2010

11.4.-CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes menores de 18 años de edad que cumplan con los criterios oncológicos para diagnóstico de leucemia aguda
- Sin tratamiento previo

- Que acepten participar en el estudio

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes con leucemia aguda secundaria a quimioterapia

- Que no acepten participar en el estudio

11.5.-ENSAYOS DE LABORATORIO

11.5.1.-DETERMINACIÓN DE TK SERICA

El ensayo utiliza una reacción enzimática inicial en la que la TK de la muestra convierte el AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina) en AZTMP (3'-azido-3'-desoxitimidina monofosfato), tras lo cual se practica un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa del AZTMP. La cantidad de AZT convertida en AZTMP es una medida de la cantidad de TK presente en la muestra. En el ensayo, 50 µl de la muestra se incuba con 100 µl de tampón de ensayo 1, 20 µl de tampón de ensayo 2 y 20 µl de partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos policlonales anti-AZTMP. La fase sólida se reviste con IgG de conejo anticabra y después con anticuerpos policlonales

anti-AZTMP de cabra. El resultado se incuba durante 40 minutos y después se le agrega 100 µl de trazador, un análogo del AZTMP conjugado con un derivado de isoluminol. Durante la primera incubación, el AZTMP se une a la fase sólida. En la segunda incubación, el trazador conjugado compete por unirse con el AZTMP en la solución. Tras una incubación de 20 minutos, el material libre se elimina con un ciclo de lavado. A continuación se agregan los reactivos iniciadores y tiene lugar una reacción quimiluminiscente rápida. La señal luminosa se mide en unidades lumínicas relativas con un fotomultiplicador y es proporcional a la concentración de TK presente en calibradores, controles o muestras.

11.5.2.-INVESTIGACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo es un proceso que permite que las células (500 – 4000/ seg) pasen en fila dentro de un flujo a través del. Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la capacidad de hacer mediciones

cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia. Al mismo tiempo, es posible separar las poblaciones definidas por éste análisis. Estas ideas son la base de la técnica conocida como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).²³

El FACS proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. Para llevar a cabo lo anterior, el equipo tiene un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal

óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora.²⁴

El análisis del inmunofenotipo se hace mediante la identificación y cuantificación de distintas poblaciones celulares en base a la expresión diferencial de marcadores de membrana empleando anticuerpos monoclonales antígeno-específicos marcados con fluorocromos.²⁵

11.6.-DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES Y SU ESCALA DE MEDICION

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL
<i>Independientes</i>		
Edad del niño	Cuantitativa continua	Número de años al momento del diagnóstico de Leucemia
Clasificación inmunológica de las leucemias según la FAB	Cualitativa ordinal	En las linfoblásticas (L1,L2 y L3) En las mieloides característica morfológica de los blastos en el aspirado de médula ósea (existen 8 subtipos, del 0 al 7).
<i>Dependientes</i>		
TK Timidina quinasa	Cuantitativa continua	Enzima de replicación del DNA que se mide por quimioluminiscencia en U/L

11.7.-INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCION DE DATOS

En una base de datos se registro la información de las muestras recibidas de casos consecutivos que cumplieron los criterios de inclusión así como los resultados de fenotipo por citometria de flujo se obtuvieron de la base de datos del instrumento utilizado B.D. FACS Calibur, datos que se utilizaron para clasificar el tipo de leucemia. Los resultados de las mediciones de TK se obtuvieron de la base de datos del software de Liasion de Diasorin en dos corridas que se realizaron un de tiempo de tres meses. Previo a la medición de la TK en el suero de los pacientes, se realizo la estandarización de la misma durante 2 meses y antes de cada medición se realizo la verificación del control de calidad analítico interno en el equipo.

12.-DESARROLLO DEL ESTUDIO

12.1-DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

Distribución de los pacientes por sexo

Distribución de los pacientes por edad, realizada en cuatro categorías:

De 1- 4 años, 5 a 8 años, 9 a 12 años y 13 a 16 años.

Diferenciación entre el linaje celular afectado:

Leucemia aguda linfoblástica B.

Leucemia aguda linfoblástica T.

Leucemia aguda mieloide.

12.2.-PRUEBAS REALIZADAS

Se hicieron mediciones de la TK sérica de muestras tomadas antes del inicio de la inducción a la remisión en 32 pacientes

Se registró el análisis del inmunofenotipo por medio de citometro de flujo para cada una de las muestras enviadas

12.3.-SEGUIMIENTO Y PROGRESIÓN

Se realizaron análisis de niveles TK en muestras de 32 pacientes antes del inicio de la inducción a la remisión y una segunda medición de TK en 12 pacientes al día 14 de la inducción.

13.-RESULTADOS

Se estudio un grupo de 32 pacientes con leucemia aguda, de los cuales 27 son de LAL y 5 con LAM (Tabla 1), de estos 62.5% fueron del sexo femenino y 37.5% del masculino (Tabla 2), la edad media de los pacientes fue de 6.1 años con un rango de 1.3 años hasta los 16 (tabla 3).

La cuantificación de TK se realizo en las muestras de 32 pacientes antes de la inducción encontrando una TK sérica máxima de 3520 U/L, una mínima de 2.2 con una media de 673.9 U/L con la mediana de 88 U/L. (Grafica 1)

Se cuantifico al día 14 de la inducción a la remisión a 12 pacientes en quienes encontramos la TK sérica máxima de 405 U/L, mínima de 1.2, la media de 70.66 y una mediana de 33. (Tabla 4)

Es evidente que los niveles de TK sérica se encuentran elevados en el grupo de pacientes estudiados antes de la inducción de los cuales a 12 de 32 se realizó la medición al día 14 encontrado una disminución expresada en términos de porcentaje con un rango de 4.23% a 99.9%

14.-DISCUSION

Las series generales de distribución de LA en la población pediátrica hablan de una frecuencia de 75% para la LLA y de 20% para la LMA similar a la de nuestro estudio

En cuanto a la distribución por edades, es conocida una mayor incidencia en el grupo de edad 2 y 5 años muy similar a la encontrada en nuestra serie.

Aunque el numero de pacientes fue limitado en este estudio, se ha descrito en los resultados la elevación de la TK sérica relacionada con los valores de referencia reportados, estos datos son la base de futuras investigaciones relacionadas con los niveles de TK sérica y el tipo de estirpe afectada, así como la asociación de supervivencia libre de enfermedad y la utilidad de clínica de la TK sérica en la investigación de enfermedad residual.

15.-CONCLUSIONES

El abordaje terapéutico de las LA pretende seguir lineamientos derivados de la evidencia científica disponible, sin embargo la forma de abordaje se ve influenciada por múltiples factores como a la accesibilidad a las metodologías diagnósticas y la aun poco estandarizada utilidad de biomarcadores emergentes. Información que se vera reflejada en el seguimiento de los pacientes y en la supervivencia global de los pacientes con leucemia aguda.

Nuestros resultados mostraron que los niveles de TK sérica antes de la inducción tienen un incremento importante, que puede considerarse como un marcador de proliferación celular, sin embargo es necesario incrementar el tamaño de muestra y establecer el diseño metodológico de una prueba de diagnóstico como marcador de proliferación.

-Se requiere de la conclusión de las siguientes fases de esta línea de investigación donde se incluirá un mayor número de pacientes y se realizarán los estudios en: pruebas diagnósticas de marcador tumor, en la evaluación

de enfermedad mínima residual y para atribuir a la Timidina quinasa un valor pronostico bien establecido en los pacientes con L.A.

TABLA 1.

TIPO DE L.A	MASCULINO	FEMENINO	TOTAL
LLA	9	16	25
LMC	3	4	7
TOTAL	12	20	32

TABLA 2

SEXO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
MASCULINO	12	37.5
FEMENINO	20	62.5
TOTAL	32	100

TABLA 3.

EDAD	FRECUENCIA	PORCENTAJE
1- 4	15	46.9
5-8	7	21.9
9-12	4	12.5
13-16	6	18.7
TOTAL	32	100

GRAFICA 1
NIVELES DE TK AL INICIO Y A LOS 14 DIAS DE INDUCCION

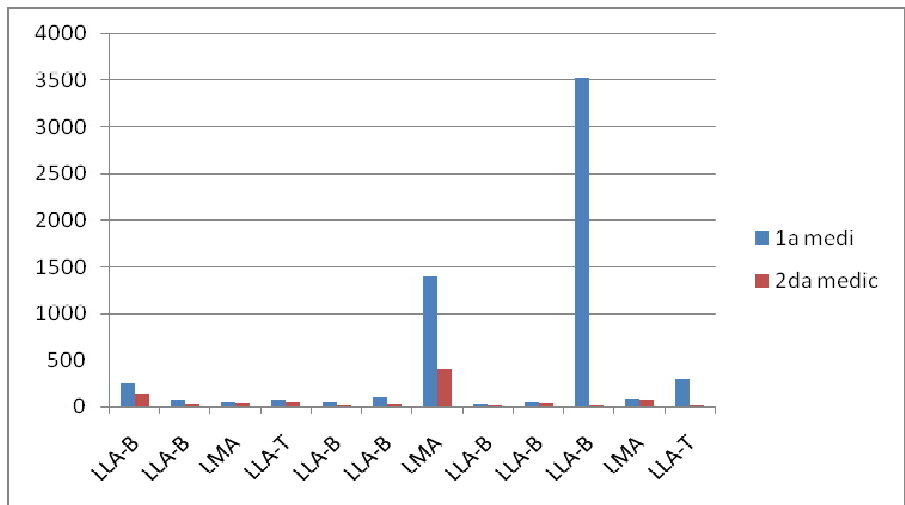


TABLA 4. DATOS DE PACIENTES CON LA Y TK

Paciente	TK U/L 1a	TK U/L 2a	FENOTIPO
1	791		LLA-B
2	85		LLA-B
3	253	134	LLA-B
4	180		LMC
5	78		LLA-B
6	594		LLA-T
7	217		LLA-T
8	2.2		LLA-T
9	81.2	22.4	LLA-B
10	1336		LMA
11	53	36	LMA
12	765		LLA-B
13	81	49	LLA-T
14	811		LMA
15	168		LLA-B
16	1678		LLA-T
17	52.5	22	LLA-B
18	3216		LLA-B
19	3036		LLA-T
20	1402	405	LMA
21	95	33	LLA-B
22	1678		LLA-B
23	750		LLA-B
24	4.3		LMA
25	30.7	17.7	LLA-B
26	53	35.9	LLA-B
27	3520	1.2	LLA-B
28	54		LLA-T
29	88	70.5	LMA
30	58.1		LLA-B
31	288	21.3	LLA-T

16.-BIBLIOGRAFIA

¹ Martin B, Beverly Kingsley and Adrienne Holmes Risk Factors for acute Leukemia in Children: A Review) Environ Health perspect. 2007 (115):138-145.

² Manual of hematology and oncology. Lanzkowsky, 4th ed, 2006.

³ Rivera Luna R, Leal Leal C, Cárdenas Cardos R, Martínez Avalos A, Meza Coria C, Navarro Alegría I, Ruano Aguilar J. A survey of 4,076 children with cancer. Certain epidemiological aspect from a single institution. Bol Med Hosp. Inf Mex. 1996; 53: 598-05

⁴ Rivera luna R. Primer consenso de leucemia aguda linfoblástica pediátrica en México. Rev Invest Clin. 1997 (49): 309-16.

⁵ Ross JA, Davies SM, Potter JD, y cols. Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. Epidemiol Rev 1994. 16(2): 243-72 [PUBMED Abstract

⁶ Hasle H: Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. Lancet Oncol 2001. 2 (7): 429-36

⁷ Beutler E, Kipps Thomas J et al. Williams Hematologia, Cap 2 P:1047-1125

⁸ Woods WG, Neudorf S, Gold S, y cols. A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission: a report from the Children's Cancer Group. Blood 2001. 97(1): 56-62.

⁹ Tubergen D, Gilchrist G, O'Brien R y cols. Improved outcome with delayed intensification for children with acute lymphoblastic leukemia

and intermediate presentig features. A Children Cancer Group phase III trial. *J Clin Oncol* 1993; 11: 527-37.

¹⁰ Hammond D, Sather H, Hesbit M y cols. Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1986; 14: 124-34.

¹¹ Rivera Luna R. La importancia de los factores pronosticos en leucemia aguda linfoblástica (LAL) de la población pediátrica en un país en vías de desarrollo. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 2000; 46(4):260-66.

¹² Billet AL, Gelber RD, Tarbell NJ y cols. Results of Dana Farber Cancer Institute-Consortium Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Protocols. *Intl J Ped Hem/Onc* 1998; 5:115-23.

¹³ Khalifa A, Take H, Cejka J y cols. Immunoglobulins in acute leukemia in children. *J Pediatr* 1974; 85: 788-95.

¹⁴ Shuster JJ, Wacker P, Pullen J y cols. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2854-61

¹⁵ Chang M, Raimondi SC, Ravindranath Y, Carroll AJ, Camitta B, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein H. Prognostic factors in children and adolescents with acute myeloid leukemia (excluding children with Down síndrome and acute promyelocytic leukemia): univariate and recursive partitioning analysis of patients treated on Pediatric Oncology Group (POG) Study 8821.

¹⁶ Hallek M, Wanders L, Strhmeyer S. Thymidine kinase a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol.* 1992;65:1-5

¹⁷ Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989; 246:603-608.

¹⁸ Gronowitz JS, Källander CFR, Diderholm H. Application of an in vitro assay for serum thymidine kinase. Results on viral disease and malignancies in humans. *Int J Cancer*. 1984; 33:5-12.

¹⁹ Hallek M, Langenmayer I, Nerl C y cols. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, non-smouldering chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*. 1999; 93:1732-37.

²⁰ Thomas Votava, Ondre Topolcan, Lubos Holubec. Changes of serum Thymidine kinase in children with acute leukemia. *Anticancer Res* 2007; 27 (4A):1925-8

²¹ Votava, T; Topolcan, O; Holubec, L Changes of serum Thymidine kinase in children with acute leukemia. *Anticancer Research* 2007. (27)4: 1925-28

²² Votava t; Topolcan O, Holubec L Jr, Cerna Z, Sasek L, Finek J, Kormunda S. changes of serum thymidine kinase in children with acute leukemia. *Anticancer Res*. 2007. 27(4A):1925-8

²³ Mc Clatchey *Clinical Laboratory Medicine*, 2nd ed 2002, Lipincott Williams

²⁴ Drago M, Zamora A, *Citometria de flujo: vinculo entre la investigacion basica y la aplicacion clinica: Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 2004; Vol. 17(1):42-55

²⁵ Fiona E, Kenneth A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 2008 (111) 8: 3491- 66.
