



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**TIMIDINA KINASA: UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA DE
PROLIFERACIÓN TUMORAL EN LEUCEMIAS AGUDAS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ

TUTOR: DR. GUILLERMO J. RUIZ ARGÜELLES

COTUTOR: M.EN C. ELISA DORANTES ACOSTA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS DEPARTAMENTOS DE HEMATO-ONCOLOGÍA, LABORATORIO CLÍNICO DEL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ Y EN EL CENTRO DE HEMATOLOGÍA Y MEDICINA INTERNA (CHMI) DE PUEBLA, INSTITUCIÓN MÉDICA ORIENTADA AL ESTUDIO, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS Y DE MEDICINA INTERNA. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. GUILLERMO J. RUIZ ARGÜELLES.



Dedico esta tesis.

A Daniel Vélez, querido esposo gracias por tu amor, por impulsar mi desarrollo académico y por tu apoyo incondicional.

A mis hijas: Daniela y Sofía por su amor y sus grandes enseñanzas.

A mi Gran Maestro: Dr. Guillermo Ruiz Argüelles: por su apoyo, su dirección y por enseñarme que la investigación debe hacerse en equipo y que puede ser libre y aplicada.

Agradecimiento Especial: A los niños y a las personas que hicieron posible esta tesis.

LISTA DE ABREVIATURAS:

ABC: Área Bajo la Curva

5-FU: 5-fluorouracilo

aGTP: Trifosfato de desoxiguanosina

ATP: Trifosfato de Adenosina

AZT: 3´Azido- 3´ desoxitimidina

AZTMP: 3´Azido- 3´ desoxitimidina monofosfato

B2M: β - 2 microglobulina

B-CLL: Leucemia linfocítica crónica de células B

LAL: Leucemia Aguda Linfoblástica

LLC: Leucemia linfocítica crónica

LAM: Leucemia Aguda Mieloide

LMC: Leucemia mieloide crónica

LNH: Linfoma no Hodgkin

MCL: Linfoma de células de manto

MGUS: Gammopatía monoclonal de importancia indeterminada

MTC: Carcinoma medular tiroideo

NDPL: Linfoma nodular linfocítico pobremente diferenciado

NH: Linfoma histiocítico

NM: Linfoma mixto (linfocítico- histiocítico)

NSE: Enolasa neuronal específica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PTC: Carcinoma papilar tiroideo

PTLP: Enfermedad linfoproliferativa

TDH: Desoxitimidina

TK: Timidina Kinasa

TS: Timidilato sintasa

WBC: Recuento de glóbulos blancos

INDICE DE FIGURAS y TABLAS.

	Página
Fig. 1. Estructura cristalina de un tetrámero de la Timidina Kinasa	8
Fig. 2. Patrón de expresión de la TK1 en el ciclo celular en el humano	10
Fig. 3. Concentración de TK1 en pacientes sin leucemia.	22
Fig. 4. Frecuencia de niños con leucemia y sin leucemia según el grupo de edad.	23
Fig. 5. Niveles de TK1 en niños sin leucemia y con LAL tipo B.	25
Fig. 6. Riesgo habitual y riesgo alto en pacientes con LAL-B.	25
Fig. 7. Niveles de TK1 en niños sin leucemia y con LAL tipo T.	26
Fig. 8. Niveles de TK1 en niños sin leucemia y con LAM.	27
Fig. 9. Valores de TK1. Área bajo la curva de niños con y sin leucemia.	27
Fig.10. Valores de TK1. Área bajo la curva de niños sin leucemia y con LAL-B.	28
Fig.11. Valores de TK1. Área bajo la curva de niños sin leucemia y con LAL-T.	29
Fig.12. Valores de TK1. Área bajo la curva de niños sin leucemia y con LAM.	29
Tabla 1. Características de los grupos de estudio	24

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
Definición de leucemias agudas y epidemiología	3
Factores de riesgo	4
Diagnóstico	5
III. MARCO TEORICO	
Marcadores tumorales	6
Timidina Kinasa (TK)	7
Estructura tridimensional de la TK1	8
Función biológica de la TK1	9
Regulación de la TK1 durante el ciclo celular	9
TK1 como prueba diagnóstica en oncología	11
IV. ANTECEDENTES	13
Timidina Kinasa en las leucemias agudas	
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
VI. JUSTIFICACIÓN	15
VII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
VIII. HIPOTESIS	16
IX. OBJETIVOS	16
X. MATERIAL Y METODOS	
Diagrama de flujo	17
Diseño del estudio	17

	17
Población blanco	18
Lugar y duración	18
Universo	18
Método de muestreo	18
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	18
Definición operativa de las variables y su escala de medición	19
Ensayos de laboratorio	20
Plan de análisis	20
Aspectos éticos	21
Condiciones de bioseguridad	
XI. RESULTADOS	22
XII. DISCUSIÓN	30
XIII. CONCLUSIONES	34
XV. ANEXOS	35
XVI. REFERENCIAS	55

I. RESUMEN

Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. En México, el cáncer es la segunda causa de muerte en la población de 1 a 15 años de edad y la leucemia aguda es el cáncer más frecuente en niños menores de 15 años. Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico y pronóstico de las LA en la infancia son necesarias para el clínico, sobre todo por el gran avance en el estudio de la biología de esta enfermedad. Estas pruebas permiten definir el riesgo y por ende dar un mejor tratamiento a los pacientes. La timidina kinasa (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, sin embargo en leucemias agudas hay poca evidencia de que pueda ser utilizado como marcador de proliferación tumoral motivo por el que en esta investigación se planteó como objetivo determinar la utilidad de la TK en sangre como marcador de proliferación tumoral en pacientes con leucemia aguda

Se trata de un estudio transversal comparativo que se realizó a partir de octubre del 2009 a mayo del 2012 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Se incluyeron un total de 125 muestras de pacientes con leucemia aguda, y a quienes se realizó el diagnóstico de acuerdo a criterios internacionales se cuantificó la TK1 en suero. Para efectos de comparación de niveles de TK1 se analizaron 138 muestras de niños sin leucemia. Se utilizó el reactivo LIAISON® Thymidine Kinase de DiaSorin41, inmunoensayo cuantitativo para la determinación in vitro de la actividad de la Timidinkinasa (TK) en suero para efectuar el ensayo en el LIAISON® Analyzer.

Del grupo de niños con LA; 90 fueron con Leucemia aguda linfoblástica de precursores B (LAL-B), 13 con Leucemia aguda linfoblástica tipo T (LAL-T) y 22 pacientes con leucemia Aguda Mieloide (LAM). Del grupo sin leucemia la media de los valores obtenidos de la TK para este grupo fue de 26.5 U/L con un desviación estándar de 13.1 con los intervalos de confianza al 95% inferior de 24.3 U/L y superior del 28.7. En el grupo de enfermos se cuantificó la timidina kinasa encontrando intervalos de 6.8 UI hasta 3520 UI con una media de 351 para el grupo de leucemia y para el grupo control intervalos de 5 UI a 53 UI una media de 30.6 UI. La diferencia de medias fue estadísticamente significativa ($P <$

0.0001). Se analizaron los niveles de TK por tipo de leucemia y en la LAL-B la media fue de 199 UI con intervalos de 6UI a 3216 UI, en la LAL-T se encontró una media de 1387UI y en LAM se encontró una media de 602 UI.

Conclusión: La timidina Kinasa es una enzima que en la LAL tipo B presenta niveles distribuidos de forma heterogénea, sin embargo en el 90% de los pacientes con LAL-T y en la LAM se incrementa de forma importante.

II. INTRODUCCION

Las leucemias agudas son la causa más común de cáncer en la población infantil alrededor del mundo. Están caracterizadas por una producción descontrolada y acumulación de células precursoras hematopoyéticas de la serie linfoide o mieloide en la médula ósea (MO).

La falta de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a sobreproducción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar normalmente.¹

La leucemia aguda (LA) es la neoplasia más frecuente en los niños y representa el 30% de los diagnósticos de cáncer en niños menores de 15 años. La leucemia aguda linfoblástica (LAL) se presenta 5 veces más que la leucemia aguda mieloide (LAM).² La LAL se presenta con una incidencia anual de 30 a 40 por millón. Aproximadamente 2,400 niños y adolescentes menores de 20 años son diagnosticados con LAL cada año en los Estados Unidos y ha habido un aumento gradual en la incidencia de LAL en los últimos 25 años. Se observa un aumento marcado en la incidencia entre niños de dos a tres años (>80 por millón por año), con tasas que disminuyen a 20 por millón entre niños de ocho a 10 años. La incidencia de LAL en pacientes de dos a tres años de edad es aproximadamente cuatro veces mayor que entre lactantes y casi diez veces mayor que entre los de 19 años. Debido a razones inexplicables la incidencia de LAL en niños blancos es mucho más alta que en los afro americanos, con una incidencia casi tres veces más alta entre niños blancos de dos a tres años que entre los negros³

En México, el cáncer es la segunda causa de muerte en la población de 1 a 15 años de edad y las leucemias agudas son los cánceres más frecuentes en niños menores de 15 años⁴ y representa la segunda causa de muerte en la población de 5 a 14 años, solo antecedida por los accidentes.⁵ 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. 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^{6,7}

El Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) reporta anualmente alrededor de 100 casos nuevos de LLA, los cuales constituyen el 34.4% de los casos de cáncer tratados. La incidencia anual promedio registrada por otros hospitales de la Ciudad de México es alta, y observaciones recientes han sugerido que un mayor porcentaje de estas leucemias son de alto riesgo en comparación con el resto del mundo⁸⁻⁹

FACTORES DE RIESGO

Se han identificado pocos factores que estén relacionados con un aumento en el riesgo de LAL¹⁰ 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.¹¹

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.¹²

Los avances en la supervivencia de los niños y adolescentes con leucemia aguda se ha logrado con el uso de nuevos tratamientos que han intentado mejorar los tratamientos disponibles. La piedra angular del enfoque terapéutico es la quimioterapia combinada administrada sistémicamente.

Al momento de diagnosticar leucemia aguda en un niño es posible distinguir quién tiene mayor probabilidad de sobrevivir a largo plazo y hasta cura, cuando son tratados con las terapias estándar disponibles de aquellos que tienen alto riesgo de falla terapéutica, recaída temprana y muerte. La importancia de tales características debe ser considerada en la selección del tratamiento apropiado para cada paciente.^{13,14,15}

DIAGNOSTICO

Los pacientes que sufren LA se presentan con síndromes hemorrágico, anémico o infiltrativo, aisladamente o en combinación. El diagnóstico de la Leucemia aguda se realiza basándose en las manifestaciones clínicas, exploración física y el estudio de extendidos de sangre periférica y aspirados de médula ósea, utilizando tinciones pancromáticas del tipo May-Grünwald-Giemsa, Wright o Romanovsky. Se acepta que se requiere igual o más del 25 % de células nucleadas de la médula ósea sean blastos para establecer el diagnóstico certero de LAL¹⁶ y 20% o más de las células nucleadas de médula ósea para definir Leucemia Aguda Mieloide.¹⁷⁻¹⁸

Existen dos esquemas comunes para clasificar la LA; son el antiguo sistema Franco-Americano -Británico (FAB) y el nuevo sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La clasificación de la FAB divide la LAL en 3 subtipos y la LMA en 8, desde el M0 al M7, basándose principalmente en la morfología de las células leucémicas y en su grado de madurez. Esto se lleva a cabo mediante un análisis de observación de las células leucémicas al microscopio óptico o mediante técnicas de inmunocitoquímica. Los subtipos de LMA han mostrado diferencias en el pronóstico y en la respuesta a terapia. Aunque la clasificación de la OMS (véase más abajo) parece ser más útil en muchos aspectos, el sistema FAB sigue siendo ampliamente utilizado.

El aspirado de médula ósea es el estándar de oro para el diagnóstico ya que con este estudio se describen criterios citomorfológicos de los blastos, pudiendo diferenciar si se trata de la serie mieloide o linfoide. En el caso de la LLA esta se clasifica en L1, L2 y L3, siendo la L1 la más frecuente y con pronóstico favorable.¹⁹

La LAM se clasifica desde el M0 al M7, basándose en el tipo de células leucémicas que aparecen y en su grado de madurez.²⁰ Esto se lleva a cabo mediante la observación de las células leucémicas al microscopio, y posteriormente se realiza el inmunofenotipo, estudio que permite definir el linaje de células malignas.

III. MARCO TEORICO

MARCADORES TUMORALES

Los marcadores tumorales son moléculas, generalmente proteicas, que se pueden detectar en el tejido neoplásico, en suero, plasma y en otros fluidos orgánicos. Funcionan como indicadores moleculares de lo que ocurre en una población celular, en un momento determinado; traducen las alteraciones en las secuencias de los genes, en sus niveles de expresión o en los cambios en la estructura de las proteínas. Pueden ser útiles para el diagnóstico del cáncer, establecer el pronóstico, seleccionar el tratamiento, seguir la evolución de la enfermedad y evaluar la respuesta terapéutica. Sin embargo, el número de los que tienen aplicación clínica es muy reducido ²¹. Los dos grandes problemas que limitan su empleo están relacionados con la sensibilidad y la especificidad. El primero es un problema técnico y, por lo tanto, superable, el segundo es un problema biológico de más difícil solución; está relacionado con la naturaleza del tumor y del marcador.

Las proteínas que se usan como marcadores tumorales tienen procedencia y funciones muy diversas. Un primer grupo son las oncoproteínas; de localización celular, específicas de cada tumor; muchas participan en la transformación maligna, especialmente en la iniciación; y algunas tienen valor patognomónico. Su eliminación posterior al tratamiento es el argumento mayor a favor de la eficacia terapéutica. Un segundo grupo incluye las oncoproteínas que intervienen de forma genérica en el desarrollo del cáncer; como las relacionadas con la actividad proliferativa, la apoptosis, la adhesión, angiogénesis y con la invasión de tejidos y metástasis. Los genes que las codifican se expresan activamente en la célula tumoral; su análisis, con técnicas cada vez más refinadas, ha permitido diseñar, en muchos tumores, un perfil que contiene información importante sobre las propiedades biológicas.^{22 23}

Una visión general de CIGNA(HealthCare Medicare Administration) indicó que la mayoría de los biomarcadores tumorales son a menudo insuficientes para diagnosticar tumores malignos por sí mismos por las siguientes razones: I) el nivel de biomarcador relacionado

con el tumor puede estar elevada en los individuos con trastornos benignos, o no elevados en individuos con enfermedades malignas, particularmente en las primeras etapas de crecimiento del tumor, II) la mayor parte de los biomarcadores relacionados con el tumor no son específicos para un tipo particular de tumor, y III) el nivel de biomarcador relacionada con el tumor puede ser elevado por más de 1 tipo de tumor. Sin embargo, ciertos biomarcadores relacionados con el tumor reflejan etapas y/o grados tumorales y por lo tanto son útiles para predecir la respuesta al tratamiento y la recurrencia, pero aún no se recomiendan para la detección de enfermedades de cáncer.²⁴ Por la poca información que se tiene de la Timidina kinasa 1 (TK1) en el diagnóstico de Leucemias agudas, se aborda su estudio como tema de esta tesis.

TIMIDINA KINASA

En el año de 1951 se demostró la incorporación de la desoxitimidina en el DNA, pero fue hasta 1956 que se descubrió su fosforilación antes de incorporarse al DNA. La reacción es catalizada por la enzima Timidina Kinasa descubierta entre 1958-60 cuando fue aislada y parcialmente purificada.

Durante los años sesenta se demostró que la Timidina Kinasa provenía de las procariotas y de diferentes especies de eucariotas, además ciertos virus codifican sus propias isoenzimas de TK. En 1967 se localizó el primer gen autosómico de la enzima Timidina Kinasa en el cromosoma.

La timidina kinasa o citosólica (ATP: timidina 5'-fosfotransferasa) pertenece a la familia de las enzimas desoxirribonucleósido cinasas, esta enzima tiene una función crucial en la vía de salvamento de las pirimidinas. En células de mamífero existen dos tipos, la expresión de TK1 citosólica es regulada durante el ciclo celular en tanto que la TK2, está localizada en la mitocondria y se expresa constitutivamente²⁵.

Estructura tridimensional de la TK1 humana

Se trata de un tetrámero que tiene una estructura monomérica completamente diferente a la de las otras desoxirribonucleósido cinasas (dNKs), porque está compuesta de dos dominios. Como se muestra en la figura 1 uno de ellos, el dominio α/β tiene un centro de 6 cadenas β plegadas en paralelo que están rodeadas por una larga α hélice y una asa flexible en uno de los lados y tres α hélices más cortas del otro lado.²⁶ En este dominio se encuentra el extremo amino, mientras que en el dominio más pequeño formado por 70-80 aminoácidos tiene el extremo carboxilo (Fig. 1). El sitio activo de la TK1 se encuentra entre sus 2 dominios, mientras que el donador del grupo fosfato se une a un sitio expuesto formado por el asa P ubicado en el dominio α/β . La alta especificidad de la TK1 por su sustrato es debida a las dimensiones de este sitio catalítico carboxilo.^{27 28}

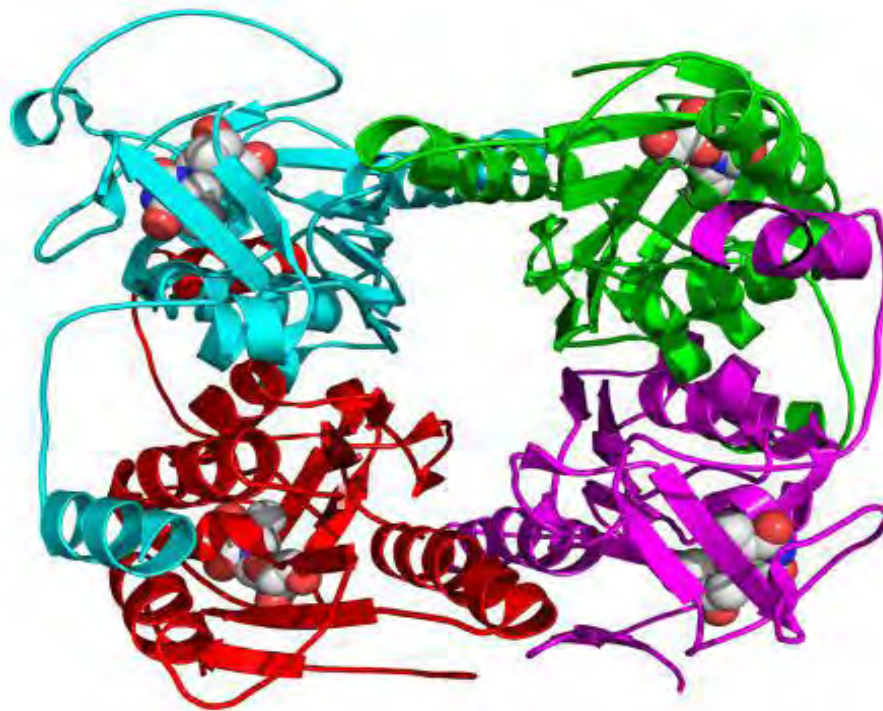


Figura 1: Estructura cristalina de un tetrámero de la Timidina Kinasa.

Función biológica de la TK1 en mamíferos

Durante mucho tiempo se consideró que la función de la timidina kinasa estaba exclusivamente asociada al proceso de replicación de DNA en fase S del ciclo celular. Sin embargo estudios posteriores mostraron que el decremento en los niveles de desoxitimidina trifosfato (dTTP) debido a la deficiencia de la TK en líneas celulares se correlacionaba con el incremento en el daño al DNA induciendo muerte celular y mutagénesis.²⁹ Estudios realizados con esta proteína apoyan la hipótesis de que la inhibición del ciclo celular es mediada por la proteína p21 afectando los niveles de TK1 en respuesta al daño a DNA en presencia de la proteína p53 funcional, ya que el arresto del ciclo celular ocurre en la transición G1/S. En cambio, en ausencia de p53 se bloquea el ciclo celular en la fase G2, permitiendo una mayor acumulación de TK1. También se encontró que la TK1 se trasloca al núcleo después de un determinado tiempo de tratamiento. La localización nuclear podría facilitar la provisión eficiente de dTTP para la reparación del DNA.³⁰

Regulación de la TK1 durante el ciclo celular.

La actividad de la TK1 está estrechamente asociada con la proliferación celular por lo que sus niveles de RNAm y proteína son regulados por múltiples mecanismos durante el ciclo celular. Los niveles RNAm y la actividad de la proteína se incrementan cuando las células entran en fase S.³¹ Es por ello que las células diferenciadas o en un estado quiescente, poseen niveles muy bajos de RNAm de la TK1 que se reflejan en los niveles de actividad de la proteína. De este modo su expresión incrementa en el arresto en la interfase G1/S del ciclo celular por daño al DNA.

La expresión de la TK1 ocurre en células que se encuentran en la fase G1 tardía e incrementa aproximadamente 20 veces en la fase S, coincidiendo con el aumento en la síntesis de DNA, en la fase G2 declina y aparece durante la mitosis (Figura 2) de una gran

numero de estudios, está claro que la regulación positiva durante la fase S de la TK1 correlaciona con la proliferación celular.³²

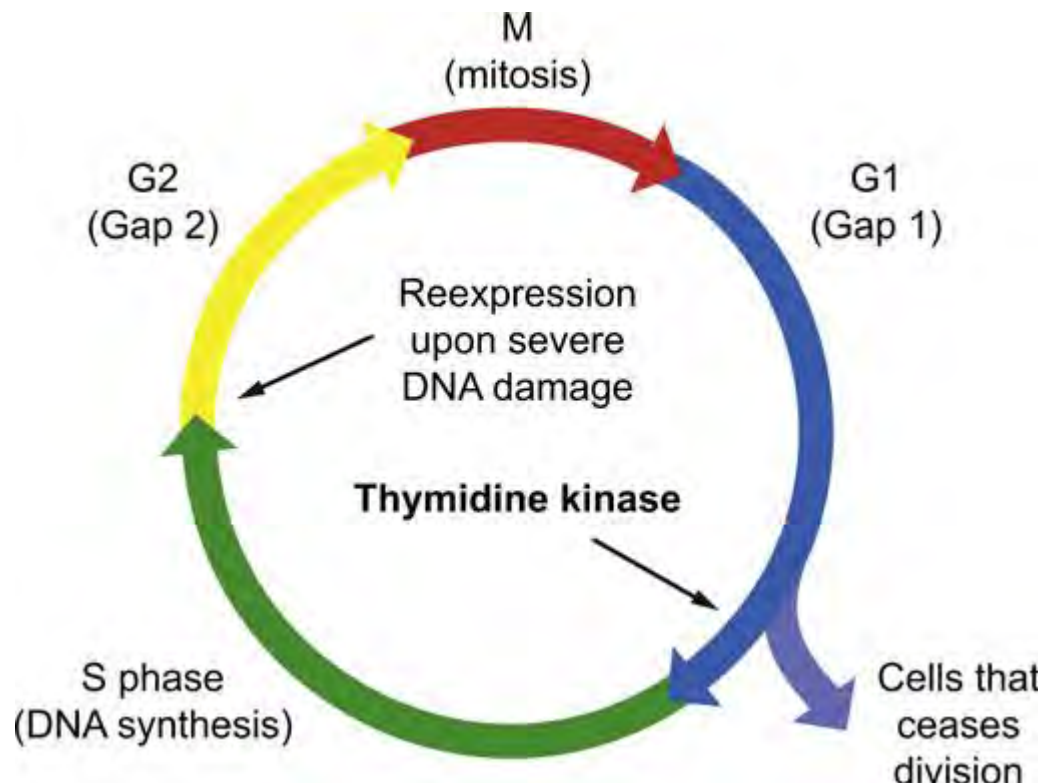


Figura 2. Patrón de expresión de la TK1 en el ciclo celular en el humano. (Tomada de Aufderklamm, 2012³³)

La actividad de la TK sérica en pacientes con tumores sólidos se considera que refleja la actividad proliferativa del tumor.^{34,35}

La TK se forma en las células antes de la división celular y es considerada un indicador de proliferación celular.³⁶ 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.³⁷

La enzima Timidina Kinasa se encuentra presente en tejido y fluidos biológicos en bajas cantidades. Timidina Kinasa también contiene isoenzimas TKI citoplasmática, TKII mitocondrial y TK viral pero desde el punto de vista de la química clínica la isoenzima más importante es la TKI citoplasmática.

Primeramente se demostró que la TKI se encontraba presente en el citoplasma en previsión de la división celular, mientras que la TKII se encontró en las mitocondrias. Los genes de ambas isoenzimas fueron localizadas en la década de 1970.

La TKI humana se compone de 234 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25.5 kDa por monómero. La actividad de TKI fluctúa con la síntesis de ADN celular, alta actividad en la proliferación de células malignas y baja actividad o nula en células en reposo. Muchas investigaciones han relacionado el crecimiento celular característico con la fluctuación de TKI en la regulación de la expresión específica en la fase S.³⁸

Los niveles de TKI son bajos cuando no hay proliferación de células, sin embargo aumenta dramáticamente en la fase G1 a finales de la fase tardía S y a principios de la fase G2 del ciclo celular en células proliferantes y células tumorales.³⁹

El mecanismo por el cual la TKI entra a torrente sanguíneo no se conoce completamente, sin embargo la evidencia experimental en la detección de niveles elevados de TKI en suero llega a ser un medio sencillo y eficaz de detección y seguimiento de enfermedades malignas. El nivel de TKI en suero de pacientes con diversos tipos de cáncer ha demostrado la correlación con el estadio de la enfermedad y las repetidas recaídas y remisiones.⁴⁰

El gen de la isoenzima Timidina Kinasa TKII se encuentra en el cromosoma 16 pero no se ha clonado por el momento. La información sobre esta enzima es limitada, en tanto la localización celular y la presencia exclusiva en mitocondrias no se aclaran por completo. La actividad de TKII es baja tanto en la división como en el reposo de las células.⁴¹

TK1 como prueba diagnóstica en oncología

Como ya se ha descrito previamente, la TK1 es una proteína dependiente del ciclo celular y por lo tanto un marcador relacionado con la proliferación celular, se ha estudiado con técnicas bioquímicas e inmunológicas durante las últimas décadas. Por lo que, TK1 es considerado como un biomarcador potencial proliferante emergente en oncología que puede utilizarse para el pronóstico y el seguimiento de la terapia de tumores, recidiva y la supervivencia así como en la identificación de los tumores en fase inicial, con unos pocos casos de falsos positivos (valor ROC, 0,96; proliferación tumoral sensibilidad, 0,80, especificidad 0,99).⁴²

TK1 activa en suero se ha utilizado como un marcador de malignidad desde 1984. Anticuerpos policlonales -y monoclonales contra TK1 humana se han producido para la determinación de los niveles de proteína TK1 en suero (STK1p), empleando quimioluminiscencia. y como sustrato el análogo de la timidina [125I]-5-yodo-2-desoxiuridina.³⁵⁻⁴¹

La determinación de TK1 en el tejido tumoral indica la tasa de crecimiento de las células tumorales, lo que puede reflejar un pronóstico tratándose de neoplasias hematológicas, tumores cerebrales, cáncer colorectal y cáncer de mama.⁴³

La determinación de TK1 en suero es un buen indicador de pronóstico, en el efecto de la terapia y la recurrencia de enfermedades hematológicas, sobre todo en las leucemias y en el linfoma no-Hodgkin. También se ha sugerido como un indicador en la diseminación de cáncer de próstata⁴⁴. En pacientes con tumores malignos más del 95% de TK1 en suero proviene de células malignas.⁴⁵

En el linfoma no Hodgkin (LNH) de bajo grado, los niveles séricos de TK correlacionan con el estadio de la enfermedad y proporciona información pronóstica considerando la supervivencia total y la supervivencia libre de progresión. En lo que concierne a monitorización de la actividad tumoral, se encontró que los valores séricos de TK1 regresaron a la normalidad si el tratamiento era exitoso, si incrementaban indicaban recurrencia y/o transformación a una forma más maligna de la enfermedad.⁴⁶

En el mieloma múltiple, la TK1 sérica correlaciona con el estadio clínico y predice la supervivencia. Más aún, los niveles séricos de TK1 fueron considerados como de posible significancia para distinguir entre pacientes con mieloma múltiple y aquellos con gammopatía monoclonal de origen desconocido, ya que la TK1 sérica era considerablemente menor en el último grupo de pacientes.

En pacientes con LNH de alto grado y enfermedad de Hodgkin, TK1 sérica correlacionó con el estadio de la enfermedad y proporcionó información pronóstica. Los valores de TK1 parecen ser más altos en LNH de alto grado que en el de bajo grado.

Los sistemas de estadificación actual para la leucemia linfocítica crónica (LLC) como la clasificación de Binet o de Rai no predicen con exactitud el riesgo de progresión de la enfermedad en forma temprana. Ya que se ha encontrado que los niveles séricos de TK1 predicen la sobrevida libre de progresión en la LLC, se realizó un estudio para evaluar el valor pronóstico de TK1 sérica en 106 pacientes con LLC estadio A de Binet, antes del tratamiento.⁴⁷ En un análisis de regresión múltiple por etapas, solo tres parámetros proporcionaron información pronóstica independiente sobre la sobrevida libre de progresión: TK1 por arriba de 7.0 U/L, la presencia de linfadenopatía, y el conteo de leucocitos mayor a 75 000 / μ L. Entre los pacientes en estadio A, aquellos con valores de TK1 mayor de 7.0 U/L tuvieron una sobrevida libre de progresión de 8 meses, mientras que los pacientes con s-TK1 menor de 7.0 U/L tuvieron una sobrevida libre de progresión de 49 meses, similar al grupo de LLC (42meses). El estudio sugiere que la determinación de los niveles de TK1 podría mejorar el abordaje del pronóstico individual en pacientes con LLC temprana.

IV. ANTECEDENTES

TIMIDINA KINASA EN LEUCEMIA AGUDA

En la LAM, se ha encontrado que los niveles séricos de TK1 pretratamiento están elevados y correlacionan con la cuenta de leucocitos, los blastos y los niveles de LDH.

Además se ha encontrado que TK1 está más baja en pacientes que alcanzaron una remisión completa.

Un estudio reciente de 81 pacientes con LMA mostró que 67% alcanzaron una remisión completa. Se utilizó un análisis de regresión múltiple, la edad y los niveles pretratamiento de TK1 fueron los únicos factores predictivos independientes de sobrevida. Entre los pacientes con un nivel inicial de TK1 de 300 U/L o menos, el tiempo de sobrevida promedio fue de 18 meses comparado con 4 meses, de aquellos con niveles superiores. La cuenta alta de leucocitos, niveles altos de Deshidrogenasa Láctica (DHL) y TK1 se encontraron como predictores de un pronóstico desfavorable. Entre estos, TK1 parece ser el predictor más significativo de los resultados del tratamiento. Por lo que se concluyó que pacientes con valores iniciales de TK1 bajos, tuvieron un pronóstico relativamente bueno.

En un estudio realizado por Votava y Cols.⁴⁸ incluyeron 38 niños con leucemia aguda (34 linfoblástica y 4 mieloblásticas), se determinó la TK1 antes de iniciar el tratamiento y por lo menos dos veces durante el seguimiento. Los niveles de TK1 pretratamiento fueron extremadamente altos (rango 78-5826 U/L, media 403 U/L, normal < 8 U/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-TK1 incrementó considerablemente en un rango de 120-800 U/L. Con estos hallazgos los autores concluyeron que la elevación de TK1 durante el seguimiento, es un marcador útil para reconocer estadios tempranos de recaída. En algunos casos esta recaída puede ser detectada hasta con un mes de anticipación a los signos clínicos. La sensibilidad en estos casos fue de 87%, por lo que parece ser que la TK1 es un buen parámetro durante el seguimiento por su sensibilidad, bajo costo y eliminación de muestras de médula ósea. Es importante aclarar que los autores concluyeron que aunque la TK1 pareció ser un predictor importante de recaída durante el seguimiento, sus niveles no correlacionaron con el pronóstico en su grupo de pacientes. El método utilizado por estos autores fue el radio-receptor análisis (RRA Immunotec, Prague, USA).

Desde la introducción de TK1 sérica, se han investigado sus niveles en una variedad de neoplasias. TK1 ha sido utilizada en el diagnóstico y clasificación de masas tumorales y proliferación celular antes del tratamiento de varias neoplasias hematológicas. Este marcador se ha utilizado en la evaluación de la respuesta al tratamiento y en la monitorización de la remisión o la recaída de la enfermedad, sin embargo, no se ha propuesto como un marcador de proliferación tumoral en leucemias agudas.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el cáncer en niños pasó del decimotercero al segundo lugar como causa de muerte en 1971, de 1 a 14 años de edad en el 2005. En este mismo año, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez ocupan el primer lugar de morbilidad y el segundo lugar de mortalidad dentro de las 10 primeras causas de registro del departamento de Bioestadística. En nuestro país a pesar del éxito informado en la literatura, en la mayoría de los centros médicos en los que actualmente se brinda la atención de estas enfermedades, nos encontramos ante limitantes para la identificación de factores de riesgo como estirpe celular leucémica y alteraciones citogenéticas asociadas y paralelamente observamos que al aplicar los protocolos utilizados en estudios multicéntricos internacionales en nuestros pacientes, la toxicidad sistémica e intolerancia a las dosis recomendadas se ven reflejadas en una morbimortalidad alta, que impide reproducir los resultados desde el momento de inducir la remisión y consecuentemente en la supervivencia a largo plazo.

Describir los niveles séricos de la TK1 en pacientes con leucemia aguda nos permitirá definir si esta prueba puede utilizarse como marcador sérico al diagnóstico en pacientes con leucemia aguda y en una segunda fase definir en que tipos de leucemias agudas se pudiera utilizar para el seguimiento y el pronóstico de estos pacientes.

VI. JUSTIFICACIÓN

Las leucemias agudas son la causa más común de cáncer en la población infantil de México y del mundo, sin embargo en algunos casos se ha demostrado cierta eficiencia de

los agentes terapéuticos y 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 este proyecto planteamos proponer una prueba diagnóstica de proliferación tumoral y aplicar este biomarcador en un futuro en la investigación de la enfermedad residual mínima de leucemia aguda. La TK1 como marcador de proliferación celular permitirá proponer herramientas de diagnóstico y pronóstico para los pacientes con leucemia aguda.

VII. PREGUNTA DE INVESTIGACION:

¿La timidina kinasa es una prueba diagnóstica de proliferación tumoral útil en pacientes con leucemia aguda?

VIII. HIPOTESIS:

La timidina kinasa es un marcador de proliferación tumoral en todos los pacientes con leucemias agudas.

IX. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la utilidad de la TK1 en sangre como marcador de proliferación tumoral en pacientes con leucemia aguda

Objetivos específicos.

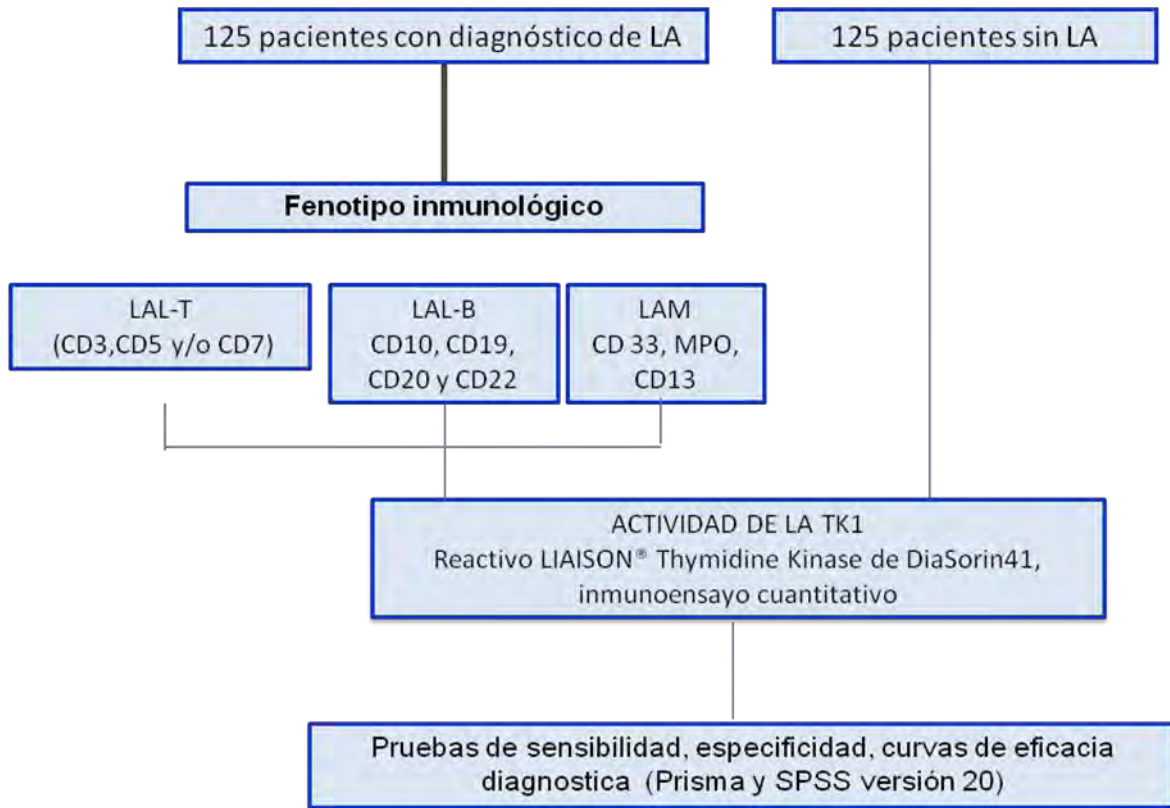
Determinar los niveles de TK1 en pacientes con Leucemia aguda Linfoblástica B

Determinar los niveles de TK1 en pacientes con Leucemia aguda Linfoblástica T

Determinar los niveles de TK1 en pacientes con Leucemia Aguda Mieloide

X- MATERIAL Y METODOS

Diagrama de flujo:



Diseño del estudio:

Es un estudio de transversal comparativo que se realizó partir de octubre del 2009 a diciembre del 2011 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Se incluyeron un total de 125 muestras de pacientes con leucemia aguda y 138 muestras de niños sin leucemia.

Lugar y duración: Se incluyeron pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda sin tratamiento previo que se atendieron en el Hospital Infantil de México Federico Gómez de octubre del 2009 a Diciembre del 2011, Los pacientes sin leucemia fueron niños de la estancia infantil del HIMFG , a quienes se les tomaron estudios para valoración de ingreso

y los niños escolares quienes solicitaban revisión como parte del certificado médico de la escuela con el grupo sanguíneo y RH.

Universo:

Pacientes con diagnóstico de Leucemia agudas y niños sin diagnóstico de leucemias.

Muestra

Se incluyeron 125 pacientes con diagnóstico de leucemia aguda y 138 niños sin leucemia a quienes se cuantificó la TK1 en suero. A los niños sin leucemia se les realizó una valoración integral que incluyó toma de muestra sanguínea para grupo y RH, una citometría hemática y pruebas bioquímicas de función hepática y renal.

Método de muestreo: Muestreo no probabilístico de casos consecutivos

Criterios de inclusión

Pacientes menores de 18 años de edad que cumplieron con los criterios oncológicos para diagnóstico de leucemia aguda, sin tratamiento previo

Niños sin leucemia que aceptaron participar en el estudio.

Criterios de exclusión

Pacientes con leucemia aguda secundaria a quimioterapia

Pacientes con leucemia aguda en recaída

Definición operativa de las variables y su escala de medición

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL
<i>Independientes</i>		
Edad del niño	Cuantitativa continua	Número de años y meses al momento del diagnóstico de Leucemia

Tipo de Leucemia por el inmunofenotipo	Cualitativa ordinal	Leucemia Aguda Linfoblástica B Leucemia Aguda Linfoblástica T Leucemia aguda Mieloide
Dependientes		
Timidina kinasa	Cuantitativa continua	Enzima de replicación del DNA que se mide por quimioluminiscencia en U/L

Diagnóstico de Leucemia Aguda: se realizó el diagnóstico con el aspirado de médula ósea y con la misma muestra se realizó un fenotipo inmunológico para identificar la estirpe afectada. Las leucemias se clasificaron según el linaje en; leucemia aguda linfoblástica de precursores B, leucemia aguda linfoblástica de precursores T y leucemia aguda mieloide según las recomendaciones de la OMS en la que se utilizaron los marcadores para LALT (CD3, CD5 y/o CD7) y antígenos de células LAL-B (CD10, CD19, CD20 y CD22) y para LAM (CD 33, MPO Y CD13). (Anexo A)

Medición en el Laboratorio de TK1:

Durante el abordaje del paciente con leucemia aguda se realiza la toma de muestra de sangre periférica al diagnóstico de la LA con el objeto de realizar una citometría hemática y marcadores bioquímicos para descartar síndrome de lisis tumoral. Para este proyecto de investigación se utilizaron 300 uL de suero.

Pruebas de laboratorio

Se utilizó el reactivo LIAISON® Thymidine Kinase de DiaSorin41, inmunoensayo cuantitativo para la determinación in vitro de la actividad de la Timidina kinasa en suero o plasma humano diseñado para efectuar el ensayo en el LIAISON® Analyzer totalmente automatizado.

La determinación de la TK1 en suero se realizó a través de un inmunoensayo indirecto modificado por quimioluminiscencia en dos pasos cuya finalidad fue la determinación

cuantitativa de la TK1 en suero de pacientes con leucemia aguda y de niños sin leucemia. El ensayo utilizó una reacción enzimática inicial en la que la TK1 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 TK1 presente en la muestra. En el ensayo, 50 µl de la muestra se incubaron 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 anti-cabra y después con anticuerpos policlonales anti-AZTMP de cabra. El resultado se incubó durante 40 minutos y después se agregó 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 compite por unirse con el AZTMP en la solución. Tras una incubación de 20 minutos, el material libre se elimina con un ciclo de lavado. Posteriormente se agregaron los reactivos iniciadores y produjeron una reacción quimiluminiscente rápida. La señal luminosa se mide en unidades lumínicas relativas con un fotomultiplicador y es proporcional a la concentración de TK1 presente en la muestra. (Anexo B)

Plan de análisis.

Se realizó estadística descriptiva para los datos demográficos y se analizaron los valores de la timidina kinasa sérica con pruebas de sensibilidad, especificidad, curvas de eficacia diagnóstica y razones de verosimilitud. Se utilizó el programa Prisma 5.0 y SPSS versión 20 para el análisis estadístico, manejando un nivel de significancia estadística con $P < 0.05$.

Aspectos éticos:

De acuerdo al artículo 17 del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de investigación para la salud, la participación de los pacientes en este estudio conllevó un tipo de riesgo mínimo. De acuerdo al artículo 14, fracción V, 20 al 26,29,30,36,43,49,51,57,58,63 y 109 del citado reglamento.

Consideraciones de Bioseguridad.

Se considera un estudio con riesgo menor al mínimo.

Se utilizaron especímenes de sangre para la cuantificación de la TK1 en pacientes y niños sin leucemia. La médula ósea se tomó en los pacientes con LA para el diagnóstico y la definición del linaje como parte del abordaje en los pacientes con leucemia aguda, que fueron eliminados en los contenedores rojos, siguiendo las especificaciones de la NOM 087 SSA-2002 y vigentes en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

XI. RESULTADOS.

Niños sin Leucemia:

Se estudió a un grupo de 138 niños sin leucemia a quienes se les realizó una revisión general y se les tomó una muestra de sangre para biometría hemática y química sanguínea. Los resultados fueron obtenidos dentro de valores de referencia, estos, permitieron definir a los niños sin leucemia. Fueron 73 niñas y 65 niños con intervalo de edad de 1 a 17 años.

La media de los valores obtenidos de la TK1 para los niños sin leucemia fue de 26.5 U/L con un desviación estándar de 13.1 con los intervalos de confianza al 95% inferior de 24.3 U/L y superior del 28.7

Por lo ya descrito los valores de referencia calculados para nuestra población según las recomendaciones de CLSI⁴⁹ es la media $\pm 2DS$ en una población con una distribución normal (figura 3), realizado a 138 niños sin leucemia. Por lo que consideramos como valores de referencia de 4 a 52.5 U/L, con un valor de corte anormal de 52.5 con una sensibilidad del 72% y especificidad del 94%.

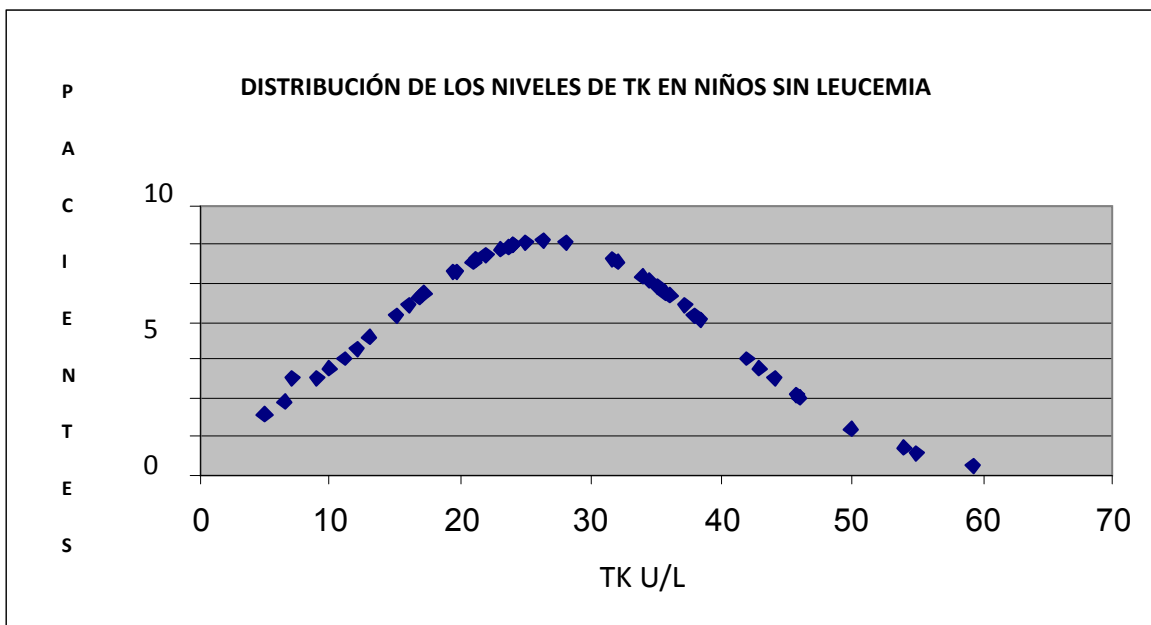


Figura 3. Concentración de TK1 en pacientes sin leucemia

Por otro lado al analizar la edad de los niños estudiados, en la figura 4 se muestra la frecuencia por grupos de edad en niños sin leucemia y con leucemia, siendo más frecuente el grupo de niños sin leucemia entre 8 y 11 años de edad, en tanto que para los niños con leucemia el grupo más estudiado fue entre 4 y 7 años.

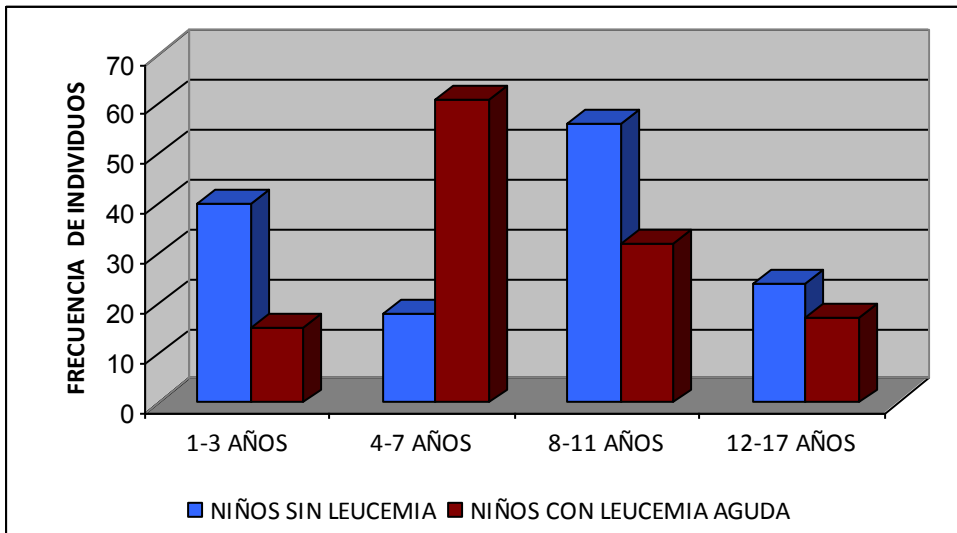


Fig. 4. Frecuencia de niños con y sin leucemia según el grupo de edad

Niños con leucemia

En el estudio se incluyeron 66 niños y 59 niñas con diagnóstico de leucemia aguda, con edades comprendidas entre 2 y 16 años, la mediana de edad fue de 6 al momento del diagnóstico,

En la tabla 1 se describen a los pacientes por grupos de edad, tipo de leucemia y sexo, en esta tabla podemos observar que la leucemia más frecuente la LAL de progenitores B con un 72% y menos frecuente la tipo T, el grupo etario más afectado fue entre 2 y 6 años de edad al diagnóstico con 53%, 26% para el grupo de 7 a 9 años y 21% para el grupo de 10 a 16 años.

GRUPOS DE EDAD	2-6 Años	2-6 Años	7-9 Años	7-9 Años	10-16 Años	10-16 Años	Total
Sexo	Niñas	Niños	Niñas	Niños	Niñas	Niños	
LAL-B	21	24	12	15	6	12	90
LAL-T	5	3	2	1	1	1	13
LAM	8	5	0	3	3	3	22
TOTAL	34	32	14	19	10	16	125

Tabla 1 Características de los grupos de estudio

CUANTIFICACION DE TK1 EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA.

La cuantificación de la timina kinasa se realizó en 125 muestras de suero de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda y en 138 muestras de pacientes sin leucemia, encontrando intervalos de 6.8 U/L hasta 3520 U/L con una media de 351 para el grupo de leucemia y para el grupo control intervalos de 5 U/L a 53.8 U/L con una media de 30.6 U/L. La diferencia de medias fue de -318.7 U/L con un IC del 95% de -427.5 a -209.8 con una R de 0.2098, una $P < 0.0001$ con significancia estadística para los niveles de la TK en el grupo sin leucemia y con leucemia.

Se clasificó al grupo de pacientes con leucemia aguda según el tipo de leucemia presentada considerando su linaje y se encontró que en el grupo de pacientes con LAL-B (90) presentaron una media 199 U/L con intervalos de 6U/L a 3216 U/L. (Figura 5)

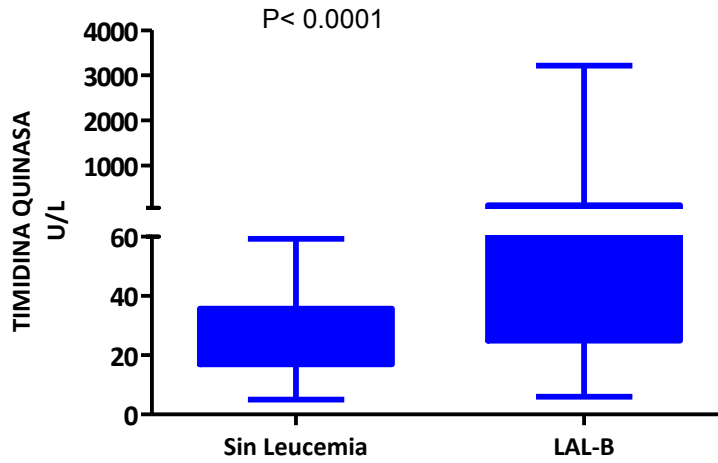


Figura 5. Niveles de TK1 de niños sin leucemia y niños con LAL tipo B

Considerando el Riesgo habitual y el Riesgo alto de los pacientes por edad y cantidad de leucocitos en pacientes con LAL-B (figura 6), los valores de TK1 identificados muestran una diferencia estadísticamente significativa.

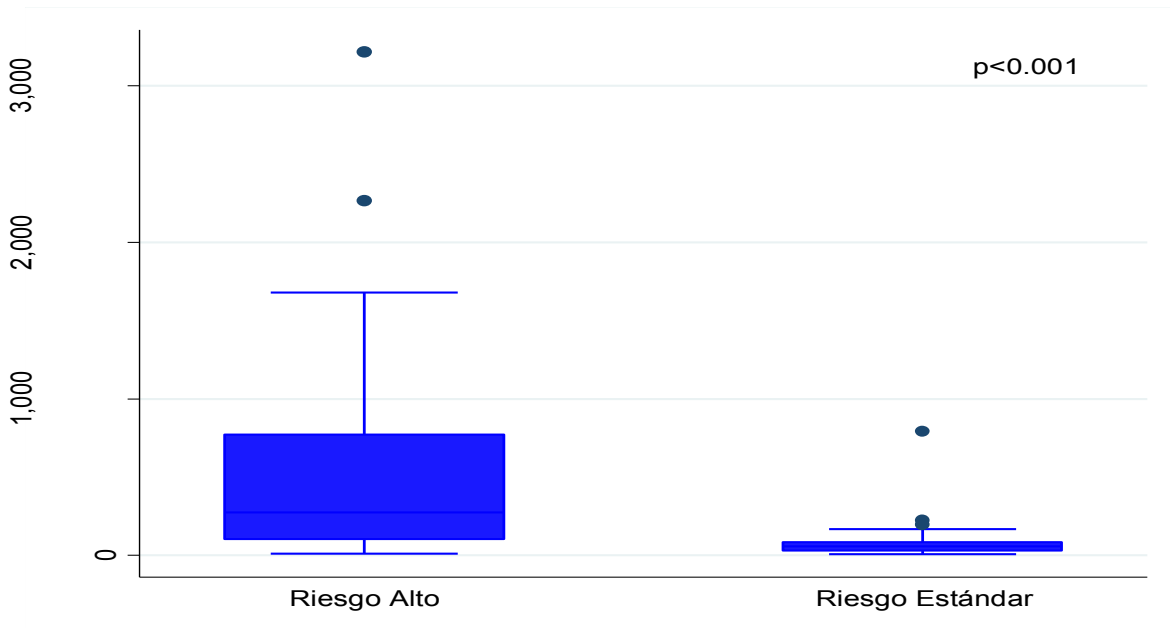


Figura 6. Riesgo alto y riesgo estándar en niños con LAL-B

Para el grupo de pacientes (13) con LAL-T se encontró una media de 1387 U/L con intervalos de 81 U/L a 3520 U/L, solo 1 paciente presentó 81 U/L y en el 92% se cuantificaron niveles de TK1 > de 200 U/L. En el gráfico 7 se observa de forma importante la diferencia entre los niveles de TK1 del grupo de niños sin leucemia y la TK1 de niños con LAL-T.

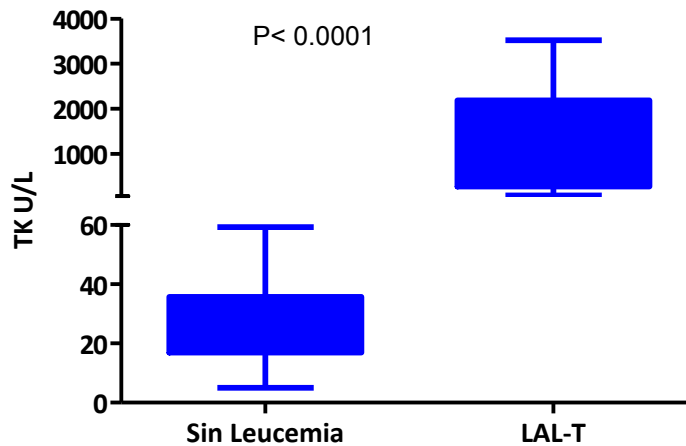


Figura 7 Niveles de TK1 en niños sin leucemia y niños con LAL tipo T

Para el grupo de pacientes con LAM (22) se encontró una media de 602 U/L con intervalos de 42 U/L a 2715 U/L, en el 27% de los pacientes se cuantificó la TK1 entre 32 U/L y 100 U/L; el 5% con TK1 entre 101 U/L y 200 U/L y en el 68% los niveles de TK1 > de 200 U/L hasta 2715 U/L. (Figura 8).

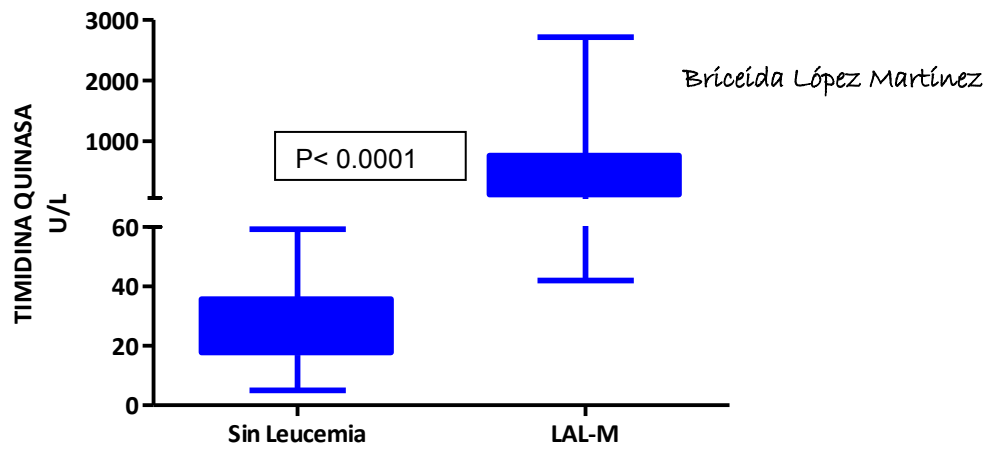


Figura 8. Niveles de TK1 de niños sin leucemia y niños con LAM

DETERMINACION DE LA TK1 EN NIÑOS SIN LEUCEMIA Y CON LEUCEMIA AGUDA

Los valores de TK del grupo de niños sin leucemia y con leucemia presento un area bajo la curva de 0.87 (figura 9).

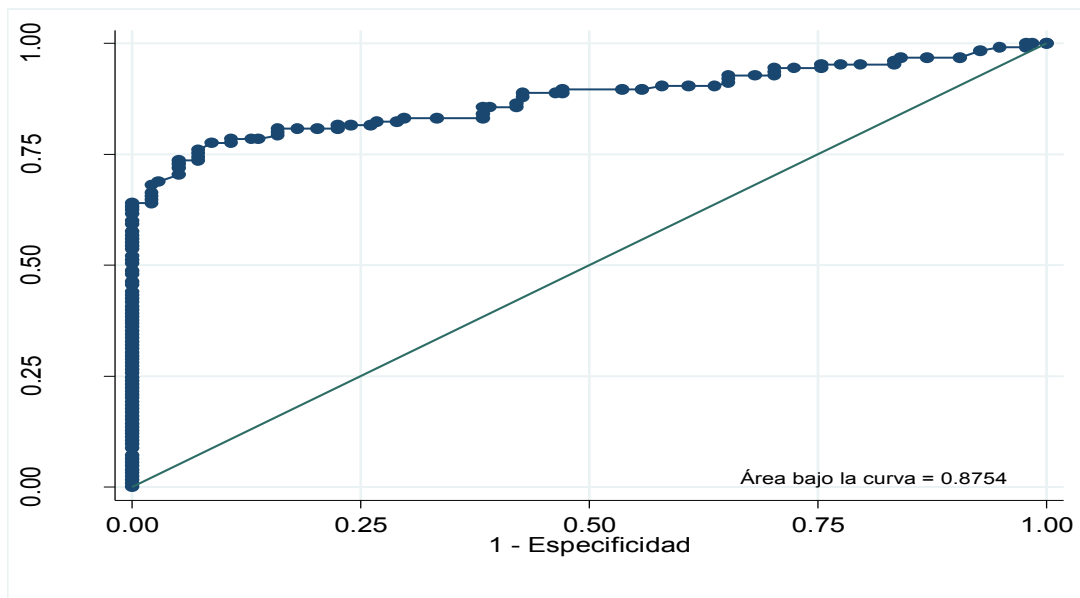


Figura 9. Valores de TK1. Área bajo la curva de niños sin y con leucemia.

En el caso de la TK del grupo de niños sin leucemia y del grupo de pacientes con LAL-B, LAM y LAL-T se encontró un área bajo la curva (ABC) de, 0.83, 0.98 y 1.0 respectivamente,

incrementando la sensibilidad y la especificidad de la timidina kinasa como marcador de proliferación celular en la Leucemia mieloide aguda. (Gráfico 10-11-12)

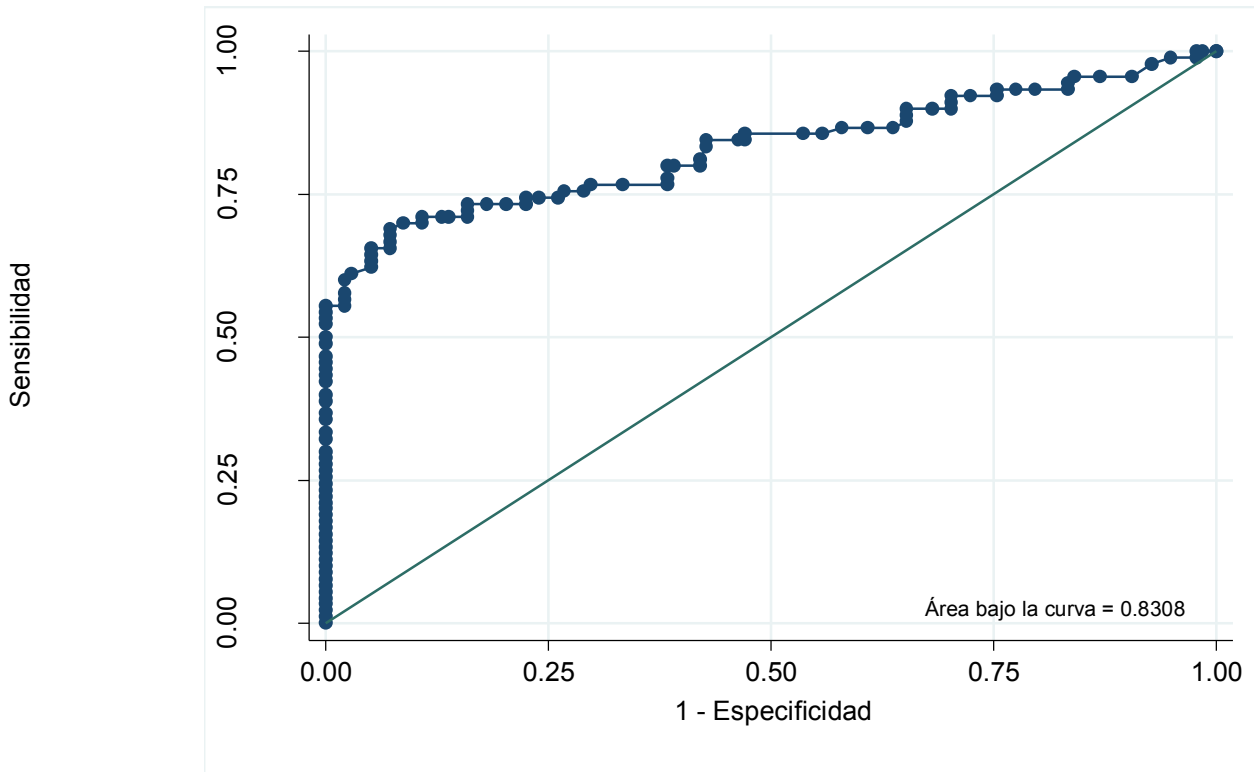


Figura 10- Valores de TK1. Área bajo la curva de niños sin y con leucemia. con LAL-B

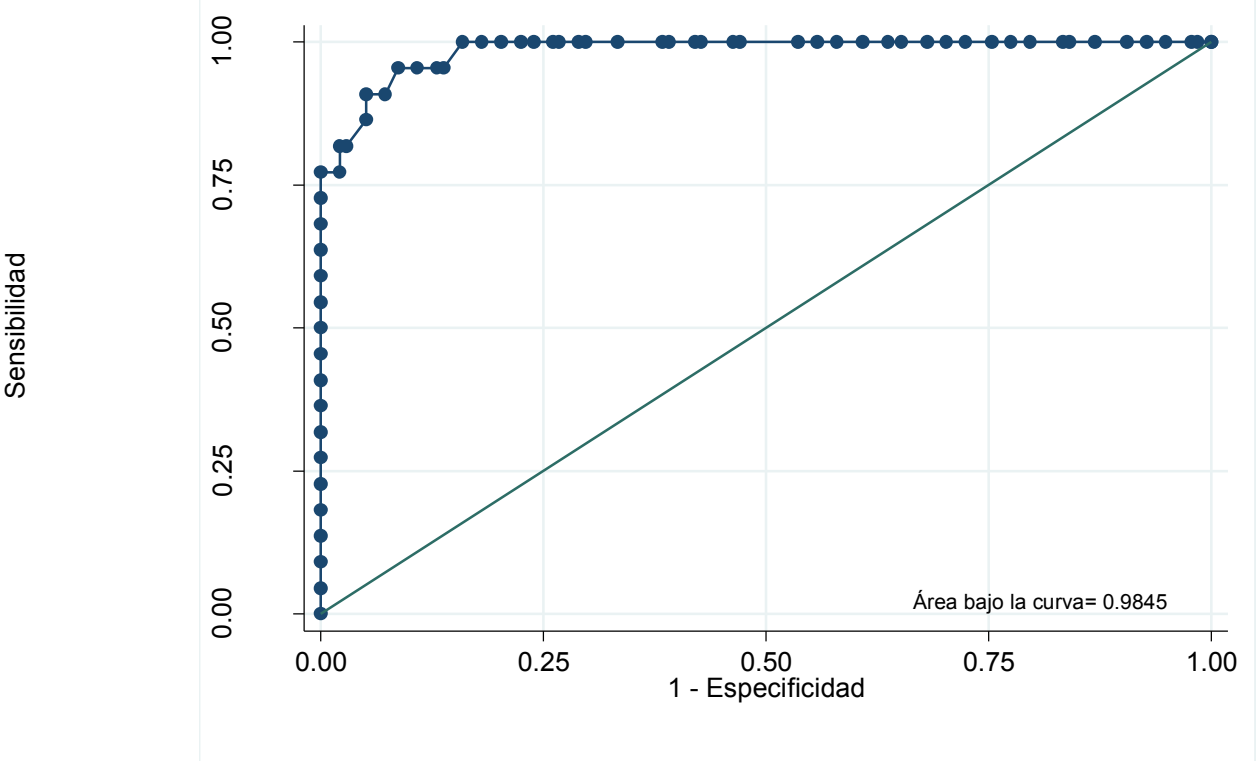


Figura 11. Área bajo la curva de niños sin leucemia y niños con leucemia Aguda Mieloide.

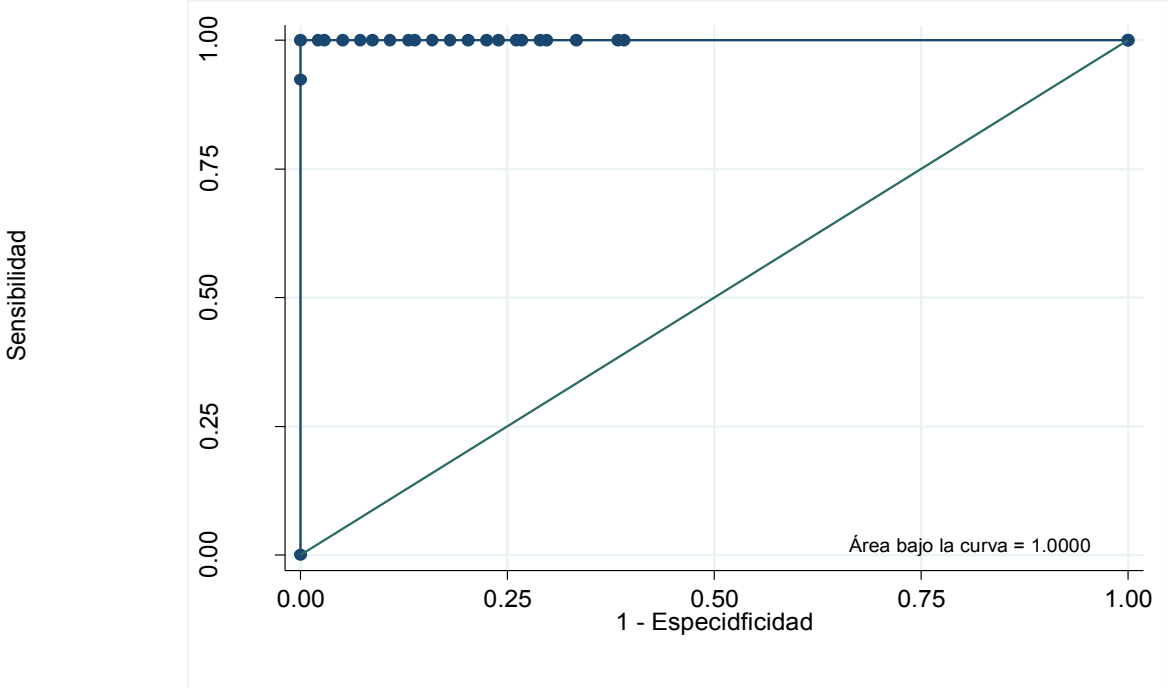


Figura 12. Área bajo la curva de niños sin leucemia y niños con leucemia Aguda de precursores T

DISCUSION:

Las leucemias agudas son la causa más común de cáncer en la población infantil alrededor del mundo, por lo que en las últimas décadas se ha trabajado arduamente en la creación de instituciones para la atención y apoyo a niños con esta enfermedad, dichos esfuerzos están encaminados a la formación de personal capacitado y en el establecimiento de protocolos de investigación para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico. En esta tesis se estudia a la Timidina Kinasa 1 (TK1) como marcador de proliferación celular y se propone emplearla como herramienta de diagnóstico y pronóstico para los pacientes pediátricos con leucemia aguda y aplicar este biomarcador en un futuro en la investigación de la enfermedad residual mínima de leucemia aguda.

El diagnóstico de la Leucemia se realiza obteniendo una muestra de médula ósea y realizando la cuantificación de blastos según las recomendaciones de la OMS, en nuestro estudio tenemos la limitante de no haber realizado este procedimiento en los niños sin leucemia considerando que clínicamente no presentaban datos para pensar en LA y que fueron captados con el fin de una revisión integral y no por sintomatología alguna, por lo que no sería ético realizar un aspirado de médula ósea en niños clínicamente sin leucemia.

Es bien conocido que para realizar el diagnóstico de las leucemias agudas se deben tener en cuenta tanto las características clínicas de la enfermedad como los estudios de laboratorio que incluyen la morfología, citoquímica, inmunofenotipo y citogenética de las células neoplásicas involucradas, y que este abordaje es de gran importancia, no sólo para asignar el linaje de las células patológicas sino también para identificar aberrancias fenotípicas que diferencian a las células leucémicas de los precursores normales. En nuestro estudio incluimos 125 niños con LA de las cuales el 82.5% fueron Leucemias Agudas Linfoblásticas y de estas el 72.1% fueron LAL tipo B, 10.4% LAL-T y 17.5% LAM. Frecuencias similares han sido reportadas en otras investigaciones en las que se describe

que el subtipo de mayor frecuencia es LLA, la cual constituye el 85% de todos los casos presentados, mientras que la leucemia de estirpe mieloide contribuye con el 15% de ellos.^{50 51}

Por otro lado, el incremento en la incidencia de las leucemias y el desarrollo importante de la tecnología ha producido que el abordaje de las leucemias aguda esté basado en lineamientos emanados de estudios de evidencia científica por lo que el tratamiento de los pacientes se ve influenciado por múltiples factores relacionados con la accesibilidad a las metodologías diagnósticas y la falta de estandarización de los estudios como el fenotipo de los marcadores de la superficie de las células malignas, por lo que en esta tesis decidimos abordar como método complementario la cuantificación de TK1 como biomarcador de proliferación celular.

En cuanto a la medición de la TK1 la diferencia de medias de los niveles del grupo de pacientes sin leucemia y de aquellos que presentaron leucemia fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) resultados que comparados con los descritos por Votaba⁴⁸ en la República Checa y O Nell⁴⁰ en Estados Unidos demuestran incrementos considerables de la TK1 favorecen al diagnóstico de la Leucemia aguda. Cabe resaltar que en las investigaciones realizadas incluyeron 38 pacientes (34 con LAL y 4 con LAM) en el estudio de la República Checa en tanto que en Estados Unidos incluyeron a 33 niños con LAL, los investigadores no describieron los niveles de TK1 según la línea celular afectada de la leucemia.

En nuestro estudio analizamos los niveles de la TK1 por tipo de leucemia y encontramos que en promedio los niños que tienen LAL tipo B tienen 181.8 UI/L más que los niños sin leucemia ajustado por edad y sexo, en tanto que los pacientes con LAM tienen 578 UI/L y los pacientes con LAL-T 1364.1 UI/L.

Con los resultados obtenidos podemos deducir que en la LAL tipo B los niveles de TK1 se encuentran distribuidos de forma heterogénea, es decir existe una población de los pacientes en la se encuentra en niveles ligeramente elevados y otros en los que sus niveles tienen una elevación considerable. Por lo anterior es importante seguir estudiando

la biología de las leucemias agudas linfoblásticas tipo B ya que la proliferación baja, mediana o intensa puede ser asociado a diferentes factores de riesgo del paciente.

En el grupo de pacientes estudiados con LAL tipo B observamos que los niveles de TK1 más elevados se presentaron en el grupo de pacientes con LAL tipo de alto riesgo, mientras que los de bajo riesgo presentaron niveles menores. Para estos hallazgos podemos describir 3 supuestos:

1.- La TK1 pudo haberse incrementado en los niños con LAL tipo B de alto riesgo por presentar alguna infección viral que no se descartó durante la exploración física, esta aseveración debida al estudio realizado por (Topolcan y Cols) ya que en personas con infección viral se puede incrementar hasta 164 UI/L.⁵²

2.- Si consideramos el punto de Golias y cols. en el que describen la existencia de diferentes formas en que se presenta el cáncer pero su fisiopatología comprende aberraciones en algún punto de la estructura molecular que administra el ciclo celular y que por tanto causan las desregulaciones del mismo, pudiendo ser esto lo que nos pudiera explicar porque las LAL tipo B de alto riesgo incrementan de forma importante los niveles de TK1. Sin embargo, lo previamente descrito me lleva a la pregunta; que sucede en la Biología de las LAL tipo B de bajo riesgo que no incrementa la TK1, considerada como un marcador de proliferación tumoral siendo que las leucemias son definidas por una proliferación descontrolada de células sanguíneas.⁵³

3- Los niveles de TK1 encontrados en el grupo de los pacientes con LAL estirpe T puede estar asociado al tipo celular comprometido, lo anterior considerando que el linaje T se asocia con mayor frecuencia con hiper leucocitosis, masa mediastinal, infiltración a sistema nervioso central, mostrando una mayor tasa de recaídas en comparación con el la leucemia aguda de estirpe B.⁵⁴

Considerando la definición de leucemia aguda que dice “es la proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en una estirpe celular con 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.” Podemos describir de forma breve que la TK1 si es un marcador de proliferación tumoral. Sin embargo, al analizar los resultados de este proyecto de investigación es importante describir que la utilidad clínica de los niveles de la TK1 dependen de la sensibilidad y especificidad de la metodología utilizada para detectar pacientes con leucemia aguda al diagnostico las cuales se encuentran inversamente relacionadas y ambas dependen de los valores de referencia aplicados. La frecuencia de resultados falsos positivos está relacionada a los valores de referencia (VR) utilizados, que generalmente son los recomendados por los fabricantes y que varían según los tipos de técnicas realizadas en los laboratorios. La mayoría de estos inmunoensayos son estandarizados en el país de origen, estableciéndose el límite superior normal en una población que probablemente tenga características diferentes de la región donde se realizan los ensayos. Es por ello, que como parte del desarrollo del proyecto se establecieron los valores de referencia de la TK1 en niños sin leucemia siguiendo las recomendaciones de CLSI. Los valores de referencia de la TK1 reportados por el fabricante presentan una media de la TK1 de 4.3 U/L con un máximo de 7.5 UL (Liasion Thymidine kinase 310960), en tanto que para el grupo de niños sin leucemia de nuestro estudio fue de 26.5 U/L y 52.5 UI respectivamente los valores encontrados en nuestro estudio difieren de reportados 8 UI/l y 4 UI/L la diferencia de los valores de referencia puede verse afectado por la edad de los participantes de los estudios del fabricante- En el caso de este estudio fueron niños y los reportes de los estudios realizados no describen edad de sus grupos control.

En las gráficas (9,10,11) del ABC se observa gráficamente cuáles son los mejores resultados según el tipo de LA donde se observa que la prueba sigue la diagonal que va del ángulo inferior izquierdo al superior, asociándose cada incremento de la sensibilidad a una pérdida de igual magnitud de la especificidad siendo mayor sensibilidad para LAL tipo T y la LAM, lo que sugiere su utilidad en estos padecimientos.

CONCLUSIONES:

El punto de corte del ABC en el grupo niños con leucemia y sin leucemia fue de 34.1 UI de TK1 con una sensibilidad de 83.2% y una especificidad del 70.3% por lo que concluimos que la timidina kinasa es una enzima que se incrementa en el 90% de los pacientes con Leucemia aguda linfoblástica de precursores T y en el grupo de pacientes con leucemia aguda mieloide, estos resultados son la base de una investigación en la que se propone seguir estudiando los niveles de TK1 en un número mayor de pacientes con leucemias agudas de precursores T y mieloide.

Los resultados generados con este trabajo de tesis concluyen que TK1 es un biomarcador que puede ser considerado en asociación con otros factores pronósticos y predictivos a la hora de tomar decisiones de tratamiento. En los pacientes con leucemia aguda la presencia de un índice de proliferación elevado, medido por TK1, puede ayudar a indicar un tratamiento de quimioterapia.

Los marcadores de proliferación se han estudiado principalmente como factor pronóstico y apenas se han correlacionado con predicción de respuesta a un tratamiento, por lo que en este trabajo sugerimos el uso de TK1 como un indicador de proliferación celular, como método de apoyo en el diagnóstico de las leucemias agudas sin embargo el uso este marcador en la LAL tipo B deberá ser en pacientes que presenten la TK1 elevada en la cuantificación inicial.

XV. ANEXO A.

Procedimiento del inmunofenotipo para determinar la línea celular afectada en las leucemias agudas.

Determinación del Inmunofenotipo de leucemias

OBJETIVO del procedimiento:

Describir las instrucciones para realizar correctamente la determinación del inmunofenotipo de leucemias.

PRINCIPIO

La citometría de flujo es una tecnología que simultáneamente mide y analiza múltiples características de partículas individuales en suspensión, usualmente células, mientras estas pasan en un chorro de fluido a través de un rayo de luz. Las propiedades medidas incluyen el tamaño relativo de las partículas, la complejidad relativa o granularidad y la intensidad de fluorescencia relativa.

Estas características se determinan usando un sistema óptico-electrónico que registra la manera en que la partícula dispersa la luz y emite fluorescencia.

Las partículas a analizar pasan en la porción central del flujo, cuando las partículas se intersectan con el láser, dispersan la luz. Si hay moléculas fluorescentes presentes se producirá además fluorescencia. La luz dispersada y fluorescencia es recolectada por lentes colocados en las posiciones apropiadas, y una serie de filtros y espejos conducirá la luz hasta los detectores apropiados. Estos detectores producirán señales electrónicas de una intensidad proporcional a la cantidad de luz que llegue hasta ellos.

El uso de moléculas fluorescentes distintas (distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea

I. REQUISITOS DE LA MUESTRA:

- a) **Preparación del paciente:** no aplica
- b) **Tipo de Muestra:** Médula ósea anticoagulada con heparina o sangre completa anticoagulada con EDTA
- c) **Condiciones de la Muestra:** debe estar bien mezclada, no debe estar hemólizada ni presentar coágulos.
- d) **Identificación de la muestra primaria:** Debe estar rotulada con letra clara y con el nombre completo del paciente, así como el número de registro, edad, sexo, servicio y nombre del médico que lo solicita.
- e) **Volumen de la muestra:** mínimo 2.0 ml, óptimo 3.0 ml.
- f) **Estabilidad y conservación:** a temperatura ambiente hasta 24 horas.
- g) **Criterios de rechazo:** muestras coaguladas, hemólizadas, obtenidas con otro tipo de anticoagulantes.

II. REACTIVOS.

Cada frasco contiene un anticuerpo monoclonal y su respectivo fluorocromo.

PANEL DE MONOCLONALES PARA INMUNOFENOTIPO DE LEUCEMIAS		
TUBO No	FITC	PE
1	GAMMA 1	GAMMA 2
2	CD 45	CD 34

3	CD 5	CD 20
4	CD 10	CD 2
5	CD 22	CD 33
6	CD 15	CD 117
7	-----	CD 7
8	-----	CD 14
9	Anti-HLA-DR	CD 13
10	CD 3	CD 19
11	Anti-Mieloperoxidasa	CD 79 a
12	Anti-TdT	-----

Preparación:

Vienen listos para usarse.

Almacenamiento y estabilidad:

Anticuerpos monoclonales marcados	2-8 °C hasta la fecha de caducidad
Perlas	2-8 °C hasta la fecha de caducidad

Solución lisante FACS Lysing 10X

Constituyentes:

La solución lisante FACS concentrada 10X se presenta como 100 ml de una solución tamponada, que contiene <15% de formaldehído y <50% de dietilenglicol.

Preparación:

Realizar una dilución 1:10 con agua desionizada para obtener una solución 1X

Almacenamiento y estabilidad:

Almacenamiento	Estabilidad
Hasta un mes después de preparada solución	2-8 °C hasta la fecha de caducidad

Solución Permeabilizante FACS 10X

Constituyentes:

La solución permeabilizante concentrada 10X se presenta como 25 ml de una solución tamponada, que contiene <15% de formaldehído y <50% de dietilenglicol.

Preparación:

Realizar una dilución 1:10 con agua desionizada para obtener una solución 1X

Almacenamiento y estabilidad:

Almacenamiento	Estabilidad
Hasta un mes después de preparada solución	2-8 °C hasta la fecha de caducidad

♣ Solución de Paraformaldehído 1% en PBS

Constituyentes:

Formaldehído al 37%

Preparación:

Realizar una dilución 1:10 con solución salina fosfato (PBS) para obtener una solución 1X

Almacenamiento y estabilidad:

Almacenamiento	Estabilidad
Hasta un mes después de preparada solución	2-8 °C hasta la fecha de caducidad

♣ Solución salina fosfato (PBS)

♣ Solución FACSFlow

♣. **Calibrite 3M.**

Constituyentes:

Perlas para calibración hechas de material sintético.

Preparación:

Vienen listas para usarse.

Almacenamiento y estabilidad:

Almacenamiento	Estabilidad
2-8 °C	hasta la fecha de caducidad

III. CALIBRADORES.

El citómetro FACSCalibur utiliza para su calibración microesferas Calibrite 3 M.

Las microesferas se usan para ajustar la calibración del instrumento, configurar la compensación entre fluorescencias y verificar la sensibilidad del instrumento. Se recomienda usarlas diariamente para monitorizar el rendimiento del instrumento con el tiempo.

Para preparar el citómetro de flujo antes de su uso, se debe calibrar con el software FACSComp que utiliza una suspensión de microesferas CaliBRITE sin marcar y marcadas con los fluorocromos FITC, PE, PerCp, APC.

PREPARACION DE PERLAS CalIBRITE:

Se marca un tubo con la letra S (sin teñir) se le agrega 1 mL. De solución de Facsflow y una gota de perlas sin marcar y 1 gota de perlas de APC (previamente mezcladas). Se mezcla el tubo en un agitador vortex.

Se marca un segundo tubo con la letra M (marcadas) se le agrega 3 mL de solución de Facs flow, 1 gota de perlas sin marcar, 1 gota de perlas marcadas con APC, 1 gota de perlas marcadas con FITC, 1gota de perlas marcadas con PE, 1 gota de perlas marcadas con PerCP (previamente mezcladas). Se mezcla el tubo en un agitador vortex.

Se procede a pasar las perlas calibrite en el equipo:

- * Se selecciona el software FACSCOMP a través del cual se realiza la calibración.
- * Aparece una página en la cual se anota el nombre del jefe de laboratorio, del operador y se acepta la información.
- * En la siguiente página se anota el número de lote de las perlas marcadas y sin marcar.
- * Se indica que tipo de función se va a utilizar LYSE WASH (lisado lavado) o LYSE NO Wash (lisado no lavado).
- * Seleccionar la función de RUN y HI.
- * En el sitio de toma de muestra, se coloca el tubo que contiene perlas sin marcar y perlas marcadas con APC se presiona el botón ENTER.
- * Se observa en la pantalla el corrimiento de las perlas, mostrando el ajuste de los voltajes de los tubos fotomultiplicadores.
- * Una vez terminado estos ajustes el equipo solicita la colocación del tubo 2 el cual contiene perlas marcadas y sin marcar.
- * Se observa en la pantalla el ajuste para la compensación entre fluorescencias.
- * Después de los ajustes PMT (fotomultiplicadores) y de la compensación el software lleva a cabo un prueba de sensibilidad usando las suspensiones adecuadas de mezclas de microesferas.
- * Se retira el tubo que contiene las perlas marcadas y se coloca un tubo con agua bidestilada.
- * Se coloca el equipo en posición de LOW y STANBY.
- * El equipo automáticamente imprime el reporte de calibración en el cual debe indicar si todos los parámetros fueron satisfactorios, en caso de no ser así repetir la calibración, si continuara dando problemas comunicarlo a la compañía correspondiente.

IV. MATERIAL.

- Pipeta automática de 1,000 μ L
- Pipeta automática de 0.5 - 10 μ L
- Pipeta automática de 50 – 200 μ L
- Puntas para pipetas automáticas

- Gradilla
- Tubos de polipropileno

V. EQUIPOS O INSTRUMENTOS.

- Citómetro de flujo, modelo FACSCALIBUR, marca Beckton Dickinson.

VI. DESCRIPCIÓN.

El inmunofenotipo es la identificación y cuantificación de distintas poblaciones celulares en base a la expresión diferencial de marcadores de membrana. Este tipo de análisis se realiza empleando anticuerpos monoclonales antígeno-específico marcados con fluorocromos. En los análisis inmunofenotípicos suelen medirse de forma simultánea varios marcadores celulares por lo que se emplean combinaciones de anticuerpos acoplados a fluorocromos con diferentes espectros de emisión.

La importancia del inmunofenotipo en las leucemias es que permite el diagnóstico más completo y una mejor tipificación de las leucemias.

Identifica marcadores que implican peor pronóstico e identifica fenotipos patológicos que permiten seguimiento y detección de enfermedad mínima residual.

Se procede a darle un número progresivo de identificación a la muestra primaria cotejándola con la solicitud y los datos del tubo, se verifica si no está coagulada, hemodiluida y si el volumen es el adecuado.

La muestra se mezcla en un agitador vortex durante 5 seg. Y se analiza en el equipo Coulter LH 750 Analyzer para cuantificar la cantidad de células blancas que están presentes en la muestra; si se requiere se procede a realizar una dilución para manejar una cifra de células blancas de 15×10^3 a 20×10^3 cels/ μ l .

Se continúa con la tinción de la muestra

1. Rotular 12 tubos cada uno con el número de muestra, así como el o los monoclonales a trabajar según el panel ya mencionado
2. Pipetear 20 microlitros de anticuerpo monoclonal correspondiente a cada tubo a excepción del tubo No 11 y 12.
3. Pipetear 100 microlitros de muestra a cada uno de los tubos
4. Tapar los tubos y mezclarlos suavemente en el agitador vortex.
5. Incubar los tubos 30 minutos en refrigeración y en obscuridad
6. Pipetear a cada tubo 1 ml de reactivo de lisis, agitar e incubar 10 minutos en refrigeración

7. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm (revoluciones por minuto)
8. Decantar el sobrenadante y lavar con solución de PBS al 1X, centrifugando 5 minutos a 1500 rpm.
9. Decantar el sobrenadante y lavar con solución de PBS al 1X, centrifugando 5 minutos a 1500 rpm.
10. Decantar el sobrenadante y agregar 500 microlitros de solución de paraformaldehído al 1%
11. Al tubo No 11 y 12:
Pipetear 100 microlitros de muestra, agregar 1 mL de reactivo de lisis mezclarlos en el agitador vortex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm y decantar el sobrenadante .
13. Adicionar 500 microlitros de solución permeabilizante mezclar en el agitador vortex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
14. Agregar 2 ml de solución de PBS y centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
15. Decantar el sobrenadante y adicionar 20 microlitros del anticuerpo monoclonal correspondiente a cada tubo mezclar suavemente en el agitador vortex.
16. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
17. Agregar 2 ml de solución de PBS mezclar en vortex y centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
18. Decantar el sobrenadante y agregar 500 microlitros de solución de paraformaldehído al 1%.
19. Proceder a analizar la muestra en el citómetro de flujo.
20. Las células teñidas deben analizarse dentro de las primeras 48 horas.

Una vez que las muestras están teñidas y el citómetro esté listo para trabajar se realiza lo siguiente:

1. En la pantalla de la computadora seleccionar el software **CellQuestPro**.
2. Seleccionar **PLOTS > Inspector:Dot Plot > Plot type > Acq> Analysis**

Aparece un histograma en la pantalla en donde en el eje de las X aparece FSC y en el eje Y SSC (FIG. No 1).

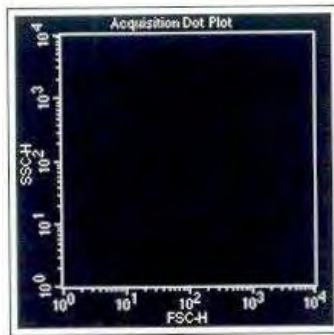


FIGURA No 1

3. Se repite el paso No 2. (Para obtener el histograma No 2)
4. Seleccionar **Windows > Show Browser: untitled.**
5. Dar click en el triángulo que marca **Acquisition controls**

Para localizar el archivo donde se almacenará el análisis de la muestra. FIG. No 2

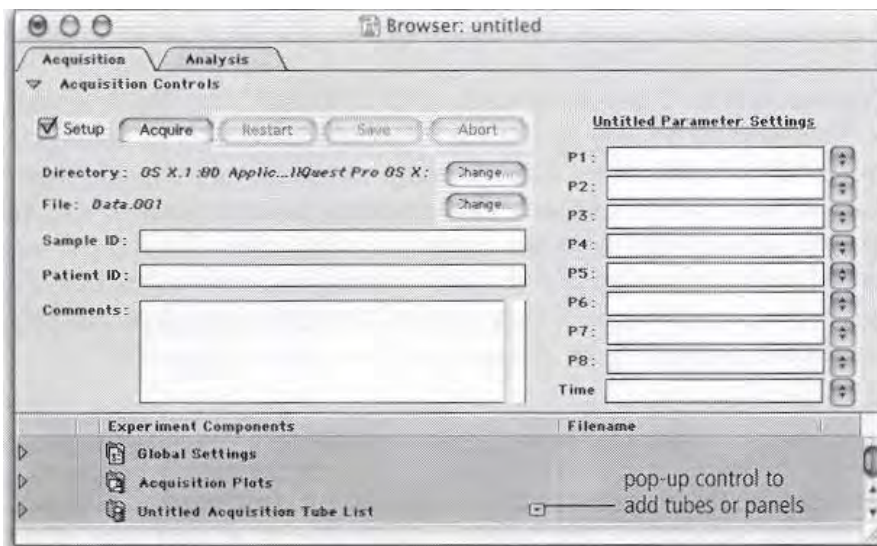


FIG. No 2

6. Seleccionar **Change** de la opción **Directory**
7. Seleccionar **FACSStations G5 > Leucemias**

Localizamos el archivo del mes en que se está trabajando o bien se crea un nuevo archivo de mes, y a su vez se crea un folder del día en que se está trabajando la muestra (día, mes, año) dar click en **choose** .

8. Seleccionar **Change** de la opción **File**.

De esta opción anotamos el nombre del paciente en **Custom Prefix** y el número del tubo de inicio (1) en **File Count**, damos click en **OK**.

10. En el siguiente recuadro anotamos el nombre del operador, el nombre del paciente y el número de registro.

11. En el siguiente recuadro dar click en el triángulo **Experiment Components>Untitled**

Acquisition tube list > Load Tubes From Panel seleccionamos el panel de leucemias.

12. Dar click en el segundo histograma y en el eje X donde dice FSC dar click y cambiarlo por Mouse IgG1 FITC y en el eje Y donde dice SSC dar click y cambiarlo POR Mouse IgG2 PE. FIG. No 3

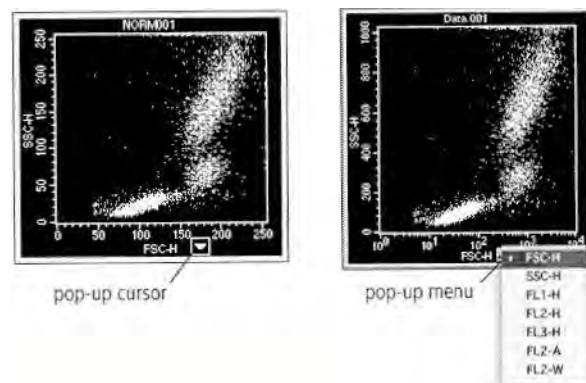


FIGURA No 3

13. Seleccionar en la paleta de herramientas el icono para cuadrantes, hacer click en el histograma No 2 y arrastrar el control para que el marcador sea fijado en 10^1 en IgG1 y 10^1 en IgG2. FIG. No 4



FIGURA No 4

14. Dar click en el segundo histograma y seleccionar **Stats > Quadrant Stats**.

Aparece un cuadro de valores estadísticos, dar click en una de las esquinas y seleccionar **Stats > Edit Quadrant Statistics**. FIG. No 5

15. Seleccionar los datos necesarios y dar **OK**

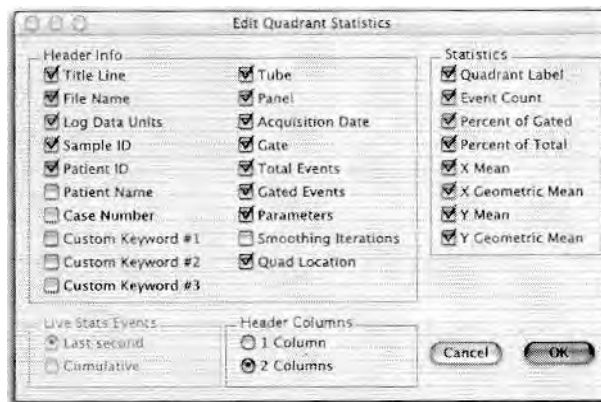


FIGURA No 5

16. Seleccionar **Acquire > Connect To Cytometer** y se abre una ventana de Acquisition control.

17. Seleccionar **Acquire > Connect To Cytometer** y dar click en **Detector/Amps, Threshold, Compensation, Status**.

Aparece cada cuadro con su respectivo nombre en la pantalla, distribuirlos espaciadamente en toda la pantalla.

18. Seleccionar **Acquire > Counters**.

Se procede al corrimiento de la muestra.

- A. Homogenizar los tubos a analizar e identificar correctamente el panel a trabajar.
- B. Poner los botones de encendido en **RUN** y **MED**.
- C. Verificar que la calibración se a la correcta (lyse wash), de no ser así restaurar la configuración de la siguiente manera: **Seleccionar Cytometer > Instrument settings**

Dar click en la ventana de **Instrument settings > open > Facstations G5 > BD Files > Instruments Settings Files > Calib File** doble click en **Set- Done**.

FIG. No 6

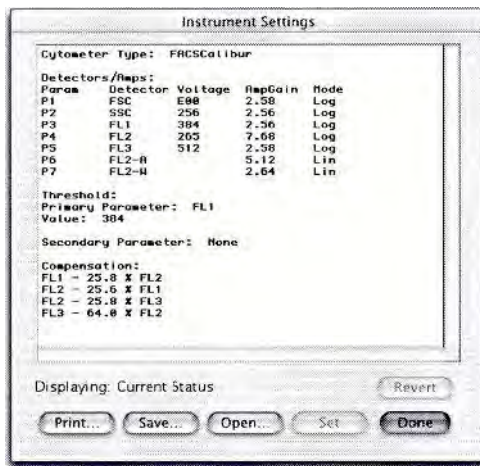


FIGURA No 6

- D. Para ajustar FSC, SSC , FSC Threshold y compensación de la muestra realizar lo siguiente: Hacer click en la ventana de adquirir (**acquisition control**) y dar click en la casilla **setup(v)**, para ver en la pantalla la dispersión de la población en tiempo real sin guardar los datos en un archivo. FIG. No 7

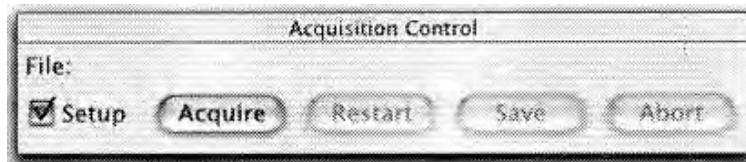


FIGURA No 7

- E. Colocar el tubo No 1 en el puerto de inyección de la muestra (Gamma 1 FITC/ Gamma 2 PE).
- F. En el histograma No 1 ajustar la población en relación con el eje X con **FSC Amp Gain (v)** que se encuentra en la ventana **Detectors/Amps**. FIG. No 8



FIGURA No 8

G. Ajustar la población en relación al eje de las Y con **SSC voltaje**. FIG. No 9



NO AJUSTADA

AJUSTADA

FIGURA No 9

H. En la ventana de **Threshold** ajustar **FSC threshold** con el deslizador correspondiente a un valor de 60. FIG. No 10

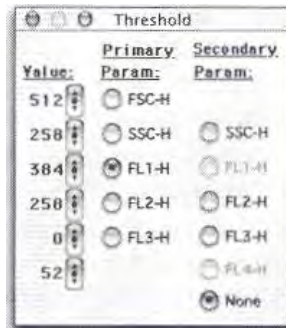


FIGURA No 10

I. Para ajustar voltajes FL1 y FL2: En el histograma No 2 observar como se distribuye la población ajustando el voltaje con **FL1 y FL2 voltages** ajustar el voltaje hasta que los eventos se agrupan en el cuadrante inferior izquierdo. FIG. No 11

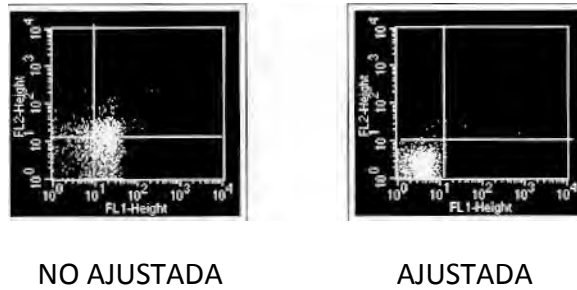


FIGURA No 11

- J. Para ajustar la compensación; colocar el tubo No 2 en el puerto de inyección de la muestra (CD 45 FITC / CD34 PE) .
- K. En el histograma No 2 ajustar **FL2 - % FL1** con CD45 FITC y con el deslizador correspondiente (FIG. No 12) ajustar la población, hacia arriba o hacia abajo, hacer click en pause y observar la población hasta que quede ajustada como se observa en la FIG. No 13

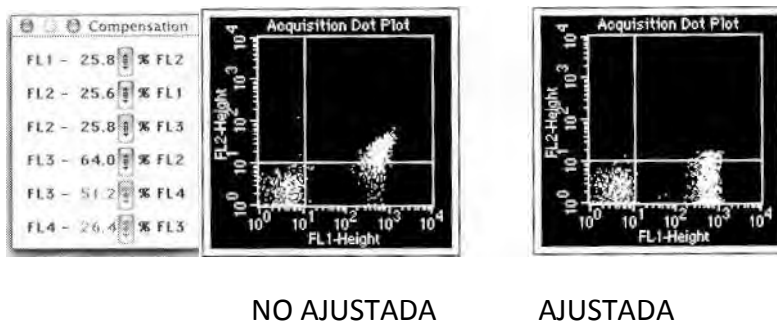


FIGURA No 12

FIGURA No 13

- L. Si es necesario ajustar **FL1 - %FL2** con la población de CD PE como lo muestra la FIG. No 14

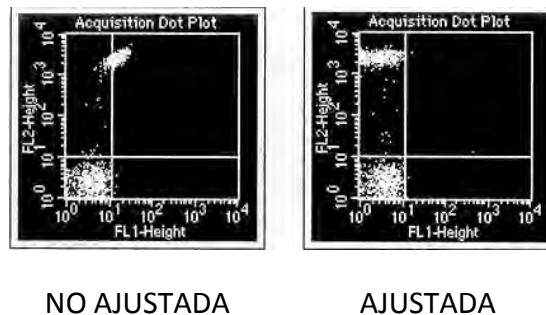


FIGURA No 14

- M. Dar click en pause y Abort en Acquisition control.
- N. Retirar el tubo e instalar un tubo con agua en el puerto de inyección.

- O. Hacer click en la ventana de adquirir (**acquisition control**) y dar click en la casilla **setup**, para empezar a adquirir la población.
- P. Una vez adquirida la población, seleccionar **Cell Quest Pro > Quit Cell Quest Pro > Don't save**, para desconectar el citómetro.
- Q. Se lava el equipo con cloro al 10%, 3 minutos con el brazo hacia afuera y 5 minutos con el brazo hacia adentro, posteriormente con agua destilada 3 minutos con el brazo hacia afuera y 5 minutos con el brazo hacia adentro.
- R. Se apaga el citómetro.
- S. Se procede a realizar los histogramas correspondientes.
- T. Se reportan los valores de los anticuerpos correspondientes, en la hoja de reporte correspondiente, haciendo una copia que se queda anexada en la carpeta correspondiente.
- U. Se reportan los valores de los anticuerpos en la bitácora de resultados de inmunofenotipo

VII. LIMITACIONES DEL MÉTODO.

a) Interferencias

Las muestras no deben ser refrigeradas, porque en algunas ocasiones presentan restos de fibrina y el frío termina por coagular la muestra, muestra hemolizada, cantidad insuficiente de muestra (menos de 3 ml)

b) Reacciones cruzadas:

No le afectan las reacciones cruzadas ya que después del corrimiento de determinado número de muestras se procede a un lavado al sistema de aspiración de la muestra.

Anexo B.

Procedimiento analítico para la determinación de TK1

TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE TIMIDINA KINASA

Para comprender un poco más a profundidad la actividad de la enzima Timidina Kinasa se ha descrito una técnica Inmunoenzimática utilizada en los laboratorios de investigación y de alta especialidad, la determinación cuantitativa de la TK1 a partir del suero o plasma humano. Tener la metodología disponible ha permitido conocer el significado e importancia clínica de la actividad enzimática de la TK1.

INMUNOENSAYOS

El Inmunoensayo es una técnica que se basa en la reacción de antígeno- anticuerpo, su gran sensibilidad y especificidad permite la cuantificación de compuestos presentes en líquidos orgánicos en concentraciones reducidas.

Los inmunoensayos utilizan un anticuerpo selecto o más para detectar analitos de interés, los analitos que se miden pueden ser aquellos que están presentes en el cuerpo naturalmente (como por ejemplo una hormona tiroidea), aquellos que el cuerpo produce pero no están típicamente presentes (como por ejemplo un antígeno de cáncer), o aquellos que naturalmente no existen en el cuerpo (como por ejemplo una droga de abuso).

Inmunoensayo competitivo

El antígeno de la muestra y el antígeno marcado (Ag*) se ponen en contacto con un anticuerpo específico en concentración limitante, compitiendo por los sitios de unión del Ac. Cuanto más Ag halla en la muestra, menos Ag* se unirá al Ac, por lo que la medida de la marca de fracción ligada es inversamente proporcional a la concentración del analito.

LIAISON® Thymidine Kinase (310960)

Finalidad

El LIAISON® Thymidine Kinase de DiaSorin41 es un inmunoensayo cuantitativo para la determinación *in vitro* de la actividad de la Timidinkinasa (TK) en suero o plasma humano. La determinación de la actividad de la timidinkinasa en suero es útil para el pronóstico y la monitorización de pacientes con malignidades hematológicas.

Los resultados del ensayo deben utilizarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar en el diagnóstico y tratamiento de estados que denoten malignidades hematológicas. El LIAISON® Thymidine Kinase está diseñado para efectuar el ensayo en el LIAISON® Analyzer totalmente automatizado.

Fundamento

El ensayo LIAISON® Thymidine Kinase es un inmunoensayo indirecto modificado de quimioluminiscencia en dos pasos, cuya finalidad es la determinación cuantitativa de la TK1 en suero y plasma humano.

El ensayo utiliza una reacción enzimática inicial en la que la TK de la muestra convierte el AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina) en AZTMP (monofosfato 3'-azido-3'-desoxitimidina), tras lo cual se realizó un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa del AZTMP. La cantidad de AZT convertida en AZTMP es una medida de la cantidad de TK1 presente en la muestra.

En el ensayo, 50 µl de la muestra se incuba con 100 µl de amortiguador 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. La mezcla se incuba durante 40 minutos y después se le agrega 100 µl de trazador, un análogo del AZTMP conjugado con un derivado de isoluminol. Timidina Kinasa

Durante la primera incubación, el AZTMP se une a la fase sólida. En la segunda incubación, el trazador conjugado compite 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 TK1 presente en los calibradores, controles o muestras.

Material

Integrador de reactivos

Partículas magnéticas (2,4 ml)	Partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos de conejo y cabra, amortiguador, ASB al 0,1 %, NaN ₃ al 0,09 %, pH 7,4.
Conjugado (12 ml)	Derivado de isoluminol en tampón, ASB al 0,2 %, NaN ₃ al 0,09 %, pH 7,4.
Amortiguador de ensayo 1 (12 ml)	Amortiguador, pH 7,4 con cofactores e IgG de conejo y cabra
Amortiguador de ensayo 2 (2,5 ml)	Tampón, pH 4,5
Número de ensayos	100
Calibrador 1 (liofilizado)	Suero humano, NaN ₃ al 0,09 % y TK1. Reconstituya con 1 ml de agua destilada o desmineralizada. Divida en partes y guarde el calibrador reconstituido a -20 °C.
Calibrador 2 (liofilizado)	Suero humano, NaN ₃ al 0,09 % y TK1. Reconstituya con 1 ml de agua destilada o desmineralizada. Divida en partes y guarde el calibrador reconstituido a -20 °C.

Obtención y preparación de muestras

Debe utilizarse suero o plasma humano. Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible. La sangre debe extraerse asépticamente por punción venosa y dejarse coagular; el suero ha de separarse del coágulo lo antes posible.

Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservadores. Las muestras que presentan partículas, turbidez, lipemia o detritus de eritrocitos pueden necesitar clarificación por filtración o centrifugación antes de la prueba.

No deben analizarse las muestras hemolizadas o lipémicas ni las que contengan partículas o presenten una evidente contaminación microbiana. El volumen mínimo requerido es de 200 μ l.

Preparación del integrador de reactivos

Antes de quitar el sello, es fundamental agitar suavemente y con cuidado el integrador de reactivos en sentido horizontal (sin formar espuma). Quite el sello y gire la rueda pequeña del compartimiento de partículas magnéticas hasta que la suspensión adopte un color marrón. Este procedimiento inicia la suspensión de las partículas magnéticas. Debe asegurarse la completa resuspensión del *pellet* de partículas. Coloque el integrador en la zona de reactivos del LIAISON® Analyzer y se deja reposar durante 30 minutos antes de utilizarlo para asegurar la completa agitación y resuspensión de las partículas.

Calibración de TK1

Cada integrador de reactivos de timidina kinasa tiene una etiqueta de código de barras con información específica sobre la calibración del lote de integrador de que se trate y debe calibrarse:

Con cada nuevo lote de reactivos (integrador de reactivos o reactivos iniciadores)

Después de una tarea de reparación o mantenimiento del LIAISON® Analyzer, si los resultados del control de calidad están fuera del rango aceptable.

Rango de medida. El ensayo LIAISON® Thymidine Kinase de DiaSorin mide entre 0,5 U/L y 100 U/L. El valor mínimo presentable es 0,5 U/L. Los valores inferiores a 0,5 U/L deben presentarse como < 0,5 U/L. El máximo valor presentable sin dilución es 100 U/L. Las muestras que superen el rango presentable deben diluirse usando el LIAISON® Thymidine Kinase Specimen Diluent y someterse de nuevo a análisis y cálculo.

Dilución de la muestra con concentración alta (> 100 U/L)

Las muestras que presenten valores mayores de 100 U/L deberán diluirse con el LIAISON® Thymidine Kinase Specimen Diluent. Una dilución recomendable sería 200 µl de diluyente + 100 µl de muestra clínica. Mezcle bien la dilución, repita el análisis y calcule la concentración final multiplicando por el factor de dilución.

Sustancias interferentes:

Los estudios controlados sobre la interferencia de otras sustancias demuestran que el resultado del ensayo no se ve afectado por colesterol (hasta 500 mg/dl), hemólisis (hasta 500 mg/dl), bilirrubina (hasta 20 mg/dl) ni triglicéridos (hasta 3000 mg/dl).

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Para asegurar el resultado correcto del ensayo, siga estrictamente las instrucciones de funcionamiento del LIAISON® Analyzer. Cada parámetro del ensayo se identifica con un código de barras en el integrador de reactivos. Si se produce un fallo de funcionamiento en el lector de código de barras, los datos pueden introducirse manualmente.

Las operaciones del analizador son las siguientes:

1. Dispensar 50µl de la muestra, el calibrador o el control en el módulo de reacción.
2. Dispensar amortiguador de ensayo 1, amortiguador de ensayo 2 y partículas magnéticas en el módulo de reacción.
3. Incubar durante 40 minutos. Timidina Kinasa

4. Dispensar el conjugado en el módulo de reacción.
5. Incubar durante 20 minutos.
6. Lavar con líquido de lavado/sistema.
7. Agregar los reactivos iniciadores y medir la emisión de luz.

El LIAISON[®] Analyzer calcula automáticamente la concentración de TK1 en la muestra. Esta concentración se expresa en U/L (Unidades/Litro).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Para obtener resultados fiables son imprescindibles una técnica experta y el estricto cumplimiento de las instrucciones. La contaminación bacteriana de las muestras o los ciclos repetidos de congelación-descongelación pueden afectar los resultados del ensayo. Los resultados del ensayo deben utilizarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar al médico a decidir qué tratamiento aplicar a cada paciente.

VALORES ESPERADOS

Con el procedimiento LIAISON[®] Thymidine Kinase se analizaron por duplicado muestras de suero de 98 individuos aparentemente sanos.

Cuadro 2: Límites obtenidos a partir del procedimiento LIAISON[®] Thymidine Kinase en una población sana

Población (N)	Media TK	5-95% observado	rango
sana (n=98)	4,3 U/L	2,0 – 7,5 U/L	

Referencias

- 1 Khalid S et al. Retrospective, Review of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: a single center experience. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 Oct-Dec; 53(4): 704-10.
- 2 Martin B, Beverly Kingsley and Adrienne Holmes Risk Factors for acute Leukemia in Children: A Review) *Environ Health perspect.* 2007 (115):138-145.
- 3 Smith MA, Ries LA, Gurney JG, et al.: Leukemia. In: Ries LA, Smith MA, Gurney JG, et al., eds.: *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995.* Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program, 1999. NIH Pub.No. 99-4649., pp 17-34
- 4 Mejía-Aranguré JM, Ortega-Alvarez MC, Farjardo-Gutiérrez A. Epidemiología de las leucemias agudas en niños 1ª parte. *Rev Med IMSS* 2005, 43:323-333.
- 5 Pérez Saldivar ML, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer.* 2011; 11: 355.
- 6 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.
- 7 Rivera luna R. Primer consenso de leucemia aguda linfoblástica pediátrica en México. *Rev Invest Clin.* 1997 (49): 309-16.
- 8 Dirección General de Información en Salud. Estadísticas de salud en niños y adolescentes. Mexico, D.F.: *Bol Med Hosp Infant Mex*; 2004. Report No.4.

9 Medina Sanson A, Martinez-Avalos A, Gallegos-Castorena S, et al. Pediatric oncology at Hospital Infantil de Mexico: fifty-five years of accomplishment. *Pediatr Hematol Oncol* 2002 Sep; 19(6):383-7.

10 Smith MA, Ries LA, Gurney JG, y cols. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program, 1999. NIH Pub.No. 99-4649., pp 17-34

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

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

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

14 Coronel MRC. Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia. *Acta Pediatr Mex.* 2005; 26(3): 129-36.

15 Pui C-H, Raimondi SC, Srivastava DK, Tong X, Behm FG, Razzouk B, Rubnitz JE, Sandlund JT, Evans WE, Ribeiro R. Prognostic factor in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2000; 14: 684-87.

16 Ruiz Argüelles, 3ra edición, *Fundamentos de Hematología;* "Leucemias Agudas" pg. 225 - 245

17 Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100 (7): 2292-302, 2002

18 Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al.: A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 17 (2): 277-82, 2003.

- 19 Miller D, Coccia P, Bleyer W y cols. Early response to induction therapy as a predictor of disease-free survival and late recurrence of childhood acute lymphoblastic leukemia. A report from the children Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1807-15.
- 20 Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, Sultan C (1976). «Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group». *Br J Haematol* 33 (4): pp. 451-8
- 21 McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE et al.- Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol*. 2005; 23(369): 9067-72.
- 22 O'Neill KL, Buckwalter MR and Murray BK: Thymidine kinase: diagnostic and prognostic potential. *Expert Rev Mol Diagn* 1: 428-433, 2001.
- 23 Gruyberger-Saal SK, Cunliffe HE, Carr KM, Hedenfalk IA. (2006). Microarrays in breast cancer research and clinical practice--the future lies ahead.. *Endocr relat cancer*, 13(4):1017-31.
- 24 Cigna: Markers for diagnosis and management of cancer. USA, <http://www.cigna.com>. Accessed february 28, 2014.
- 25 Hazra, S; Sabini, E; Ort, S; Konrad, M; and Lavie, A. (2009) Extending thymidine kinase to the catalytic repertoire of human deoxycytidine kinase. *Biochemistry*, 48:1256-1263.
- 26 Segura –Peña, D; Lutz, S; Monnerjahn, C; Konrad, M; and Lavie, A. (2007). Binding of ATP to TK1-like enzymes is associated with a conformational change in the quaternary structure. *J. Mol. Bio*, 369: 129-141
- 27 Welin, M; Kosinska, U; Mikkeksen, N; Carnrot, C; Zhu, C; Wang, L; Eriksson, S; Munch-Petersen, B; and Eklund, H. (2004) Structures of thymidine kinase 1 of human and micoplasmic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (52): 17970-17975.

28 Sandrini, MPB and Piskur, J. (1995) Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction. *Trends Biochem, Sci*, 30; 5 225-228

29 Wakazono, Y; Kubota M, Sano, H; Matsubara, K; Hirota, H; Kuwakado K; Adachi, S. (1994). Different effect of thymidine kinase los son TTP pools; comparison among human leukemia cell lines. *Mutation Res*, 304:29-300.

30 Chen, Y-L., Eriksson, S., and Chang, Z. (2010) Regulation and functional contribution of Thymidine Kinase 1 repair of DNA damage. *J. Biol. Chem*, 285.,35:27327-27335

31 Gasparri, F; Wang N; Skong, S; Galvani, A; Eriksson S. (2009) Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan TM assays. *Eur. J. Cell. Biol*, 88:779-785

32 Mikulits, CJ; Hengstschlagers, M; Sauer, T; Wintersberger, E; Mullner, EW. (1996). Overexpression of thymidine Kinasa mRNA eliminates cell cycle regulation of thymidine kinase enzyme activity. *J. Bio. Chem*, 271:2, 853-860.

33 Aufderklamm S, Todenhöfer T, Gakis G, Kruck S, Hennenlotter J, Stenzl A, Schwentner C. (2012) Thymidine kinase and cancer monitoring. *Cancer Letters* 316 (2012) 6–10

34 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.

35 Madewell BR. Serum thymidine kinase activity: an alternative to histologic markes of cellular proliferation in canine lymphoma. *J Vet Intern Med*. 2004; 18(5): 595-6.

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

37 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.

38 Birringer, S.M., Perezzo, R., Kut, E., Stillhart, C., Surber, W., et al. (2006). High-level expression and purification of human thymidine kinase 1: Quaternary structure, stability and kinetics. *Protein expression and Purification* 47. 506-515

39 Munch-Petersen, B., Cloos L., Jensen H.K. Tyrsted G. (1995). Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Advan. Enzyme Regul.* Vol. 35, pp 69-89

40 O'Neill, K.L.O., Zhang, F., Fuja, D.G. and Murray, B.K. (2007). Thymidine Kinase 1- A pronostic and diagnostic en ALL and AML patients. *Leukemia* 21, 560–563.

41 Crystal structure of a tetramer of thymidine kinase from urea plasma urea lyticum in complex with thymidine (2008)

42 Wu CJ, Yang RJ, Zhou J, Bao S, Zou L, Mao YR and He Q: Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from humaN thymidine kinase 1. *J Immunol Methods* 277: 157-169, 2003.

43 Ondrej Topolcan † & Lubos Holubec Jr The role of thymidine kinase in cancer diseases *Expert Opin. Med. Diagn.* (2008) 2(2):129-141

44 Gronowitz J.S., Fischer L.N., Källander C.F.R. (s.f.). Thymidine kinase: Biochemical Background and Clinical Applications. II. The Quantitative assay for TK and its clinical use. *Biovica AB*. Uppsala Science Park, S-751 83.

45 Carlsson. L., Larsson A., Lindman H. (2009). Elevated levels of thymidine kinase 1 peptide in serum from patients with breast cancer. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 114: 116-120

46 Gronowitz JA, Hagberg H, Källander CFR. The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker and in the monitoring of patients with non Hodgkin's lymphoma. Br J Cancer. 1983; 47:487-495.

47 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.

48 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.

49 National Committee for Clinical Laboratory Standards. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Second Edition*. NCCLS document C28-A2 (ISBN 1-56238-406-6).

50 Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. Hematol Oncol Clin N Am.2009; 23:655-674.

51 Pérez Saldivar ML, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. BMC Cancer. 2011; 11: 355.

52 Topolcan O, Holubec L, Kausitz J, et al. Thymidine kinase monitoring importance in the routine clinical practice. Anticancer Res 2004 ; 24 (5D): 3655 -6

53 Golias, C. H; Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos K.(2004). Cell proliferation and Cell Cycle Control: a mini review. Int J Clin Pract, 58, 12:1134-1141.

54 Oudot C, Auclerc MF, Levy V, et al. Prognostic factors for leukemic induction failure in children with acute lymphoblastic leukemia and outcome after salvage therapy: the FRALLE 93 study. J Clin Oncol. 2008; 26:1496-503