



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO “LA RAZA”

“Determinación de Caspasa 3 activada, Bcl-2, CD95 y Glicoproteína-P como factores asociados a respuesta al tratamiento en pacientes con Leucemia

Aguda de novo”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN

HEMATOLOGÍA

PRESENTA:

BRENDA LETICIA GONZÁLEZ GARCÍA

Asesores:

D. en C. LAURA ARCELIA MONTIEL CERVANTES

D. en C. JORGE VELA OJEDA

MÉXICO, D.F. 2015





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.

DR. JESÚS ARENAS OSUNA
DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD

DR. JORGE VELA OJEDA
Titular del curso universitario de Hematología

DRA. BRENDA LETICIA GONZÁLEZ GARCÍA
MÉDICO RESIDENTE DE HEMATOLOGÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"

PROTOCOLO NÚMERO R-2012-3501-97

ÍNDICE

Resumen	4
Antecedentes Científicos	6
Material y Métodos	16
Resultados	18
Discusión	27
Conclusión	30
Bibliografía	31
Anexos	36

RESUMEN

Título. Determinación de Caspasa-3 activada, Bcl-2, CD95 y Glicoproteína-P como factores asociados a respuesta al tratamiento en pacientes con Leucemia Aguda *de novo*.

Material y Métodos. Estudio observacional, prospectivo, longitudinal, descriptivo de febrero de 2013 a febrero de 2014. Se obtuvieron muestras de sangre periférica y médula ósea de pacientes con Leucemia Aguda *de novo*. Se midió la expresión de Caspasa-3-activada, Bcl-2, CD95 y Glicoproteína-P y se evaluó respuesta a tratamiento a un mes. Análisis estadístico: análisis descriptivo.

Resultados. Se incluyeron 36 pacientes, 22 mujeres y 14 hombres, con edad promedio de 44.7 años. 12 pacientes tuvieron Leucemia Linfoblástica Aguda, 20 Leucemia Mieloide Aguda, 4 Leucemia Aguda Bifenotípica. De 30 pacientes que iniciaron quimioterapia sólo 19 la completaron. 6 alcanzaron remisión completa y 13 fallaron a la inducción. No se relacionó la expresión de las proteínas medidas con la remisión completa a un mes de tratamiento. Su expresión mayor o menor a los valores de corte tuvo impacto en la SG: Caspasa-3-activada 1.2 contra 6.9 meses ($p=0.002$); Bcl-2 3.6 contra 10.2 meses ($p=0.031$); CD95 0.3 contra 5.7 meses ($p=0.000332$); Glicoproteína-P 5.7 contra 0.4 meses ($p=0.007$). La SG fue de 5.4 ± 1.1 meses (IC 95%, 3–7.7 meses); quienes alcanzaron remisión completa tuvieron SG de 10.5 ± 3 meses (IC 95%, 4.6-16.6) contra 7 ± 1 (IC 95%, 3.6-10, $p=0.424$).

Conclusión. No hubo asociación entre la expresión de las proteínas y la remisión completa. La tasa de respuesta completa tras la inducción a la remisión es baja, con alta mortalidad temprana.

Palabras clave: leucemia aguda, caspasa 3 activada, Bcl-2, CD95, glicoproteína-p, respuesta a tratamiento.

ABSTRACT

Title. Determination of activated caspase-3, Bcl -2, P-glycoprotein and CD95 as factors associated with treatment response in patients with *de novo* acute leukemia.

Material and Methods. Observational, prospective, longitudinal, descriptive study from February 2013 to February 2014. Peripheral blood and bone marrow samples were drawn from patients with *de novo* acute leukemia. We measured the expression of activated caspase-3, Bcl-2, P-glycoprotein and CD95 and correlated them to treatment response assessed at one month. Statistical analysis: descriptive analysis.

Results. We included 36 patients, 22 women and 14 men, mean age of 44.7 years. 12 patients had acute lymphoblastic leukemia, 20 acute myeloid leukemia, 4 biphenotypic acute leukemia. Out of 30 patients who started chemotherapy, only 19 completed induction treatment. 6 achieved complete remission and 13 had induction failure. The protein expression measurements had no correlation with complete remission after first month of treatment. Proteins' expression over or below de cutoff value did have an impact on Overall Survival (OS): activated Caspase-3 1.2 versus 6.9 months ($p=0.002$); Bcl-2 3.6 versus 10.2 months ($p=0.031$); CD95 0.3 versus 5.7 months ($p=0.000332$); P-glycoprotein 5.7 versus 0.4 months ($p=0.007$). The OS was 5.4 ± 1.1 months (95% CI, 3-7.7 months); for those who achieved complete remission the OS was 10.5 ± 3 months (95% CI, 4.6-16.6) versus 7 ± 1 (95% CI, 3.6-10, $p=0.424$).

Conclusion. There was no association between the expression of proteins and complete remission. The rate of complete response after induction therapy is low, with high early mortality.

Keywords: acute leukemia, activated caspase-3, Bcl-2, CD95, P-glycoprotein, treatment response.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

Las leucemias agudas (LA) son enfermedades que se caracterizan por la proliferación maligna de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico, cuya acumulación progresiva se acompaña de una disminución en la producción de los elementos de la hematopoyesis normal. El diagnóstico se basa en la observación de una cuenta de células blásticas en médula ósea que iguale o supere el 20% de la totalidad celular según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). ⁽¹⁾.

Epidemiología y etiología

Las leucemias presentan una incidencia de 10 por cada 100,000 habitantes por año en Estados Unidos de América (EUA). En México, el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM) de la Dirección General de Epidemiología ⁽²⁾, informa en el 2001 una tasa de morbilidad para Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en hombres de 1.5 y en mujeres de 1.2 por cada 100,000 habitantes; en el reporte de 2002, informa un total de 108,064 casos por año para tumores malignos, de los cuales 2,837 correspondieron a leucemias, y de todos estos 1,720 casos correspondieron a LLA (1.59%). En relación a las Leucemias Mieloides Agudas (LMA) tienen una incidencia que aumenta exponencialmente con la edad; de menos de un caso por cada 100,000 habitantes en personas menores de 30 años, a 14 casos por cada 100,000 a los 75 años. El índice de mortalidad nacional por tumores malignos reportado por el RHNM del 2002 en las LMA fue de una tasa de 1.1 que representó un porcentaje de 1.93%, es decir, que de 1,129 defunciones al año, 522 fueron mujeres y 607 fueron hombres, mientras que en las LLA la tasa fue de 1.5 y el porcentaje de 2.67%, es decir, 1,564 defunciones de las cuales 895 fueron hombres y 669 fueron mujeres. El grupo de edad en el que se presentó mayor mortalidad por tumores malignos fue en el de más de 65 años y la entidad federativa con mayor distribución de leucemia fue el D.F. ⁽²⁾. Entre los factores asociados como causa de cáncer se encuentran la predisposición genética, las radiaciones ionizantes, sustancias químicas, fármacos y virus que pueden dañar el DNA originando mutaciones que transforman a las células normales en tumorales ^(3, 4, 5, 6).

En la actualidad, el conocimiento de las leucemias agudas ha evolucionado de forma importante. De acuerdo con los criterios establecidos por la OMS, para un paciente *de novo* se debe realizar su clasificación mediante estudios morfológicos, inmunofenotípicos y citogenéticos así como tomar en consideración sus características clínicas, con el fin de establecer un tratamiento específico.

Clasificación General

Las características de las células leucémicas pueden ser evaluadas por microscopía óptica, expresión de enzimas citosólicas y de antígenos de superficie; estas características permiten poner de manifiesto el linaje y el grado de madurez de la clona leucémica ^(7, 8). Así, las leucemias pueden ser clasificadas con base en el tiempo de evolución de la enfermedad en agudas o crónicas, y cada una de estas puede ser clasificada a su vez en linfoide o mieloide, de acuerdo con el tipo de célula involucrada ⁽⁹⁾.

La etiología de las leucemias se desconoce, sin embargo se proponen algunos factores de riesgo como son: la radiación, que puede inducir daños genéticos a los precursores hematopoyéticos; las drogas y compuestos químicos que pueden lesionar a la médula ósea ⁽¹⁰⁾; la genética, ya que la incidencia de leucemia se incrementa cuando existen alteraciones cromosómicas; y los virus, dado que algunas leucemias se asocian con virus linfotrópicos de las células T humanas ^(10, 11).

El comportamiento clínico de la enfermedad, la morfología, las alteraciones citogenéticas y el inmunofenotipo celular, son las características que toma en consideración la OMS ⁽¹⁾ para poder clasificarlas en:

A. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B.

t(9;22)(q34;q11); fusión del gene BCR/ABL

t(4;11)(q21;q23); fusión del gene MLL-AF4

t(1;19)(q23;p13.3); fusión del gene EA2/PBX1

t(12;21)(p13;q22); TEL/AML1

Leucemia linfoblástica aguda de precursores de células T.
Leucemia de células de Burkitt.

B. Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

LMA con anormalidades genéticas recurrentes

LMA con t(8;21)(q22;q22),(AML1/ETO).

LMA con eosinofilia en médula ósea e inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22).

Leucemia Promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12), PML/RAR-alfa y variantes.

LMA con 11q23

LMA con displasia de multilinaje

Seguidas de un síndrome mielodisplásico o de una enfermedad mieloproliferativa.

Sin antecedentes de síndromes mielodisplásicos o enfermedades mieloproliferativas, pero con displasia de un mínimo de 50% de las células en dos o más estirpes celulares.

LMA relacionada a terapia y a síndromes mielodisplásicos.

Agentes alquilantes y radiación

Inhibidor de topoisomerasa II.

LMA clasificadas por otro nombre

LMA mínimamente diferenciada

LMA sin maduración

LMA con maduración

Leucemia mielomonocítica Aguda

Leucemia monoblástica o monocítica aguda

Leucemia eritroide aguda (variantes eritroide/mieloide y eritroleucemia pura)

Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia basofílica aguda

Panmielosis aguda con mielofibrosis

Sarcoma mieloide.

C. Leucemia Bifenotípica Aguda.

En estudios realizados por el grupo Italiano, Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) ⁽¹²⁾, se combina la citogenética y la información molecular de los pacientes adultos con LLA, para definir su perfil genético y determinar el impacto de las señales moleculares y citogenéticas, y categorizar el siguiente subgrupo molecular:

Cariotipo normal, t(9;22)/BCR-ABL, t(4;11)/MLL-AF4, t(1;19)/E2A-PBX1, del 9p/p15-p16, del 6q, misceláneas, hiperdiploidias, del p9, del p15, del p16.

En este estudio se observó que los pacientes sin anomalías cromosómicas y aquellos que tenían deleciones aisladas 9p, 15p y 16p, mostraron una mejoría favorable relativa, con una mediana de supervivencia libre de enfermedad (SLE) mayor a tres años. La t(9;22)/BCR-ABL y la t(4;11)/MLL-AF4, T(1;19)/E2A-PBX1 definieron un grupo con pronóstico desfavorable con una SLE de 7 meses, mientras que las deleciones 6q, aberraciones misceláneas y las hiperdiploidías predijeron un pronóstico intermedio con una SLE de 19 meses. En este estudio se resalta la importancia de realizar tanto el perfil citogenético como molecular de la LLA del adulto desde el inicio de la enfermedad, como una determinante independiente de su curso, lo que permite llevar a cabo un manejo óptimo de estos pacientes ^(12, 13).

Una de las clasificaciones más empleada en la leucemia aguda linfoblástica fue la realizada por el grupo Europeo para la caracterización de las leucemias agudas (EGIL) la cual las clasifica con base en los marcadores de línea expresados según su grado de maduración. (Tabla 1) ⁽¹⁴⁾

Tabla 1. Subtipos Inmunológicos de leucemia aguda de acuerdo a los criterios del grupo Europeo EGIL ⁽¹⁴⁾.

Puntaje	Linaje B	Linaje T	Linaje mieloide
2	cCD79a cIgM CD22	cCD3 TCR□□	cMPO Lisozima
1	CD10, CD19, CD20	CD2, CD5, CD8	CD13, CD33, CDw65
0.5	TdT, CD24	TdT, CD7, CD1a	CD14, CD15, CD64

Criterio > de 2 puntos.

Sin embargo aún se sigue considerando la clasificación Franco Americano Británico (FAB) (Tabla 2) y EGIL para el diagnóstico de la leucemia aguda mieloblástica y linfoblástica respectivamente.

Tabla 2. Clasificación de leucemia aguda linfoblástica (LLA) y mieloblástica (LMA) de acuerdo a los criterios del grupo Franco-Americano-Británico (FAB) ⁽¹⁵⁾.

Leucemia Aguda Linfoblástica (Características)			
	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Grandes y heterogéneas	Grandes y homogéneas
Cromatina	Homogénea	Variable y heterogénea	Homogénea y en punteado fino, mitosis en >5%
Forma del núcleo	Regular	Irregular: hendido	Regular: oval o redondo
Nucléolos	Pequeños, no aparentes	Uno o más evidentes	Uno o más aparentes
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligera	Variable	Muy intensa
Vacuolización	Variable	Variable	Prominente

Leucemia Aguda Mieloide (Características)					
Subtipo FAB	Denominación	Diferenciación predominante	Blastos (%)	Componente Granulocítico (%)	Componente Monocítico (%)
M0	Mieloide aguda con mínima diferenciación	----- --	> 30		
M1	Mieloide aguda sin maduración	Granulocítica	> 90 > 3 MPO o NS+	< 10	< 10
M2	Mieloide aguda con maduración	Granulocítica	30-89	> 10	< 20
M3	Promielocítica (forma granular)	Granulocítica	> 30 promielocitos anómalos con bastones de Auer		
M3v	Promielocítica (forma microgranular)	Granulocítica	> 30 promielocitos anómalos con gránulos no visibles, astillas ocasionales		
M4	Mielomonocítica aguda	Granulocítica y Monocítica	> 30		
M4 eos	Mielomonocítica aguda (variante con eosinófilos)	Granulocítica y Monocítica	> 30 eosinófilos atípicos	> 20	> 20
M5a	Monoblástica aguda	Monocítica	> 30		
M5b	Monocítica	Monocítica	> 30	< 20	>80 (monoblastos)
M6	Eritroleucemia	Eritrocítica y Granulocítica	> 30 mieloblastos sobre CNE > 50% de eritroblastos	< 20	<80 (monoblastos)
M7	Megacarioblástica	Megacariocítica	> 30		

Resistencia a Drogas en Leucemias Agudas

La resistencia a drogas es la principal causa del fracaso a la quimioterapia, y por consiguiente, de la muerte del paciente oncológico. A pesar del uso de la combinación de quimioterapias el fracaso al tratamiento se ha observado en enfermos con patologías tanto linfoides como mieloides en quienes las recaídas ocurren en más de la mitad de los casos, como sucede en LMA y LLA del adulto. La resistencia a las drogas puede ser debida a causas intrínsecas y extrínsecas ⁽¹⁶⁾. La resistencia extrínseca corresponde a la incapacidad de la droga para reaccionar con la célula tumoral: la administración oral de quimioterapia se acompaña de una amplia variación en la biodisponibilidad de la droga, observándose diferencias que varían entre un paciente y otro ⁽¹⁷⁾. Además, los defectos en la vascularización del tumor que se observan frecuentemente en los tumores sólidos, también son relevantes para los de origen hematológico ⁽¹⁸⁾.

La resistencia intrínseca se debe a las propiedades de la célula tumoral; el mecanismo ocurre principalmente por la presencia de proteínas de resistencia a drogas que provocan la salida de aquella que previamente había penetrado a las células tumorales. Se propone que esto se debe a un defecto en la apoptosis inducida por drogas y que podría originarse por incremento en las señales antiapoptóticas y/o incremento en las proteínas antiapoptóticas (ej: Bcl-2), o a disminución en las proteínas pro-apoptóticas (ej: bax) ^(16, 19). La primera proteína y mejor descrita en los modelos celulares de multirresistencia a drogas (MDR) es la glicoproteína P (GpP), codificada por el gene ABC B1 (MDR1). Esta proteína transmembranal pertenece a la superfamilia de las proteínas ABC (ATP Binding Cassette), especializadas en el transporte celular dependiente de energía ⁽²⁰⁾.

Desde 1997 se ha propuesto en consenso la recomendación para medir la GpP ⁽²¹⁾. En estudios multicéntricos realizados en pacientes con leucemia aguda se ha estudiado a esta GpP ⁽²²⁾ y se ha demostrado que entre una tercera parte y la mitad de los casos son positivos a GpP al diagnóstico, fenómeno que ocurre más frecuentemente en los pacientes de edad avanzada, ya que al aumentar la edad aumenta también la multirresistencia a drogas. Leith informó en su trabajo 17% de

positividad para CD243 (GpP) entre los pacientes menores de 35 años, 27% para pacientes entre 35 y 50 años, 39% en pacientes mayores a 50 años y 71% en un grupo con una mediana de edad de 68 años ⁽²³⁾. El fenotipo de GpP se ha asociado con la expresión de marcadores de mal pronóstico tales como CD34 y CD7 ⁽²⁴⁾. En estudios realizados ⁽²⁵⁾ en pacientes con LMA mayores de 60 años, se encontró una asociación entre la expresión de GpP con una baja frecuencia de remisión completa, disminución de la supervivencia global (SG) y de la supervivencia libre de enfermedad (SLE), por lo que se recomienda realizar la determinación de este marcador desde el inicio de la enfermedad, para tener una idea de la posibilidad de respuesta o no al tratamiento quimioterapéutico. Klymenko SV y cols estudiaron en pacientes con LMA asociada a la radiación (Chernobyl): presencia simultánea de Fas- , Bcl-2+ y MDR+ ⁽²⁶⁾; Guenova ML y cols observaron que patrones antiapoptóticos (Caspasa-3-activada, Bcl-2) correlacionan con GpP elevada en pacientes con LMA ⁽²⁷⁾; Wang H y cols estudiaron al inhibidor del proteasoma (bortezomib) que afecta la expresión del gen de MDR1 en una línea celular leucémica K562/DNR y demostraron que la concentración de droga intracelular aumentó y la apoptosis se indujo ⁽²⁸⁾. Por otro lado, De Morales AC y cols estudiaron dos grupos de pacientes: un grupo de pacientes adultos con LA *de novo* en el que informaron que a mayor edad, mayor expresión del gen MDR1; y en el grupo pediátrico, observaron que los niveles de sobreexpresión de MDR1 se asociaron con niveles altos de CD34 ⁽²⁹⁾.

Con respecto al estudio de las proteínas: Caspasa 3 activada, CD95 y bcl-2 que participan en la apoptosis, se sabe que en ésta, el estímulo de muerte activa una cascada bioquímica de proteasas las cuales destruyen moléculas que son requeridas para la supervivencia celular; durante este proceso el citoplasma se condensa, las mitocondrias y los ribosomas se agregan, el núcleo se condensa y la cromatina se agrega. Después de su muerte, la célula se fragmenta en “cuerpos apoptóticos” y el DNA cromosómico se rompe enzimáticamente en fragmentos internucleosomales de 180 pares de bases que provocan finalmente la destrucción de la célula ⁽³⁰⁾. Otras características de la apoptosis son la reducción en el potencial de membrana de la mitocondria, acidificación intracelular, generación de radicales libres y externalización de residuos de fosfatidilserina ⁽³¹⁾.

A principios de 1993, una serie de estudios hechos en el nematodo *Caenorhabditis elegans* revelaron que varios genes controlan la muerte celular ⁽³²⁾. En este gusano se requieren de cuatro genes para la ejecución ordenada de la apoptosis. Los genes *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *egl-1* son los que regulan la muerte celular. Los homólogos de *ced-3* (caspasas), *ced-4* (Apaf - 1), *ced-9* (Bcl-2) y *egl-1* (BH3 solamente proteínas) ya se han identificado en metazoarios ^(33, 34). Las principales interventoras en el programa apoptótico son proteasas conocidas como caspasas (cisteína-dependiente, aspartato-proteasa específico) ^(31, 35). Las caspasas son cisteín proteasas homólogas al producto génico *ced-3* del nemátodo. Se han identificado más de 14 miembros de la familia de las caspasas, de los cuales 11 o 12 están presentes en los humanos ⁽³⁶⁾, dependiendo de ciertos polimorfismos hereditarios. Las caspasas directa e indirectamente dirigen los cambios morfológicos de la célula durante la apoptosis. Al disminuir el nivel de citocinas que suprimen la apoptosis en células malignas, se podría mejorar la terapia anticancerígena ⁽³⁷⁾. De acuerdo con la familia de proteínas de Bcl-2 (B cell lymphoma-2), el genoma humano codifica para la síntesis de 25 miembros de esta familia de genes, de los cuales solamente seis son antiapoptóticos; la sobreexpresión de varias de estas proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, se ha documentado en varias enfermedades hematológicas malignas ^(38, 39,40).

La familia Bcl-2 interviene en la regulación de la liberación del citocromo c mitocondrial, el cual es un miembro de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, que se requiere para la generación de ATP y además es un importante disparador de la cascada de caspasas. El citocromo c regula la activación de las vías de muerte celular que ocurren si el citocromo c se libera de la mitocondria al citoplasma. En el citoplasma, el citocromo c se une a Apaf-1 para formar el apoptosoma (complejo molecular que contiene citocromo c, Apaf-1, ATP y procaspasa 9). El apoptosoma activa a caspasa 9, un iniciador de apoptosis ^(33, 41). Este mecanismo regula la liberación del citocromo c, paso importante en la iniciación de la apoptosis (figura 1) ⁽⁴²⁾.

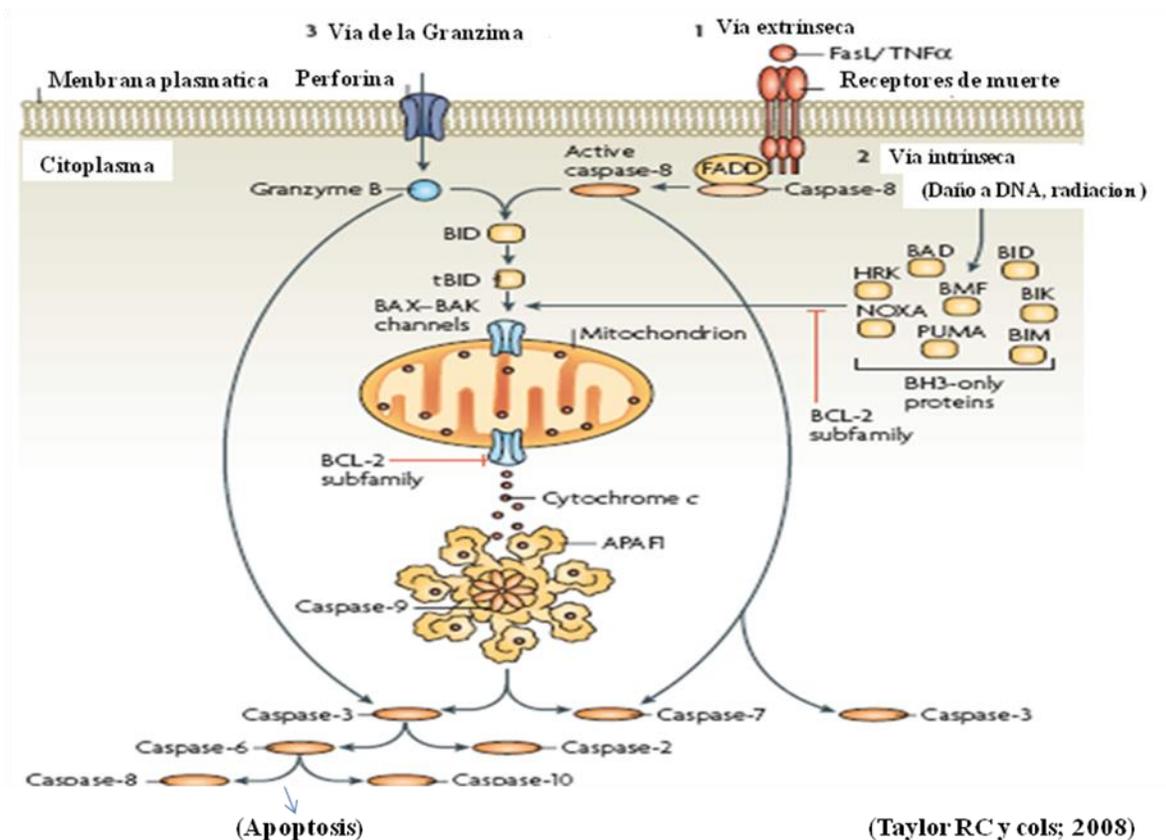


Figura No 1. Principales vías de apoptosis. (42).

La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 es el resultado de la translocación t(14;18) que involucra al gen BCL-2 y ocurre en 80-90% de los linfomas no Hodgkin foliculares de bajo grado (43). La apoptosis puede ocurrir en respuesta a un número de estímulos fisiológicos o patológicos (TNF, Fas ligando y drogas citotóxicas que dañen DNA). Estudios realizados por Hafez M y cols en LLA pediátrica observaron que la apoptosis fue más baja en los pacientes que en los controles, al inhibir Bcl-2 y estimular CD95, por lo que podrían tener un beneficio terapéutico (44). Vrbanush y cols informaron que Fas (CD95) regula las señales apoptóticas y Bcl-2 antiapoptóticas y que ambos son frecuentemente observados en células leucémicas de LMA M4/M5 (45). En estudios pediátricos con LLA utilizando CD95 y Bcl-2 (basal y 6 meses postQTx) sugieren que estas proteínas de señalización que intervienen en la apoptosis podrían tener impacto predictivo sobre el tratamiento (46).

Para la activación de las caspasas se requiere la participación de inhibidores intracelulares como los de la familia de proteínas de Bcl-2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). La alteración en el balance normal de estas proteínas, favorece la supervivencia de las células tumorales, como es conocida ya la deficiencia de caspasa 9 en las células leucémicas de Jurkat ⁽⁴⁷⁾.

Las citocinas y algunos otros compuestos pueden reprogramar el desarrollo anormal de la leucemia, por lo tanto, las células leucémicas pueden diferenciarse y madurar. Los factores estimulantes de colonias (CSFs) inducen la viabilidad celular y la multiplicación celular. Desde que se descubrieron estos factores estimulantes de colonias, se han encontrado otras citocinas que actúan sobre la línea mieloide, incluyendo al factor de células tallo (SCF) y la trombopoyetina, algunas de las cuales pueden sinergizar con diferentes CSFs ⁽⁴⁸⁾.

El antígeno CD117, conocido como c-kit o receptor del factor de célula tallo, es un receptor transmembrana tirosin-cinasa el cual se ha demostrado que tiene un papel fundamental en la proliferación, diferenciación y supervivencia de tejidos hematopoyéticos normales y leucémicos ^(49, 50). Este antígeno se encuentra con mayor frecuencia en células progenitoras de la médula ósea, en el 80% de las LMA *de novo*, particularmente en las variantes más inmaduras de la FAB, en Leucemia Mieloide Crónica en fase blástica y en LMA secundaria a Síndrome Mielodisplásico ⁽⁵¹⁾. Las LLA generalmente tienen una baja expresión de este marcador, y se ha asociado más a Leucemias Linfoblásticas de linaje T. Una activación aberrante de este receptor resulta en señalización desregulada, asociándose a un pronóstico adverso.

Schwarz y cols reportaron que la expresión de CD117 carece de significado pronóstico en las LMA ⁽⁵²⁾, no obstante estudios más recientes le han asociado con las leucemias designadas *Core Binding Factor*, que característicamente son aquellas LMA-M2 t(8;21) y LMA-M4Eo con inv(16), y que se asocian a pronóstico favorable. Así mismo, se han descrito mutaciones puntuales en *c-kit* en estas mismas variantes leucémicas, lo cual cobra relevancia clínica, puesto que son blancos terapéuticos que ya están en desarrollo.^(53, 54)

MATERIAL Y MÉTODOS

Objetivo general

Determinar la asociación de: caspasa-3-activada, Bcl-2, CD95 y glicoproteína P, con la respuesta a tratamiento, de pacientes con leucemia aguda *de novo*.

Objetivos específicos

- Determinar la expresión de la caspasa-3-activada, CD95 (Fas), Bcl-2 y de glicoproteína P en las células blásticas de pacientes con leucemia aguda *de novo*.
- Correlacionar con la recuperación de la médula ósea el porcentaje de células blásticas al mes de tratamiento.

Diseño del estudio. Observacional, prospectivo, longitudinal, descriptivo.

De febrero de 2013 a febrero de 2014 se obtuvieron muestras de sangre periférica y médula ósea de pacientes con Leucemia Aguda *de novo* del Servicio de Hematología en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza. Se realizó la determinación de Caspasa-3-activada, Bcl-2, CD95 y Glicoproteína-P al diagnóstico mediante citometría de flujo. Los resultados se registraron en la hoja de captura de datos. Se capturaron los datos demográficos en la hoja de datos y se dio seguimiento al tratamiento de inducción a la remisión y la evaluación de respuesta tras un mes (término de inducción a la remisión). Posteriormente se dio seguimiento a los casos para conocer el estado del paciente (vivo o muerto, recaída). Los datos fueron vaciados en la hoja de recolección de datos para su análisis estadístico.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión.

- Pacientes mayores de 16 años con diagnóstico clínico, morfológico y citoquímico (OMS) de leucemia aguda *de novo* que ingresen al servicio de Hematología del HECMNR de Febrero de 2013 a Febrero de 2014.
- Médula ósea (MO) con celularidad > 1000 células blásticas/microL.

Criterios de no inclusión.

- Pacientes mayores de 16 años con diagnóstico clínico, morfológico y citoquímico (OMS) de leucemia aguda secundaria a síndrome mielodisplásico (SMD), que se encuentren en fase blástica de cualquier tipo de proceso mielo o linfoproliferativo crónico que ingresen al servicio de Hematología del HECMNR.
- MO con celularidad < 1000 células blásticas/microL.

Criterios de eliminación.

- Pacientes que se pierdan durante el seguimiento al tratamiento.

Análisis de Datos

Se realizó un análisis descriptivo de la información utilizando medidas de proporciones, tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, mediana, percentiles 25 y 75%). Se determinaron valores de corte de las proteínas mediante curvas ROC. Se establecieron grupos con respecto a la expresión de las proteínas mayor o menor al punto de corte y a la mediana medida por el Laboratorio de Hematología del HECMNR. Con prueba de χ^2 se compararon los grupos de cada proteína con remisión completa. Con prueba de Kaplan-Meier se hicieron análisis de supervivencia. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características clínicas y biológicas

De febrero de 2013 a febrero de 2014 un total de 52 pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda de *novo* se registraron en el HECMNR, de los cuales 36 pacientes cumplieron con los criterios de inclusión para el estudio y cuentan con la medición de los moduladores de apoptosis al diagnóstico. La media para la edad fue de 44.7 años (rango 16 – 74 años), con 22 mujeres y 14 hombres. Las variantes de leucemia fueron 12 casos (33.3%) de LLA, 20 (55.6%) de LMA y 4 (11.1%) de LA Bifenotípica. Se identificaron a 26 pacientes (72.2%) como riesgo alto y a 6 pacientes (16.7%) de riesgo estándar o intermedio, y 4 pacientes de LMA no fueron clasificados por falta de estudio citogenético. El 30.6% (11 pacientes) tenían comorbilidades al diagnóstico (4 con Diabetes Mellitus tipo 2, 4 con Hipertensión Arterial Sistémica, 1 con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, 1 con Artritis Reumatoide, 1 con Esclerosis Múltiple, Hepatitis Autoinmune e Hipotiroidismo y 1 con Lupus Eritematosos Sistémico, Síndrome Antifosfolípido y Enfermedad Renal Crónica Secundaria).

Se observó mayor expresión de CD117 (c-kit) en los pacientes con LMA (mediana 24.65%) que en los pacientes con LLA (1.0%, $p=0.000004$) y que en los pacientes de LA Bifenotípica (11.7%, $p=0.34$). Con respecto a los moduladores de apoptosis y la glicoproteína-P no se observó diferencia significativa entre los tipos de Leucemia (tablas 3 y 4).

Seis pacientes murieron previo al inicio de la quimioterapia sistémica; 30 iniciaron el tratamiento de acuerdo al criterio del médico tratante, de los cuales 11 (36.7%) fallecieron durante la terapia de inducción a la remisión (IR). De los 19 pacientes que completaron la terapia de IR, 68.4% (13) alcanzaron remisión hematológica (hemoglobina >10 g/dL, neutrófilos absolutos $>1,000/\text{mm}^3$, plaquetas $>100,000/\text{mm}^3$) y sólo 31.6% (6) alcanzaron remisión morfológica completa ($<5\%$ de blastos en médula ósea).

Tabla 3. Mediana de proteínas de membrana, moduladores de apoptosis y glicoproteína-P				
	N	Mediana (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
CD117	36	14.25	.10	80.1
Linfoblástica	12	1		
Mieloide	20	24.65		
Bifenotípica	4	11.7		
CD95	36	15.45	.10	97.6
Linfoblástica	12	9		
Mieloide	20	26.75		
Bifenotípica	4	16.2		
C3act	35	5.4	.30	99.6
Linfoblástica	12	14.7		
Mieloide	19	5.7		
Bifenotípica	4	5.35		
GpP	36	3.4	.20	71.4
Linfoblástica	12	4		
Mieloide	20	2.6		
Bifenotípica	4	17.2		
Bcl-2	36	16.45	.30	84.5
Linfoblástica	12	30.6		
Mieloide	20	15.15		
Bifenotípica	4	27.2		

Tabla 4. Análisis comparativo de CD117, glicoproteína-P y moduladores de apoptosis entre tipos de Leucemia (valor de P)					
	CD117	CD95	C3act	GpP	Bcl2
Linfoblástica	0.000004	.220	1.0	.507	.477
Mieloide					
Linfoblástica	.249	.665	.882	.302	.953
Bifenotípica					
Mieloide	.347	.518	.725	.078	.682
Bifenotípica					

Para establecer la significancia clínica de glicoproteína-P y los moduladores de apoptosis como variables de pronóstico se calcularon las curvas ROC (Receiver

Operating Characteristic) para remisión morfológica, defunción durante la inducción a la remisión, recaída y supervivencia para establecer los niveles de corte.

CD95

Previamente se ha determinado el rango de referencia de CD95 entre 7.0% y 95.0%, con una mediana de 86.4%. La curva ROC mostró un área bajo la curva (AUC por sus siglas en inglés) de 0.508 para supervivencia, 0.372 para recaída, 0.577 para remisión morfológica y 0.708 para defunción durante IR; se tomó esta última como referencia y se obtuvieron los mejores resultados de especificidad y sensibilidad con los valores entre 0.15% y 0.25%, con sensibilidad de 100% y especificidad de 78.9%.

Al tomar como valor de corte 86.4%, todos los pacientes que completaron IR tuvieron expresión de CD95 en células blásticas por debajo de la mediana; se comparó la remisión morfológica entre los pacientes que expresaran CD95 en células blásticas por arriba o por debajo al valor de corte de 0.25%, sin obtenerse correlación significativa ($p=0.637$).

Se hizo el análisis de remisión morfológica completa y supervivencia global mediante Kaplan-Meier tomando en cuenta tanto 86.4% como 0.25%. Cuando se empleó el punto de corte de 0.25% no hubo diferencia significativa para supervivencia global ($p=.43$) ni para remisión morfológica ($p=.69$). Al hacer el análisis con la mediana no fue posible evaluar una diferencia para remisión morfológica por el escaso número de pacientes con resultado sobre el valor de corte (3 pacientes), sin embargo la supervivencia global fue de 0.3 meses (IC 95%, 0 a 0.9) para los pacientes sobre el punto de corte y de 5.7 meses (IC 95%, 3.3 a 8.2) debajo del punto de corte ($p=0.000332$) (Figura 2).

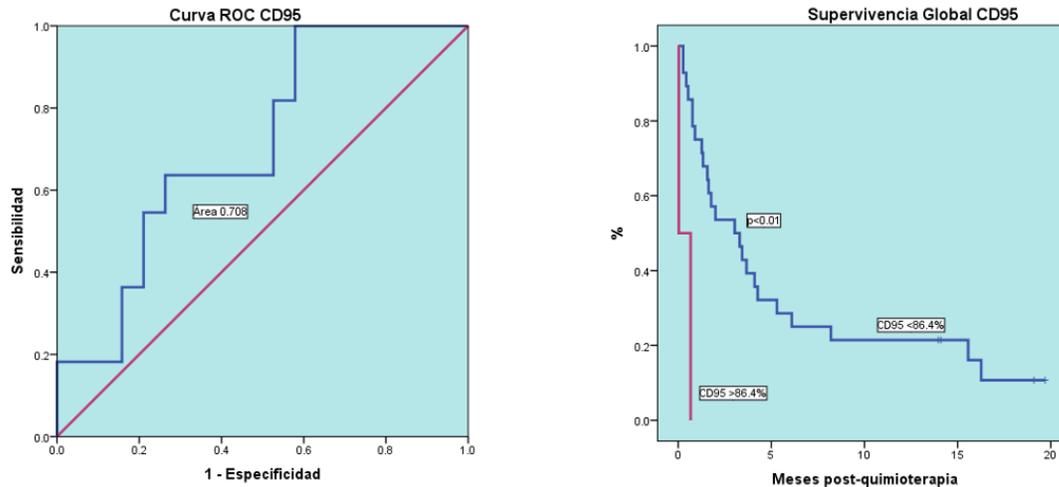


Figura 2.

Caspasa-3-activada

El rango de referencia dado por el Laboratorio de Hematología del HECMNR para caspasa-3-activada (C3act) es de 20.0% a 65.0%, con una mediana de 40.6%. La curva ROC mostró un AUC de 0.411 para supervivencia, 0.547 para defunción durante IR, 0.371 para recaída y 0.346 para remisión morfológica. Se tomó nuevamente la curva de Defunción durante IR como referencia, obteniéndose el punto de corte en 1.5%, con sensibilidad y especificidad de 80% y 84%, respectivamente.

No se obtuvo resultado significativo al comparar remisión morfológica con la expresión de C3act mayor o menor a la mediana ($p=0.20$) ni con el punto de corte derivado de ROC ($p=0.154$).

Se hizo el análisis de remisión morfológica completa y supervivencia global mediante Kaplan-Meier. Al utilizarse el punto de corte de 1.5% no hubo diferencia significativa para supervivencia global ($p=.99$) ni para remisión morfológica ($p=.35$). Ninguno de los pacientes que alcanzó remisión morfológica completa tuvo expresión de C3act mayor de 40.6%, no permitiendo hacer la comparación. Al analizarse la supervivencia global empleando la mediana se observa una supervivencia global media de 6.9 meses (IC 95%, 4 a 9.9) en el grupo con C3act debajo del valor de corte contra 1.2 meses (IC 95%, 0.45 a 2, $p=0.002$) (Figura 3).

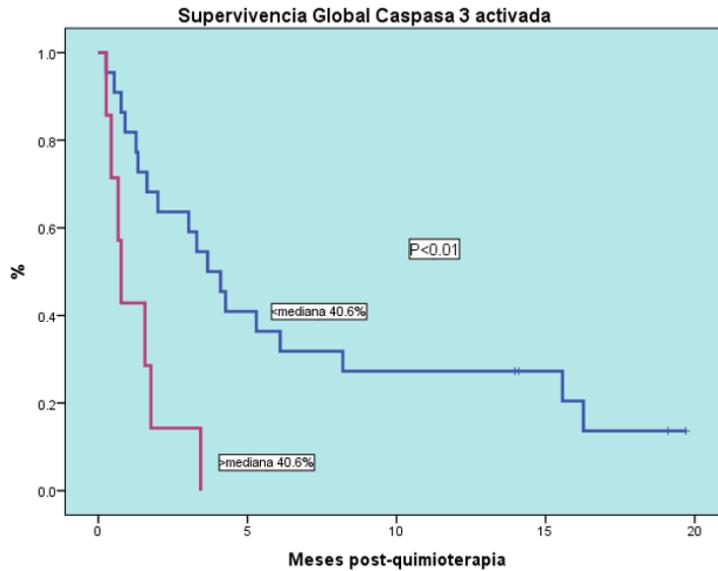


Figura 3.

Glicoproteína-P

El rango de referencia para GpP es de 0 a 2.0%, con una mediana de 0.4% de acuerdo a lo referido por el Laboratorio. Al analizar las curvas ROC se encontró un AUC de 0.586 para supervivencia, 0.306 para defunción durante IR, 0.762 para recaída y 0.596 para remisión morfológica. Tomando en cuenta la curva de recaída se tomó 1.0% como valor de corte, que mostró sensibilidad y especificidad de 100% y 80%, respectivamente. Todos los pacientes que se evaluaron para remisión morfológica mostraron GpP superior a la mediana, y al emplearse 1.0% como valor de corte, la diferencia entre ambos grupos tuvo una $p=0.20$.

El análisis de Kaplan-Meier para remisión morfológica completa utilizando el valor de la mediana (0.4%) no es posible por la poca cantidad de pacientes por grupo; en cuanto a la supervivencia global se observó una sobrevida media de 0.4 meses en los pacientes con expresión de GpP debajo de la mediana (IC 95%, 0 a 1.3) contra 5.7 meses en quienes la sobreexpresaban (IC 95%, 3.3 a 8.2, $p=0.007$) (Figura 4).

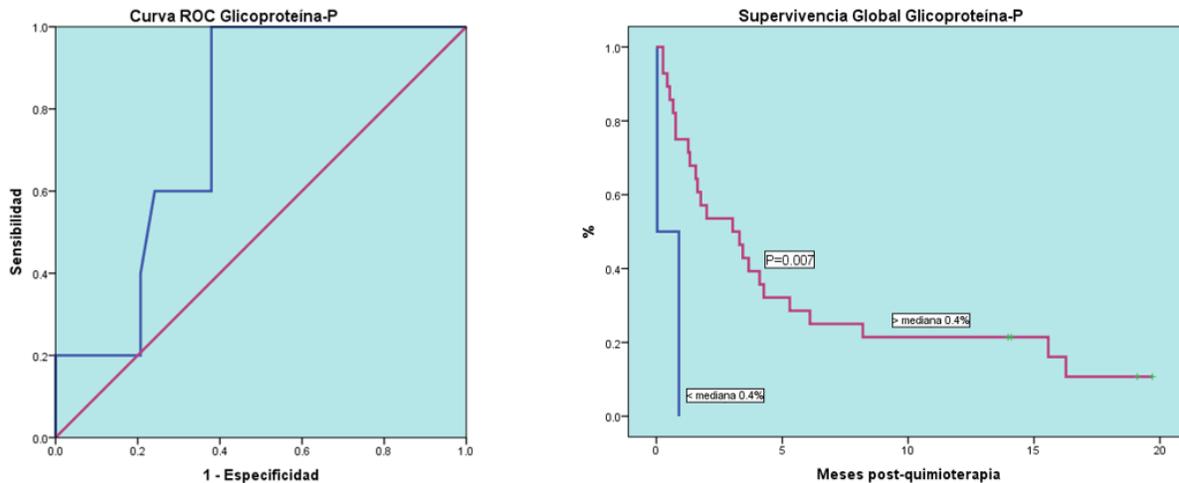


Figura 4.

Cuando se tomó el valor de corte derivado de la curva ROC, no se encuentra diferencia significativa entre ambos grupos para supervivencia global ($p=0.54$).

Bcl-2

El rango de referencia de Bcl-2 es entre 3.0% y 15.0%, con una mediana de 3.7%. La curva ROC mostró un AUC de 0.367, 0.372, 0.317 y 0.531 para supervivencia, remisión morfológica completa, recaída y defunción durante IR, respectivamente. Debido a que ninguna curva superó 0.6, no se obtuvo valor de corte por este método. La comparación entre los pacientes que alcanzaron o no remisión y la expresión de Bcl-2 mayor o menor al rango de referencia no tuvo significancia estadística ($p=0.419$).

Se hizo el análisis de supervivencia global mediante Kaplan-Meier tomando en cuenta la mediana dada por el laboratorio. Los pacientes con un Bcl-2 debajo de la mediana tuvieron una supervivencia media de 10.2 meses (IC 95%, 5.4 a 15) contra 3.6 meses (IC 95%, 1.4 a 5.9, $p=0.031$) en los de Bcl-2 sobre la mediana (Figura 5). Al evaluarse remisión morfológica completa con respecto a la mediana, se obtuvo una $p=0.193$.

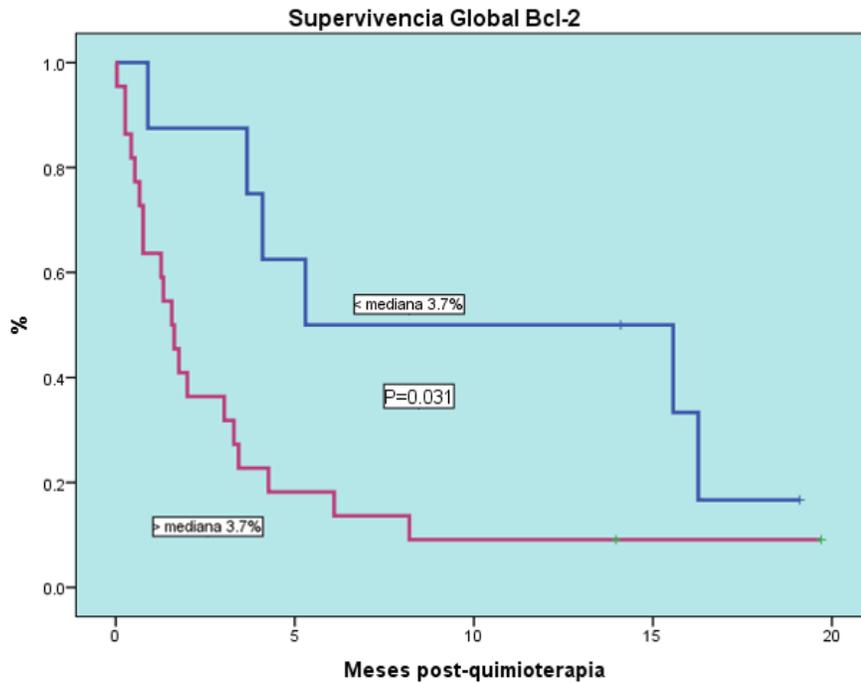


Figura 5.

CD117 (c-kit)

Para CD117 se obtuvo el rango de referencia directamente de las curvas ROC, las cuales mostraron un AUC de 0.750 para supervivencia, 0.372 para remisión morfológica, 0.464 para defunción durante IR y 0.428 para recaída, por lo que se tomó la de supervivencia para establecer el valor de corte, el cual fue de 0.4 con una sensibilidad de 100% y especificidad de 90%. Los pacientes con CD117 por debajo del valor de corte mostraron supervivencia media de 3 ± 1.6 meses (IC 95%, 0 a 6.2) comparado con los pacientes que lo expresaron por encima al punto de corte, con supervivencia de 6.4 ± 1.5 meses (IC 95%, 3.4 a 9.5, $p=0.07$) (Figura 6). Todos los pacientes con LMA tuvieron expresión de CD117 por encima del valor de corte.

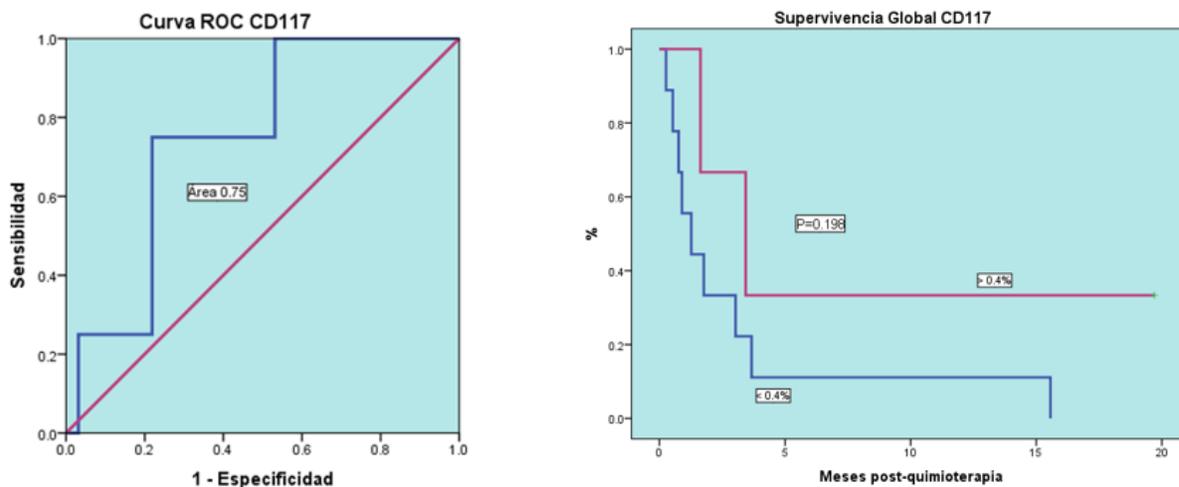


Figura 6.

Supervivencia global

La supervivencia global (SG) de los pacientes que iniciaron tratamiento fue de 5.4 ± 1.1 meses (IC 95%, 3 – 7.7 meses) (Figura 7).

Los pacientes del sexo masculino tuvieron SG de 7.3 ± 2 meses (IC 95%, 3.4 a 11.2) comparado con las mujeres de 4.2 ± 1.4 meses (IC 95%, 1.4 a 7, $p=0.174$). Se comparó la SG con base en el riesgo la cual fue de 6.7 ± 3 (IC 95%, 0.8 a 12) para los de riesgo estándar o intermedio contra 4.7 ± 1.3 (IC 95%, 2.2 a 7.3) para los de riesgo alto ($p=0.428$).

Se estableció la supervivencia entre los tipos de leucemia, la LLA con SG de 4.3 ± 1.7 meses (IC 95%, 0.9 a 7.8), LMA de 5.4 ± 1.6 meses (IC 95%, 2.1 a 8.7) y LA Bifenotípica de 7.8 ± 1.2 meses (IC 95%, 3 a 7.7) ($p=0.517$). Los pacientes con comorbilidades al diagnóstico mostraron SG de 3 ± 2.2 meses (IC 95%, 0 a 7.4) comparados con aquellos sin comorbilidades con SG de 6.1 ± 1.4 meses (IC 95%, 3.4 a 9, $p= 0.073$).

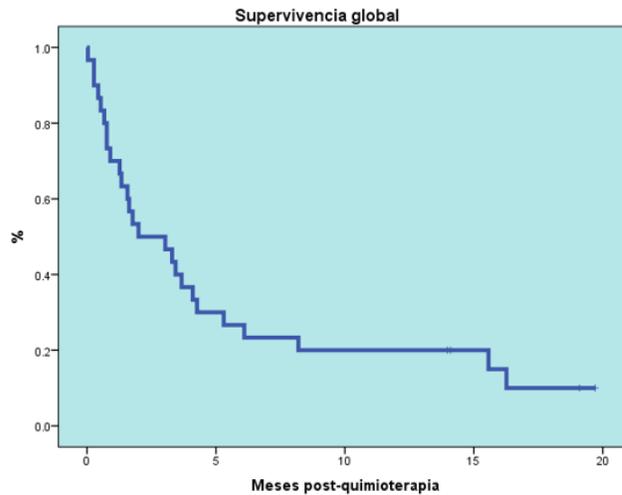


Figura 7.

De los 19 pacientes que completaron la terapia de inducción a la remisión, los 6 pacientes que alcanzaron remisión morfológica completa tuvieron una SG de 10.5 ± 3 meses (IC 95%, 4.6 a 16.6) comparado con los 13 pacientes que no alcanzaron remisión morfológica con SG de 7 ± 1 (IC 95%, 3.6 a 10, $p=0.424$) (Figura 8).

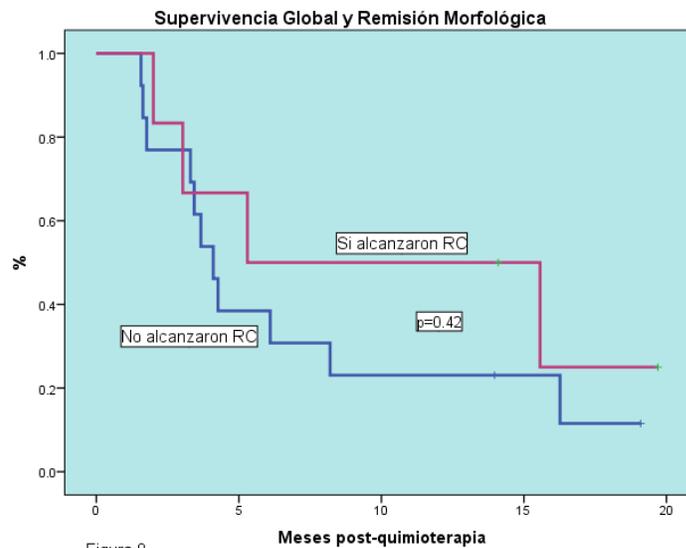


Figura 8.

DISCUSIÓN

En este estudio se pudo observar que la expresión de las proteínas caspasa 3 activada, CD95, Bcl-2 y glicoproteína-P tienen una distribución heterogénea en las células leucémicas de los pacientes con leucemia aguda *de novo*, y solamente el CD117 mostró mayor expresión en los pacientes con LMA, lo cual es comparable a lo reportado en la literatura.

La expresión de Bcl-2 por arriba o debajo de la mediana no mostró un impacto en la remisión completa (RC) a un mes de tratamiento, aunque se observó una tendencia. Diversos estudios han encontrado una expresión elevada de Bcl-2 en pacientes con LLA y LMA; los ensayos clínicos no han podido correlacionar su sobreexpresión con menor SG o falla terapéutica en LLA, sin embargo en pacientes con LMA lo han asociado a menores tasas de RC, identificándose como un factor pronóstico adverso, incluso en aquellos pacientes inicialmente identificados con riesgo citogenético favorable o intermedio. ^(55, 56) En este trabajo la SG fue estadísticamente superior en los pacientes con baja expresión de Bcl-2, que concuerda con su función biológica antiapoptótica. Para corroborar estos hallazgos es conveniente ampliar la muestra de los pacientes de LMA y evaluar en este grupo la expresión de Bcl-2, tanto por citometría de flujo como por PCR, y comparar la sobreexpresión con tasa de RC y SG.

La RC no se vio significativamente afectada por la proteína proapoptótica CD95. En LMA, en la cual la expresión de CD95 es variable, se ha sugerido una correlación entre la respuesta inicial a la quimioterapia de IR con la expresión de CD95, y diversos autores han encontrado esta asociación en ensayos clínicos. ^(57, 58) La SG tuvo diferencia significativa dependiendo de la expresión de CD95 por arriba o debajo de la mediana, sin embargo, de acuerdo con la función biológica de CD95, una expresión mayor al punto de corte se asociaría a una mayor SG, y en este estudio ocurrió lo contrario y los pacientes con expresión elevada de CD95 tuvieron menor SG.

Li y cols han descrito que la intensidad de la expresión de CD95 por citometría de flujo puede ser variable entre las muestras, y que en los pacientes con una expresión “baja” puede corresponder a dos situaciones, o una baja expresión por todas las

células o una expresión fuerte por un pequeño grupo de células. ⁽⁵⁸⁾ En este caso, si al seleccionar la población a analizar por citometría de flujo se selecciona una población con baja cantidad de células leucémicas mezcladas con células mononucleares, el resultado puede no mostrar la expresión real de CD95 en las células blásticas. Para afinar estos resultados es posible la medición concomitante de transcritos de ARNm de FAS en estas células mediante análisis de PCR en tiempo real. Así mismo, debe considerarse que una N pequeña con alta mortalidad temprana puede limitar la identificación del grupo de pacientes con baja expresión de CD95 y su impacto en RC y SG.

En el análisis de C3act, ambos grupos tuvieron un comportamiento similar en cuanto a RC, sin diferencias significativas. El análisis de SG mostró diferencia significativa entre ambos grupos y, similar a los resultados para CD95, se observó mejor SG en el grupo de baja expresión de C3act, contrario a lo esperado con respecto a la teoría. Estrov y cols midieron los niveles de caspasa-2 y -3 no activada y de caspasa 3 activada; reportaron que niveles elevados de procaspasa-2 y procaspasa-3 denota menor supervivencia, mientras que un nivel elevado de C3act se correlaciona con un pronóstico favorable, aunque con una significancia marginal. ⁽⁵⁹⁾ Ningún otro estudio ha podido correlacionar la expresión de C3act con la respuesta a tratamiento o SG.

La medición de las proteínas que se hizo en este estudio y en estudios previos es estática, sin embargo, defectos en la señal apoptótica en las células tumorales puede ser un mecanismo de escape a la quimioterapia. En el estudio llevado a cabo por Liu y cols, se hicieron mediciones de las proteínas pro y antiapoptóticas antes y posterior a la quimioterapia. Particularmente la expresión de C3act basal no se correlacionó con actividad de la quimioterapia en las primeras 24 horas, sin embargo la determinación obtenida a las 24 horas post-quimioterapia si tuvo correlación significativa con su actividad. ⁽⁶⁰⁾ La propuesta es hacer la medición de estas proteínas en tiempos clave tras el inicio del tratamiento e intentar correlacionar su actividad con la respuesta terapéutica.

En el análisis para GpP, no hubo diferencia entre ambos grupos para la respuesta a terapéutica y remisión completa tras un mes de tratamiento. Aunque previamente se

ha implicado la *sobreexpresión* del gen MDR1 con falla a tratamiento, estudios más recientes han dado peso a los polimorfismos del gen así como a su expresión en las células leucémicas. ⁽⁶¹⁾ La baja expresión de GpP se vio asociada a menor supervivencia, sin embargo, la cantidad de pacientes en ese grupo fue muy baja y con alta mortalidad temprana, que no permite hacer un análisis adecuado.

Uno de los resultados más importantes a remarcar es la diferencia en la supervivencia global con respecto a la remisión completa tras la inducción a la remisión. Si bien en este trabajo la diferencia no fue estadísticamente significativa entre los 2 grupos, se observa una tendencia a la separación de las curvas de supervivencia. En LLA, la remisión completa al día 28 de la IR es un factor pronóstico fundamental, e incluso la medición fina de esto mediante Enfermedad Mínima Residual, tanto por citometría de flujo como por métodos moleculares, se ha establecido como uno de los factores pronósticos más relevantes. Una muestra de pacientes mayor permitiría identificar estos patrones con mayor precisión.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados presentados, en los pacientes con leucemia aguda *de novo* del HECMNR no se pudo establecer una asociación entre la expresión de caspasa 3 activada, CD95, Bcl-2 y glicoproteína-P en las células leucémicas y la respuesta terapéutica evaluada tras un mes de haber iniciado el tratamiento. Se observó que en general las tasas de respuesta completa tras la inducción a la remisión son bajas, con alta mortalidad temprana. Así mismo, pudo notarse diferencia entre la expresión de estas proteínas y la supervivencia global. Los pacientes expresión en células blásticas de CD95 menor a 86%, caspasa-3 activada mayor de 40.6%, Bcl-2 menor de 3.7% y glicoproteína-P mayor de 0.4% mostraron mayor supervivencia global. La expresión de CD117 fue superior en los pacientes con LMA, y una expresión superior a 0.4% tiene tendencia a mejor supervivencia global. El comportamiento clínico no fue el esperado de acuerdo a la función y biología de la proteína medida en todos los casos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting-airlie house, Virginia, November, 1997. *The Hematol J.* 2000. 1; 53-66.
2. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Dirección General de Epidemiología. México. 2002.
3. Giuseppe L, Mele L, Pulsoni A et al. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica.* 1999. 84:937-945.
4. Constantini AS, Quinn M, Consonni D et al. Exposure to benzene and risk of leukemia among shoe factory workers. *Scand J Work Environ Health.* 29: 51-59.
5. Finch SC. Radiation induced leukemia lessons from history. *Best Pract Res clin Haematol.* 2003. 20: 109-18.
6. Lichtman MA. Is there an entity of chemically induced BCR-ABL- Positive Chronic Myelogenous Leukemia? *Oncologist.* 2008. 13: 645-654.
7. Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press. 2001.
8. Woessner S, Sans-Sabrafen J, Lafuente R, Florensa L. Assymptomatic bone marrow infiltration by blast cells. *N Engl J Med.* 1985. 312: 1129-1130.
9. Ortuño F, Orfao A. Aplicación de la citometría de flujo en el diagnóstico y seguimiento de las leucemias agudas. *Med Clin (Barc).* 2002. 118: 423-436.
10. Butturini A, Gale R. Causes of leukemia. En: Keating A, Armitaje J, Burnett A, Newland A (eds). *Haematological Oncology.* 1992. Vol 2. Cambridge: Cambridge University Press. 103-117.
11. Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds). *Leukemia.* 7th ed. Philadelphia: Saunders. Chap 9. Malignant disease. 2002. pp: 501-508.
12. Mancini M, Scappaticci D, Cimino G et al. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood.* 2005. 105: 3434-3441.
13. Hrusak O, Porwit-Mac Donald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia.* 2002. 16: 1233-1258.

14. Bene M, Castoldi G, Knapp W et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European group for the immunological characterization of leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995. 9: 1783-1786.
15. Bennett J, Catovsky D, Daniel M et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*; 1976. 33: 451-458.
16. Borst P, Evers R, Kool M et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000. 92: 1295-1302.
17. Zimm S, Collins J, Riccarrdi R et al. Variable bioavailability of oral mercaptopurine is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med*. 1983. 308: 1005-9.
18. Padro T, Ruiz S, Bieker R et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000. 95: 2637-2644.
19. Litmann T, Brangi M, Hudson E et al. The multidrug resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci*. 2000. 113: 2011-2021.
20. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human BBAC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1461: 237-262.
21. Marie J, Huet S, Faussat A et al. Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. *Leukemia*. 1997. 11: 1086-1094.
22. Marie J, Zhou D, Gurbuxani S, et al. MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms. *Eur J Cancer*. 1996. 32A: 1034-1038.
23. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1999. 94: 1086-1099.
24. Marie J, Legrand O. Drug resistance in acute leukaemia and reversion. *Turk J Med Sci*. 2003. 33: 271-279.
25. Holt vd B, Löwenberg B, Burnett A et al. The value of the MDR 1 reversal agent PSC-833 in addition to daunorubicin and cytarabine in the treatment of elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia (LMA), in relation to MDR 1 status at diagnosis. *Blood*. 2005. 106: 2646-2654.
26. Klymenko S, Ilyenko I, Golarnik N et al. Membrane transport and apoptosis-related proteins in radiation-associated acute myeloid leukemia following the Chernobyl accident. *Gen Physiol Biophys*. 2009. 28(1):63-9.

27. Guenova M, Balatzenko G, Nikolova V et al. An anti-apoptotic pattern correlates with multidrug resistance in acute myeloid leukemia patients: a comparative study of active caspase-3, cleaved PARPs, Bcl-2, Survivin and MDR1 gene. *Hematology*. 2010. 15(3):135-43.
28. Wang H, Wang X, Li Y et al. The proteasome inhibitor bortezomib reverses P-glycoprotein-mediated leukemia multi-drug resistance through the NF-kappaB pathway. *Pharmazie*. 2012. 67(2):187-92.
29. de Moraes A, Licínio M, Zampirolo J et al. Evaluation of multidrug resistance in 46 newly diagnosed patients with acute leukemia. *Hematology*. 2012. 17(2):59-65.
30. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R et al. Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*. 2002. 21: 165-70.
31. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000. 407. 770-6.
32. Horvitz H. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 1999. 59: Suppl. 1701s-1706s.
33. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c and the dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997. 91: 479-89.
34. Hengartner M, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*. 1994. 76: 665-76.
35. Alnemri E, Livingston D, Nicholson D et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996. 7: 171.
36. Yuan J, Shaham S, Ledoux S et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993. 75: 641-52.
37. Lotem J, Sachs L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene*. 2002. 21: 3284-3294.
38. Kitada S, Pedersen I, Schimmer A, Reed JC. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2002. 21: 3459-3474.
39. Kitada S, Reed J. MCL-1 promoters insertions dial-up aggressiveness of chronic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 2004. 96: 642-643.
40. Inoue K, Kohno T, Takakura S, et al. Frequent microsatellite instability and Bax mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk Res* 2000. 24: 255-262.
41. Liu x, Kim CN, Yang J et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996. 86: 147-57.
42. Taylor R, Cullen S, Martin S. Apoptosis controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008. 9: 231-241.

43. Reed J and Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hemotologic malignancies. *Blood*. 2005. 106:408-418.
44. Hafez M, Al-Tonbary Y, El-Bayoumi MA et al. Markers of apoptosis and proliferation related gene products as predictors of treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2007. 12(3):209-18.
45. Vrbanus L, Sucić M, Marković-Glamocak M et al. Apoptosis of leukemic cells: a case report. *Coll Antropol*. 2010. 34(2):705-11.
46. Barakat M, Elkhayat Z, Kholoussi N et al. Monitoring treatment response of childhood acute lymphocytic leukemia with certain molecular and biochemical markers. *J Biochem Mol Toxicol*. 2010. 24(6):343-50.
47. Lafont E, Dupont R, Andrieu-Abadie N et al. Ordering of ceramide formation and caspase-9 activation in CD95L-induced Jurkat leukemia T cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2012. 1821(4):684-93.
48. Lotem J, Sachs L. Differential suppression by protease inhibitors and cytokines of apoptosis induced by wild-type p53 and cytotoxic agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. 93: 12507-12512.
49. Broxmeyer HE, Cooper S. Effect of murine mast cell growth factor (c-kit proto-oncogene ligand) on colony formation by human bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1991. 77:2142-9.
50. Pietsch T, Kyas U, Steffens U. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response to synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 1992. 820:1199-206.
51. Buhring HJ, Ulrich A, Schaudt K et al. The product of the proto-oncogene c-kit is a human bone marrow surface antigen of hemopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute non-lymphoblastic leukemic cells. *Leukemia* 1991; 5: 854-60.
52. Schwartz S, Heinecke A, Zimmermann M. Expression of the c-kit receptor (CD117) is a feature of almost subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. *Leuk Lymphoma*. 1999. 34:85-94.
53. Osato M, Asou N, Okubo T. Myelomonoblastic leukaemia cells carrying the PEBP2b/MYH11 fusion gene are CD341, c-kit1 immature cells. *Br J Haematol*. 1997;97:656-658.

54. Wang Y, Zhou G, Yin T et al. AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: Implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. 102: 1104-09.
55. Chaber R, Fiszler-Maliszewska L, Noworolska-Sauren D et al. The BCL-2 protein in precursor B Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:180–187.
56. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D et al. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias.
57. Li Q, Tsurada K, Sugahara K et al. Qualitative and quantitative characterization of Fas (CD95) expression and its role in primary human acute leukemia cells. *Leuk Res* 2000. 24: 437-444.
58. Joo-Min Y, Lee J, Choi S et al. Prognostic significance of Fas (CD95) and TRAIL receptors (DR4/DR5) expression in acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 2004. 28:359-365.
59. Estrov Z, Thall P, Talpaz M et al. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998. 95: 3090–3097.
60. Liu T, Raetz E, Moos P et al. Diversity of the apoptotic response to chemotherapy in childhood leukemia. *Leukemia* 2002. 16:223–232.
61. Doxani C, Voulgarelis M, Zintzaras E. MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis. *Biomarkers* 2013. 18 (5):425-35.

ANEXO I
Hoja de Captura de Datos.

NSS	Nombre	Edad	Sexo	CN X10 ⁹ /mL	Tipo LA:OMS	Marcador aberrante+/-	HLADR	CD34	TdT	CD117	aC3	CD95	Bcl-2	MDR	Respuesta a Tx

ANEXO II.

Análisis de Citometría de Flujo.

A partir de cada una de las muestras se les realizará cuantificación de células nucleadas en el equipo Advia 120 marca Siemens para ajustar la cantidad de células a $10^6/100\mu\text{L}$ y poder realizar la tinción utilizando para esta cantidad de células $20\mu\text{L}$ del anticuerpo en estudio. Inicialmente a todas las muestras se les aplicarán los criterios del grupo FAB utilizando las tinciones de Wright, ácido peryódico Schiff (PAS), mieloperoxidasa y alfa naftil acetato esterasa; posteriormente, a todas ellas se les realizarán estudios de inmunocitofluorometría y se les aplicaran los criterios del Grupo Europeo para la inmunotipificación de leucemias (EGIL) y así poder caracterizar a cada una de ellas. Los anticuerpos monoclonales que se utilizaran para realizar la caracterización de las leucemias son: HLADR-PerCP, CD34PerCP, TdT-FITC, CD117PerCP, cCD3PerCP CD5PerCP, CD7FITC, CD10FITC, CD19PerCP, CD20PerCP, CD22FITC, CD79a-PE, antiIgM-PE, CD13PE, CD14PerCP, CD15PE, CD33PE, CD64FITC, CD41aFITC, CD235aPE, CD200PE, antiLin1FITC, CD123, CD11cAPC y los marcadores de interés para este trabajo: anti GpP-PE, CD95Fas-APC, antiBcl-2FITC, anti caspasa-3 activadaPE, además de todos los insumos necesarios para la tinción intra y de superficie de acuerdo a el procedimiento establecido por el fabricante; todos los anticuerpos monoclonales serán de la marca Becton Dickinson (San José Cal. EUA). Todos los marcadores se analizaran por citometría de flujo utilizando el programa "Cell Quest Pro" versión 5.1.1 en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD San José Cal. EUA).

ANEXO III.

ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA

Leucemia Linfoblástica Aguda

Esquema Hiper CVAD

Consiste en 4 ciclos constituidos por fase A y fase B intercaladas con intervalo promedio de 28 días entre cada fase.

Fase A (ciclos 1, 3, 5 y 7)

- Ciclofosfamida 300 mg/m²SC IV cada 12 horas (días 1 al 3)
- Vincristina 1.4 mg/m²SC IV (días 4 y 11)
- Doxorrubicina 40 g/m²SC o Daunorrubicina 60 mg/m²SC cada 24 horas (días 1 al 4 y 11 al 14)
- Dexametasona 40 mg/m²SC cada 24 horas (días 1 al 4 y 11 al 14)
- Citarabina 40 mg dosis estándar vía intratecal (día 7)
- Metotrexate 15 mg dosis estándar vía intratecal (día 7)

Fase B (ciclos 2, 4, 6 y 8)

- Metotrexate 1000 mg/m²SC IV en infusión de 24 horas (día 1)
- Ácido folínico 25 mg/m²SC cada 6 horas por 6 dosis (días 2 y 3)
- Citarabina 3000 mg/m²SC cada 12 horas por 4 dosis (días 2 y 3)

Esquema Berlin-Frankfurt-Münster

Fase de Inducción (4 semanas)

- Vincristina 1.5/m²SC/día IV (días 1, 8, 15 y 22)
- Prednisona 60 mg/m²SC/día VO (día 1 al 28)
- L-aspariginasa 6,000 Unidades/m²SC/día IV cada 24 horas por 14 dosis (día 1 a 14)

- Daunorrubicina 45 mg/m²SC/día IV (días 1, 8, 15 y 22)

Fase de Consolidación (5 semanas)

- Ciclofosfamida 650 mg/m²SC/día IV (días 1, 15 y 26)
- 6-Mercaptopurina 60 mg/m²/día VO (días 1-28)
- Citarabina 300 mg/m²SC IV (días 1, 8, 15, 22, 29)

Leucemia Mieloide Aguda (excepto subtipo M3)

Esquemas de Inducción

Régimen Dosis estándar de Citarabina + Idarrubicina

- Citarabina 100 mg/m²SC/día en infusión de 24 horas por 7 dosis (días 1 al 7)
- Idarrubicina 12 mg/m²SC/día por 3 dosis (días 1 al 3)

Esquema de segunda Inducción

- Citarabina 100 mg/m² SC/día en infusión de 24 horas por 5 días (días 1 al 5)
- Idarrubicina 12 mg/m²SC/día por 2 dosis (días 1 y 2)

Esquema de Consolidación

Consiste en 2 consolidaciones tempranas seguidas de 2 consolidaciones tardías con intervalo promedio de 28 días entre cada una

- Citarabina 1500 mg/m²SC cada 12 horas por 4 dosis (días 1 y 2)
- Idarrubicina 12 mg/m²SC cada 24 horas por 2 dosis (días 1 y 2) ó
- Mitoxantrone 12 mg/m²SC cada 24 horas por 2 dosis (días 1 y 2)

Leucemia Mieloide Aguda M3 de la FAB

Esquema de Inducción

- Ácido holotransretinóico 45 mg/m²SC/día dividido en 2 tomas por 45 dosis (días 1 al 45)
- Idarrubicina 12 mg/m²SC cada 24 horas por 4 dosis en días alternos (días 2, 4, 6 y 8)
- En caso de riesgo alto – Citarabina 1000 mg/m²SC/día por 4 dosis (días 1 al 4)

Consolidaciones – adaptadas a estratificación de Riesgo

Primera Consolidación

- Ácido holotransretinóico 45 mg/m²SC/día dividido en 2 tomas por 15 dosis (días 1 a 15)
- Idarrubicina 5 mg/m²SC cada 24 horas por 4 dosis (días 1 a 4)
- En caso de riesgo alto – Citarabina 1000 mg/m²SC/día cada 24 horas por 4 dosis (días 1 a 4)

Segunda Consolidación

- Ácido holotransretinóico 45 mg/m²SC/día dividido en 2 tomas por 15 dosis (días 1 a 15)
- Mitoxantrone 10 mg/m²SC/día cada 24 horas por 5 dosis (días 1 a 5)

Tercera Consolidación

- Ácido holotransretinóico 45 mg/m²SC/día dividido en 2 tomas por 15 dosis (días 1 a 15)
- Idarrubicina 12 mg/m²SC cada 24 horas por 4 dosis (días 1 a 4)
- En caso de riesgo alto – Citarabina 150 mg/m²SC cada 8 horas (días 1 a 4).