



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICOBIOLOGICAS**

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS APOPTÓTICAS, ANTIAPOPTÓTICAS,
ANGIOGÉNICAS Y DE RESPUESTA TH1/TH2 EN PACIENTES CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA *de novo*.**

**Tesis que como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Químico-biológicas presenta:**

M en C. Laura Arcelia Montiel Cervantes.

Directores de tesis:

Dra. Elba Reyes Maldonado.

Dr. Jorge Vela Ojeda.

México, D. F.

2008.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Morfología en el Laboratorio de Hematopatología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Elba Reyes Maldonado y en el laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”, bajo la Dirección del Dr. Jorge Vela Ojeda.

El presente trabajo se desarrolló con el apoyo financiero parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): 82559.

El sustentante, fue becario del CONACYT durante sus estudios de Doctorado con número de registro: 203882.

La determinación de las citocinas de nicho medular, se realizó utilizando el citómetro de flujo FACSAria donado por la Fundación “Gonzalo Río Arronte”

Agradecimientos

A Dios y a Mis Padres

Por haberme dado la vida y el amor, por ser mi apoyo en todo momento y por dejarme ser.

A Mis Hermanos, sobrinos y Tía

Oscar, Ana, Angeles, Sandra, Ángel, Gabriel y Gerardo por haberme dado su apoyo, amor y comprensión.

A Todos Mis Maestros

Por haber compartido conmigo ese invaluable tesoro del conocimiento y por su paciencia.

A todo el grupo de pacientes por permitirme conocer de su padecimiento a través de su dolor y vida.

A todo el Grupo de Trabajo del Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "La Raza".

A Mis Amigos:

Dra. María Eugenia Rubio Borja, por su invaluable apoyo y amistad.

QBP Leticia Rivera Pérez, QBP Virginia Nieto P y Dr. Eduardo Infante, Gerencia de Citometría de Flujo de Becton Dickinson, a quienes hago patente mi más sincero reconocimiento para la realización de este trabajo, sobre todo por la relación que hemos tenido más que de trabajo ha permitido cultivar una amistad sincera.

Dra. Elba Reyes Maldonado, por su paciencia y dedicación para la culminación de este trabajo.

Dr. Jorge Vela Ojeda, por su paciencia, dedicación, apoyo y por proporcionarme libertad en el trabajo.

QBP Marisela Ramírez Ramos, por todo su apoyo.

Al Comité Revisor

Dra. Ethel A. García Latorre, Dr. Luis A. Jiménez

Zamudio, Dra. Martha C. Moreno Lafont, Dr. Eduardo

Ramírez San Juan, Dra. Elba Reyes Maldonado, y

Dr. Jorge Vela Ojeda por su tiempo y dedicación para la

culminación de esta tesis.

ÍNDICE.

Índice	i
Abreviaturas	ii
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	v
Abstract	vi
I. Introducción	1
Antecedentes	1
Justificación y planteamiento del problema	17
Hipótesis	17
Objetivo	18
II. Materiales y métodos	19
Criterios de inclusión, exclusión y no exclusión	19
Métodos	20
Material biológico	21
Preparación de las muestras para el análisis	22
Análisis	23
Procedimiento	24
III. Resultados	27
IV. Discusión	38
V. Conclusiones	45
VI. Bibliografía	46

ABREVIATURAS.

APAF-1	Factor activador-proteasa de apoptosis-1.
APC	Célula presentadora de antígeno.
APC	Aloficocianina.
ATP	Adenosín trifosfato.
Bcl-2	Linfoma de células B-2.
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos.
CBA	Perlas citométricamente ordenadas por intensidad de color (“Cytometric Bead Array”).
CFS	Factor estimulante de colonias.
CN	Células nucleadas.
CTQ	Citoquímica.
FAB	Grupo Franco Americano Británico.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FL	Fluorescencia.
FSC	Tamaño (“Forward scatter”).
GpP	Glicoproteína-P.
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos.
IAPs	Proteínas inhibidoras de apoptosis.
IFN _γ	Interferón gamma.
IL	Interleucina.
IL-1Rα 1	Receptor alfa de la interleucina 1.
IRF-1	Factor regulador de interferón-1.
LLA	Leucemia linfoblástica aguda.
LMA	Leucemia mieloide aguda.
MDR	Multirresistencia a drogas.
MSC	Células mesenquimales del estroma de médula ósea.
NK	Linfocitos asesinos naturales (“Natural killer”).
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PAS	Tinción de ácido peryódico Schiff.
PBS	Amortiguador de fosfatos salino.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PE	Ficoeritrina.
PerCP	Proteína peridina-clorofila.
RNA _m	Mensajero de ácido ribonucleico
SCF	Factor de células tallo.
SG	Supervivencia global.
SLE	Supervivencia libre de enfermedad.
SSC	Granularidad o complejidad interna (“Side scatter”).
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal.
TGF	Factor de crecimiento transformante.
Th	Linfocito T cooperador.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TPO	Trombopoyetina.
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular.
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura No. 1	Principales vías de apoptosis.	8
Figura No. 2	Citocinas involucradas en la destrucción de las células hematopoyéticas..	10
Figura No. 3	Factores angiogénicos producidos por las células tumorales.	13
Figura No. 4	Diagrama de trabajo para el estudio de las proteínas pro, antiapoptóticas y citocinas de nicho medular en pacientes con LLA <i>de novo</i> .	26
Figura No. 5	Distribución de la población estudiada por edad e inmunofenotipo.	27
Figura No. 6	Comparación de las medianas de los niveles de expresión de CD13 y CD33 en la población estudiada. .	29
Figura No. 7	Comparación de las medianas de los niveles de expresión para: Bcl-2, Fas, CD243, caspasa-3 activada, e imágenes de citometría para éstas proteínas, en la población estudiada.	31
Figura No. 8	Supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad del grupo de pacientes estudiados, distribuidos por diagnóstico definitivo.	33
Figura No. 9	Comparación de las medianas de las curvas de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con LLA <i>de novo</i> , de acuerdo a la proteína y al grupo de pacientes estudiados.	34
Figura No. 10	Comparación de las concentraciones de IFN γ y TNF α en plasma de médula ósea de pacientes con diagnóstico de LLA <i>de novo</i> contra el grupo testigo.	35
Figura No. 11	Comparación de las concentraciones de IL-4 e IL-6 en plasma de médula ósea de pacientes con diagnóstico de LLA <i>de novo</i> contra el grupo testigo.	36
Figura No. 12	Comparaciones de los niveles de concentración de las citocinas VEGF, bFGF, angiogenina e IL-8.	37

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1	Distribución de la población estudiada por inmunofenotipo y mediana de edad.	27
Tabla 2	Comparación de las medianas de expresión de los marcadores HLADR, CD34, TdT, CD10, CD19, CD22 con el grupo testigo y el valor de p.	28
Tabla 3	Comparación de las medianas de expresión de las proteínas Bcl-2, Fas, CD243, caspasa-3 activada contra el grupo testigo y valores de p.	30
Tabla 4	Comparación de las medianas de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad; valores de p del grupo de pacientes estudiados.	32
Tabla 5	Comparación de las medianas de las curvas de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con LLA <i>de novo</i> distribuidos por diagnóstico definitivo y proteína en estudio.	34

RESUMEN.

Las leucemias agudas son patologías que se caracterizan por la proliferación maligna de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico, cuya acumulación progresiva en médula ósea, se acompaña de una disminución en la producción de los elementos de la hematopoyesis normal. El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de expresión de proteínas apoptóticas y antiapoptóticas, así como las citocinas de nicho medular para angiogénesis y de las que participan en la respuesta Th1/Th2, de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) *de novo*, y determinar su valor pronóstico. Se analizaron 130 individuos, 111 pacientes con LLA *de novo* y 19 con anemia megaloblástica (testigos). De los pacientes 56, fueron hombres y 55 mujeres; los no oncohematológicos: 8 hombres y 11 mujeres; la mediana de edad en los pacientes fue de 30.4 años con un intervalo de 16 a 73; en relación con la población no oncohematológica (testigo) la mediana de edad fue de 49 años con un intervalo de 26 a 74. Al clasificar los pacientes de acuerdo a los criterios del grupo FAB, 5 fueron del tipo LLA L1 y 106 del tipo LLA L2. Para realizar este estudio se utilizó la inmunocitofluorometría con los programas de Cell QuestPro para el inmunofenotipo celular y CBA para la cuantificación de citocinas. Se utilizaron anticuerpos monoclonales para caracterizar células de estirpe B, T y mieloides, además de anti Bcl-2, anti caspasa 3 activada, Fas; así como el kit para la determinación de citocinas que intervienen en la respuesta Th1/Th2 (IFN γ , IL-4, IL-6) y para angiogénesis (angiogenina, VEGF, bFGF e IL-8).

El diagnóstico por inmunofenotipo fue de 56 LLA de estirpe B, 23 bifenotípicas, 16 de estirpe T y 16 expresaron un marcador mieloides aberrante. En relación con la expresión de proteínas de apoptosis (Fas, caspasa-3 activada) y antiapoptosis (Bcl-2), se encontró expresión significativamente aumentada para Bcl-2 ($P < 0.001$), disminuidos de Fas y caspasa-3 activada respecto al grupo testigo ($P < 0.001$). Para las citocinas que participan en la respuesta Th1/Th2 (IFN γ , IL-4, IL-6) analizadas en el plasma de médula ósea, se encontró aumento de la concentración de IL-6 ($P = 0.003$) y disminución de IL-4 ($P = 0.05$) e IFN γ ($P = 0.16$) respecto al grupo control; para angiogénesis, se encontró tendencia al aumento de las concentraciones de angiogenina ($P = 0.08$) y concentraciones elevadas para bFGF ($P = 0.004$), respecto al grupo control. En relación a la supervivencia de los pacientes, se observó un mejor pronóstico para los pacientes con LLA de estirpe T que el resto de los grupos ($P < 0.02$) para la supervivencia libre de enfermedad (SLE), pero no en la global ($P = 0.1$). Al relacionar los valores por arriba de la mediana para Bcl-2, Fas, CD243 y caspasa 3 activada, se observó que de acuerdo al pronóstico del padecimiento, para la SLE, los de mejor pronóstico fueron los que presentaron valores más altos de Fas y caspasa-3 activada; y los de peor pronóstico, los que presentaron valores más elevados de CD243 y Bcl-2. Concluimos que el pronóstico de los pacientes adultos con LLA *de novo*, se encuentra influenciado por los niveles elevados de expresión de Bcl-2 y CD243; niveles bajos de caspasa-3 activada y Fas. La LLA-T es la de mejor pronóstico en este grupo de pacientes. Se debe realizar más investigación acerca de las terapias enfocadas a ese grupo de proteínas.

ABSTRACT.

Acute leukemias are diseases characterized by malignant proliferation of immature hematopoietic stem cells called blasts, which accumulates in bone marrow causing depletion in normal hematopoiesis. The objective of this work was to determine the prognostic significance of the expression in the bone marrow of proapoptotic and anti-apoptotic proteins, as well as cytokines related with angiogenesis and Th1-Th2 immune response in adult patients with *de novo* acute lymphoblastic leukemia (ALL). We used conventional flow cytometry with CellQuestPro program for immunophenotyping of cells (monoclonal antibodies directed to B, T, and myeloid cells, as well as antibodies to Bcl-2, activated caspase-3, CD95Fas) and CBA technique for cytokine quantification (Th1-Th2 response: γ IFN, IL-4, IL-6; angiogenesis: angiogenine, VEGF, bFGF, and IL-8). We included 111 patients with ALL and 19 patients with megaloblastic anemia as controls. Fifty-six ALL patients were male and 55 were female. In the control group there were eight males and 11 females. Median age was 30.4 years (CI16 to 73 years) and 49 years (CI 26 to 74 years) for ALL and control patients respectively. The majority of patients (106) had type 2 ALL (FAB classification). The phenotype of ALL leukemias consisted of: B cells (56), biphenotypic (23), T cells (16), and aberrant phenotype in 16 patients. In general, we observed increased levels of Bcl-2 ($P < 0.001$) and decrease values of CD95Fas ($P < 0.001$) and caspase 3 ($P < 0.001$) in patients with ALL compared with controls. In bone marrow plasma we found increase in IL-6 concentrations ($P = 0.003$), and decrease in IL-4 ($P = 0.05$) and γ IFN ($P = 0.16$) concentrations. There was a trend to increase in angiogenine concentrations ($P = 0.08$) and highly significant concentrations of bFGF ($P = 0.004$) and IL-8 ($P < 0.001$). Disease free survival was better in T phenotype leukemias ($P < 0.02$), while there was a trend for better overall survival in these patients ($P = 0.1$). Considering values above the median as high values for Bcl-2, CD95Fas, CD243, and activated caspase 3, we observed better disease free survival for those patients with higher values of Fas and activated caspase 3 and worse disease free survival for patients with higher values of CD243 and Bcl-2. We conclude that the prognosis of adult ALL patients is influenced by the levels of expression of Bcl-2, activated caspase-3, Fas, and CD243. T phenotype ALL is a good prognostic factor in these patients. Major efforts must be done to investigate target therapies directed to these important proteins.

I. INTRODUCCIÓN

Antecedentes.

Las leucemias presentan una incidencia de 10 por cada 100,000 habitantes por año en EUA. En México, el registro histopatológico de neoplasias malignas de la Dirección General de Epidemiología, informó 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 último reporte de 2002, informó 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 %).

Las leucemias agudas son patologías que se caracterizan por la proliferación maligna de las células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico, cuya acumulación progresiva se acompaña de disminución en la producción de los elementos de la hematopoyesis normal (Haase, y cols., 1995).

En la actualidad, el conocimiento de las leucemias agudas ha evolucionado de forma importante. De acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (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, para establecer un tratamiento más específico (Harris, y cols.,2000).

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 (Jaffe, y cols., 2001; Woessner, y cols., 1985). 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 linfocítica o mielocítica, de acuerdo con el tipo de célula involucrada (Ortuño, y cols., 2002).

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 (Butturini, y cols., 1992); 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 (Henderson, y cols., 2002; Butturini, y cols., 1992).

El comportamiento clínico de la enfermedad, la morfología, las alteraciones citogenéticas y el inmunofenotipo celular, son las características que toma en consideración la Organización Mundial de la Salud (Harris, y cols., 2000) para poder clasificarlas en:

(a) Leucemia mielocítica aguda (LMA).

LMA con anomalías 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 alteraciones en 11q23.

LMA con displasia de multilineaje

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.

(b) Leucemia bifenotípica aguda

(c) 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.

En estudios realizados por el grupo Italiano, Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) (Mancini, y cols., 2005), 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 ese estudio se observó que los pacientes sin anomalías cromosómicas y aquellos que tenían eliminaciones aisladas 9p, p15 y p16, 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 de pacientes con LLA de pronóstico desfavorable con una SLE de 7 meses, mientras que las eliminaciones 6q, aberraciones misceláneas y las hiperdiploidias, 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 (Mancini, y cols., 2005; Hrusak, y cols., 2002).

Resistencia a drogas en leucemias agudas.

La resistencia a drogas es la principal causa del fracaso de la quimioterapia, y por consiguiente, de la muerte del paciente oncológico. A pesar del uso de la combinación de quimioterapias, el fracaso del 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 (Borst, y cols., 2000). 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 importantes entre un paciente y otro (Zimm, y cols., 1983). Además, los defectos en la vascularización del tumor que se observan frecuentemente en los tumores sólidos, también son relevantes para los de origen hematológico (Padro, y cols., 2000).

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 la

disminución de las proteínas proapoptóticas (ej: bax) (Borst, y cols., 2000; Litman, y cols., 2000). La primera y mejor proteína descrita en los modelos celulares de multiresistencia a drogas (MDR) es la glicoproteína P (GpP), codificada por el gen 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 (Klein, y cols., 1999). Desde 1997, se ha propuesto en consenso la recomendación para medir la GpP (Marie, y cols., 1997). En estudios multicéntricos realizados en pacientes con leucemia aguda, se ha estudiado a esta GpP (Marie, y cols., 1996), 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 multiresistencia a drogas. Leith, 1999, 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. El fenotipo de CD243 se ha asociado con la expresión de marcadores de mal pronóstico tales como CD34 y CD7 (Marie, y cols., 2003). En estudios realizados, en pacientes con LMA mayores de 60 años, se encontró una asociación entre la expresión de CD243 (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 (Holt, y cols., 2005).

Control de citocinas en la hematopoyesis normal y en leucemias.

El establecimiento *in vitro* de un sistema para el desarrollo clonal de las células hematopoyéticas, hizo posible descubrir las citocinas que regulan la hematopoyesis. Estas citocinas incluyen factores estimulantes de colonias y otros, que interactúan como una red con un acoplamiento en cascada entre las citocinas que estabilizan al sistema completo, permitiendo una flexibilidad y amplificación rápida de la respuesta a un estímulo particular. Una parte esencial de este sistema es la supresión de las

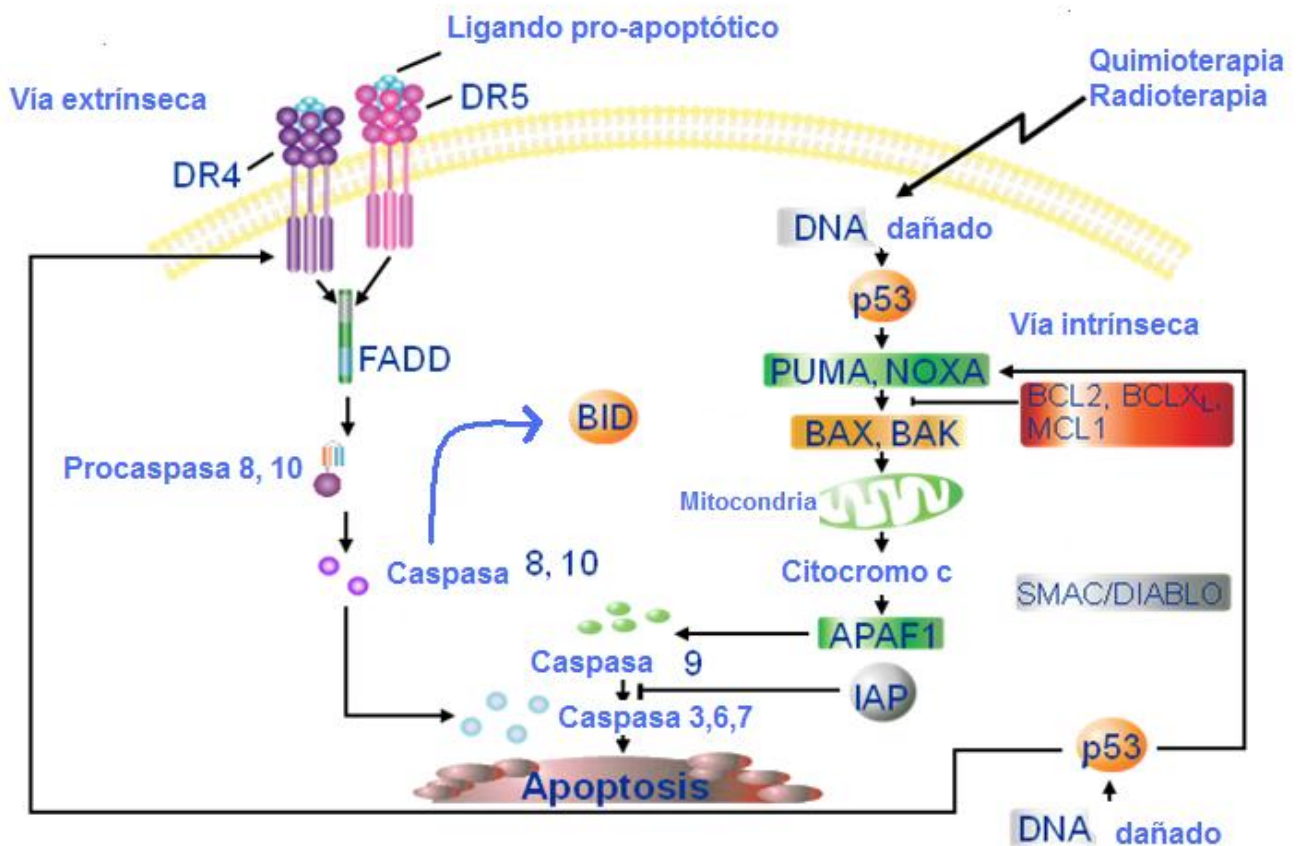
citocinas por los cambios en el balance de expresión de la apoptosis, induciendo y suprimiendo genes (Kitada, y cols., 2004).

La muerte celular ocurre por necrosis o apoptosis (Kanduc, y cols., 2002), estos dos **mecanismos** tienen diferentes signos histológicos y bioquímicos. En necrosis, el estímulo de muerte (ej: isquemia) es una causa directa de la muerte de la célula. En la apoptosis, 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. 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 (Hengartner, y cols., 2000).

A principios de 1993, una serie de estudios hechos en el nematodo *Caenorhabditis elegans* revelaron que varios genes controlan la muerte celular (Horvitz, y cols., 1999). En este gusano se requieren 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 (Li, y cols., 1997 y Hengartner, y cols., 1994). Las principales interventoras en el programa apoptótico son proteasas conocidas como caspasas (cisteína- dependiente, aspartato-proteasa específico) (Hengartner, y cols., 2000; Alnemri, y cols., 1996). Las caspasas son cisteín proteasas homólogas al producto génico *ced-3* del nematodo. Se han identificado más de 14 miembros de la familia de las caspasas, de los cuales 11 están presentes en los humanos (Yuan, y cols., 1993). 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 (Lotem, y cols., 2002). El genoma humano

codifica para 11 ó 12 caspasas, dependiendo de ciertos polimorfismos hereditarios; 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 (Kitada, y cols., 2002; Kitada, y cols., 2004; Inoue, y cols., 2000).

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 disparador importante de la cascada de caspasas. El citocromo c regula la activación de la vía intrínseca de muerte celular que ocurre 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, que a su vez activa a caspasa-3 (Li, y cols., 1997 y Liu, y cols., 1996). Este mecanismo regula la liberación del citocromo c, paso importante en la iniciación de la apoptosis (figura 1) (Ashkenazi, y cols., 2002).



Tomado de Ashkenazi, 2002.

Figura No 1. Principales vías de apoptosis. En la vía extrínseca, cuando Fas ligando induce la trimerización de Fas, se atraen los dominios de muerte de Fas y diferentes proteínas adaptadoras se unen a los dominios de muerte (FADD), que a su vez interactúan con la pro-caspasa 8, ésta una vez activada, activa a la pro-caspasa 3, la cual al activarse destruye a la proteína inhibitoria de la DNasa activada por caspasas (I-CAD). Una vez liberada la DNasa, ésta penetra al núcleo y corta las cadenas de DNA en fragmentos de 200 pares de bases. En la vía intrínseca, Bcl-2 inhibe los procesos que llevan a la muerte celular programada, ya que Bcl-2 interactúa con la membrana externa de la mitocondria evitando la salida del citocromo c, así como la unión de éste con Apaf-1; al no formarse el complejo Apaf-1-citocromo c, no se activan las caspasas, evitando así la apoptosis.

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. La apoptosis puede ocurrir en respuesta a un número de estímulos fisiológicos o patológicos (TNF, Fas ligando y drogas citotóxicas que dañen al DNA) (Reed, y cols., 2005).

Para la activación de las caspasas se requiere la participación de inhibidores intracelulares tales como 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. 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 (Lotem, y cols., 1996).

La capacidad de IL-3 para inducir la producción de IL-6 en los precursores hematopoyéticos normales, ya se ha confirmado (Schneider, y cols., 1991). La red de interacciones entre las diversas citocinas hematopoyéticas comprende a aquellas que pueden funcionar como inhibidores de la multiplicación de las células hematopoyéticas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF). Otras citocinas que participan en la red (Figura 2), incluyen al interferon gamma ($IFN\gamma$), IL-4, IL-10 y la IL-13, las cuales ejercen efectos negativos sobre la respuesta de las células hematopoyéticas mieloides a ciertos CSFs y sobre la producción de esas citocinas (Lotem, y cols., 1996). Esta red se puede usar con fines terapéuticos ya sea por la acción directa de una citocina inyectada o por un efecto indirecto debido a la acción de otras citocinas que son inducidas *in vivo* (Lotem, y cols., 2002).

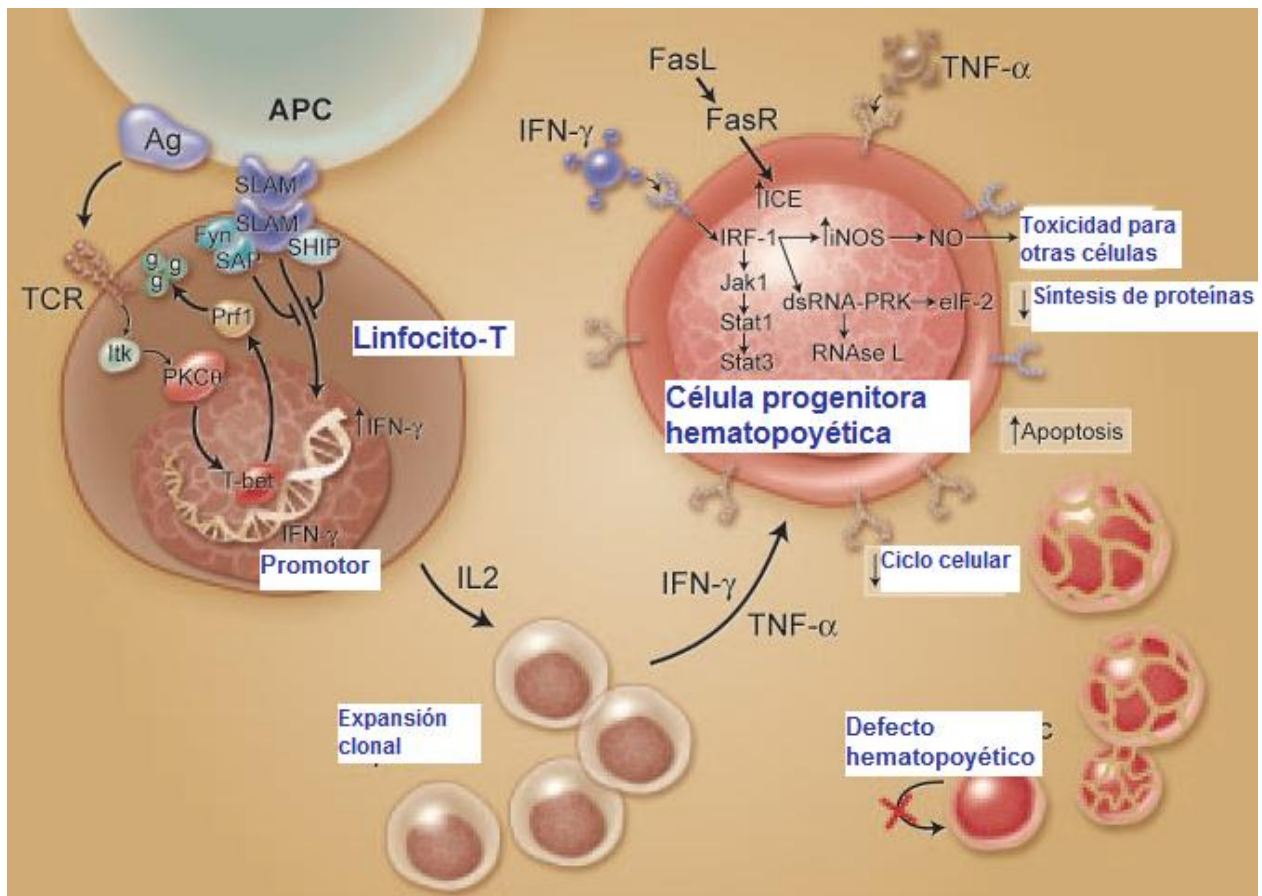


Figura No 2. Citocinas involucradas en la destrucción de las células hematopoyéticas. La producción elevada de IL-2 permite una expansión policlonal de las células T. La activación del receptor de Fas por su ligando, le permite a la célula llevar a cabo el proceso de apoptosis. Algunos efectos del IFN γ son mediados a través del factor regulador de interferón 1 (IRF-1), el cual inhibe la transcripción de genes para entrar al ciclo celular. El IFN γ es un potente inductor de genes celulares incluyendo al de la óxido nítrico sintasa inducible y por consiguiente, la producción de óxido nítrico (NO). (Tomado de Young, y cols., 2006).

El descubrimiento de que las células leucémicas mieloides pueden ser inducidas a diferenciarse y madurar tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando citocinas que induzcan su diferenciación y así recuperar el control del crecimiento normal y perder su capacidad de ser leucémicas, sentó las bases para el uso de la terapia de la diferenciación en la leucemia, aunque la capacidad de estas células leucémicas para ser inducidas a diferenciarse por las citocinas, no se debe a la corrección de sus anomalías cromosómicas. Los resultados obtenidos en ese trabajo pusieron de manifiesto que el programa de desarrollo anormal en las células leucémicas, puede ser reprogramado genéticamente mediante una diferenciación apropiada inducida

por citocinas (Lotem, y cols., 2002). Los experimentos realizados con células mieloides han demostrado que hay diferentes vías de expresión génica para inducir la diferenciación y los cambios genéticos, los cuales suprimen la inducción de la diferenciación (Cohen, y cols., 1981). Esos resultados muestran que las células mieloides leucémicas pueden ser reprogramadas y que hay una considerable plasticidad en el programa de diferenciación mieloide. También existen estudios en los que, tanto en células linfoides malignas como en normales, las interleucinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 e IL-9, suprimen la inducción de la apoptosis por dexametasona (Lotem, y cols., 1999).

Por otro lado se sabe que la angiogénesis es la formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura ya existente, y que juega un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos como en el crecimiento y esparcimiento metastásico de los tumores sólidos (Folkman, y cols., 1971); la angiogénesis es un proceso complicado en la enfermedad e involucra la degradación de proteínas de la matriz extracelular, la activación, proliferación y migración de las células endoteliales en forma multiescalonada (Folkman, y cols., 1995). Este proceso de neovascularización se regula a través de un impacto competitivo entre la influencia de inhibidores y activadores de la angiogénesis (Mangi, y cols., 2000). En la figura 3 se resumen los tres mecanismos que participan en la angiogénesis tumoral, a saber: A) crecimiento tumoral alrededor de los vasos sanguíneos, seguido por la apoptosis de las células endoteliales y pérdida de la integridad del vaso mediada por la sobreexpresión de angiogenina 2, de tal forma que el tumor induce la ramificación neovascular de los vasos circundantes (Holash, y cols., 1999), B) los precursores hematopoyéticos circundantes contribuyen a la regulación de la angiogénesis en el tumor (Asahara, y cols., 1997). Los receptores del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGFR-1 y VEGFR-2) se expresan por las células progenitoras hematopoyéticas y endoteliales, las cuales son movilizadas por VEGF que es liberado por el tumor (Lyden, y cols., 2001) y C) ciertos tumores pueden atraer células progenitoras diferenciadas incluyendo a las células cebadas, monocitos, macrófagos y células inflamatorias (Coussens, y cols., 1999). Estas células pueden inducir angiogénesis tumoral mediante la liberación de moléculas proangiogénicas o

metaloproteasas que permiten un aumento de la motilidad de las células endoteliales (Berges, y cols., 2000; Scott, y cols., 2000).

Por otro lado, se conocen más de 20 agentes proangiogénicos y antiangiogénicos (Basilico, y cols., 1992), de los cuales, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), se han establecido como los dos reguladores positivos de angiogénesis más potentes (Dvorak, 2002; Montesano, y cols., 1986). Sin embargo, otras citocinas como: IL-6, IL-8, factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), TGF- β , factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el receptor α de la Interleucina-1(IL-1R α), también están involucrados, pero sus papeles no se han definido claramente (Fuhrmann-Benzkein, y cols., 2000; Hatzie, y cols., 2002; Brizzi, y cols., 1999).

En estudios realizados (Faderl, y cols., 2005), en LLA del adulto de reciente diagnóstico en donde determinaron factores angiogénicos por el método de ELISA para evaluar su papel pronóstico, estos parecieron ser ambiguos en sangre periférica; los autores evaluaron los niveles plasmáticos de los factores angiogénicos VEGF, bFGF, IL-1R α , IL-6, IL-8, receptor 1 y 2 del VEGF (VEGFR-1 y VEGFR-2) y trombopoyetina (TPO). Utilizando un modelo multivariado de Cox, se encontró que los niveles elevados de IL-1R α , IL-8, VEGFR-1 y VEGFR-2 fueron predictivos de supervivencia global corta; en contraste, los niveles elevados de VEGF y bFGF predijeron una supervivencia larga. Sus resultados reflejaron el grado de complejidad mediante la cual, los factores angiogénicos pueden afectar el comportamiento clínico de los pacientes con LLA, lo que debe ser considerado en cualquier estrategia terapéutica al incorporar agentes antiangiogénicos (Faderl, y cols., 2005).

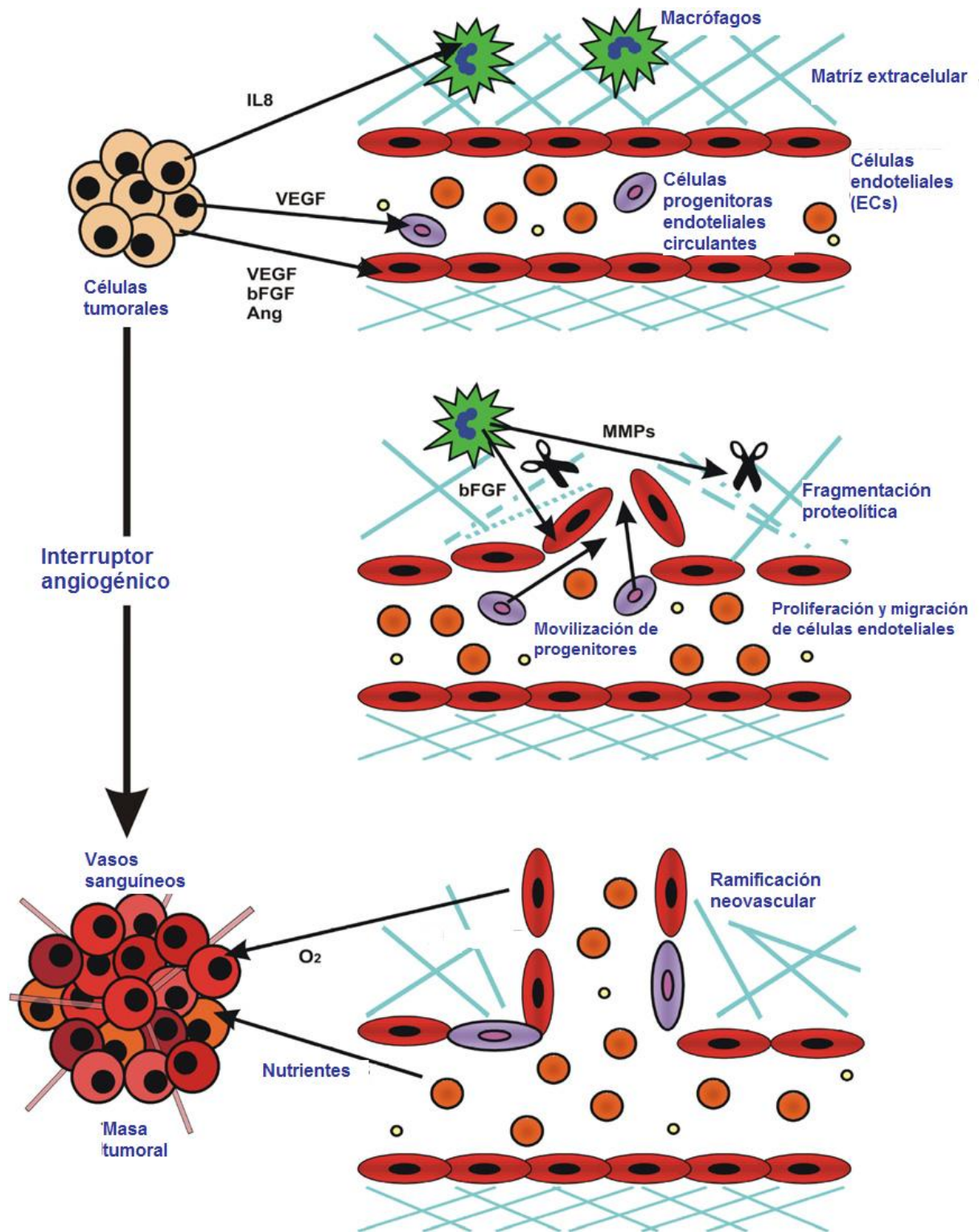


Figura No 3. Factores angiogénicos producidos por las células tumorales. Dichos factores angiogénicos, son capaces de estimular la proliferación y migración de las células endoteliales y, de reclutar células inflamatorias que secretan proteasas para degradar la matriz extracelular, movilizar las células endoteliales progenitoras circulantes y contribuir a la formación de la red vascular (Tomado de Persano, y cols., 2007).

Recientemente se ha reconocido que la desregulación de la angiogénesis constituye un paso importante en el desarrollo y progresión de los padecimientos hematológicos, y que las leucemias pueden invadir y proliferar en la médula ósea y otros órganos por mecanismos similares a los descritos en tumores sólidos (Thomas, y cols., 2001). La interacción entre las células endoteliales, el microambiente medular, los progenitores hematopoyéticos y las células leucémicas, juega un papel importante en el desarrollo del fenotipo leucémico, en virtud de la secreción de citocinas proangiogénicas y antiangiogénicas, así como en la expresión de receptores para esas citocinas por dichas células leucémicas. En un estudio realizado en 40 niños con LLA en donde se analizó el papel de los factores angiogénicos, se demostró que hubo un aumento significativo de la densidad de la microvasculatura en la médula ósea de los niños con LLA, en comparación con la médula ósea control; también se encontraron niveles elevados de VEGF y bFGF en pacientes en remisión (Pérez-Atayde, y cols., 1997).

En la intervención antiangiogénica se sabe que se inhibe el crecimiento y diseminación tumoral por medio de la alteración de la vasculatura tumoral; el grupo de Zhou, y cols., 2005, fue el primero en informar una estrategia alternativa, llamándola vacuna oral de DNA. El DNA utilizado codifica para el gen completo de FLK-1 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-2 murino), el cual previene la angiogénesis e inhibe el crecimiento tumoral, mediado por una respuesta inmune de células T CD8⁺. Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ son capaces de detectar y destruir específicamente a las células que porten dicho antígeno. Uno de los propósitos principales de las vacunas contra tumor, es inducir la respuesta de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺, contra tales epitopos para erradicar tumores y prevenir la recaída, ya que al destruirse las células endoteliales, se afecta el microambiente del tumor y esto es efectivo contra una variedad de enfermedades malignas, ya que se inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis (Zhou, y cols., 2005).

Varios estudios han demostrado que las células mesenquimales del estroma de la médula ósea (MSCs), estimulan la producción de IFN γ y pueden suprimir la respuesta de las células T alogénicas; el grupo de Stagg, y cols., 2006, describieron que MSCs derivadas de ratón C57BL/6, se comportaban como células presentadoras de antígenos (APCs) y podían inducir inmunidad protectora antígeno específica. Se sabe que las MSCs secretan un amplio espectro de factores de crecimiento y citocinas implicadas en diferentes aspectos de la hematopoyesis (Deans, y cols., 2000) y linfopoyesis (Tarlakovic, y cols., 2005).

En estudios realizados *in vitro*, el IFN γ mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre los progenitores hematopoyéticos y las células tallo. En general, los resultados de Zeng, y cols., 2006, proponen que el IFN γ *in vitro*, inhibe completamente la actividad de las células tallo y de células más comprometidas en su diferenciación a través de la activación de vías apoptóticas. Los mecanismos que juegan un papel importante en la destrucción de la célula tallo por el IFN γ involucran a las perforinas y las vías de Fas (Luther-Wyrsh, y cols., 2001), ya que se ha encontrado sobreexpresado el IFN γ en la médula ósea y sangre periférica de pacientes con anemia aplásica (Nistico, y cols., 1994; Sloand, y cols., 2002).

En relación con la regulación de las células T cooperadoras (Th) tipo 1 y 2, en el balance de las citocinas Th1/Th2 vía las interacciones entre las células dendríticas y las NKT, se sabe que estas últimas son capaces de producir grandes cantidades de citocinas Th1 como: IFN γ y las de tipo Th2 como la IL-4. El IFN γ producido por células NKT incrementa la respuesta inmune innata, mientras que la respuesta Th1 dependiente de las células NK y CD8⁺ permite la eliminación de patógenos y de células tumorales. Las células NKT además se sabe que regulan la respuesta inmune en varias enfermedades autoinmunes en roedores y en humanos, y esta es dependiente de la producción de IL-4 (Arase, y cols., 1993). Respecto a las células dendríticas, estas son células presentadoras de antígenos y las responsables de la

iniciación y regulación de la respuesta inmune contra varios antígenos (Hart, 1997; Banchereau, y cols., 1998).

Se sabe que la IL-4 y el IFN γ , son mediadores importantes en la respuesta inmune, están implicadas en la progresión de padecimientos como leucemia; en estudios realizados en niños con LLA por Zhang, y cols., 2000, se demostró que, los niños con leucemia, presentaron niveles significativamente más bajos de células Th1 y más altos de células Th2, sugiriendo que la expresión alterada de citocinas, juega un papel importante en el desarrollo de la leucemia.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La elevada frecuencia de recaídas en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) del adulto, aunado a que se sabe poco acerca de la fisiopatología de este padecimiento, estimula a realizar trabajos en el área, particularmente en población mexicana donde no se han realizado estudios del análisis simultáneo de las proteínas Bcl-2, Fas, caspasa-3 activada; ya que es importante determinar dichas proteínas en los blastos tumorales de los pacientes, tomando en consideración su importancia en la supervivencia celular, así como relacionar la expresión de dichas proteínas con el comportamiento clínico de la enfermedad.

En relación con los estudios realizados respecto a la angiogénesis, ésta juega un papel muy importante en la nutrición de los tumores, además de ser la vía a través de la cual tienen acceso los agentes quimioterapéuticos utilizados. A este respecto pocos son los trabajos realizados en LLA del adulto, que permitan predecir el comportamiento y pronóstico de la enfermedad; por lo que se considera importante determinar los niveles de citocinas extracelulares en el nicho medular, así como las citocinas que intervienen en la angiogénesis como la angiogenina, VEGF, bFGF e IL-8 y las que participan en la respuesta Th1/Th2 como IFN γ , IL-4 e IL-6 respectivamente; y determinar su valor pronóstico en pacientes con LLA para que con base en esto, el hematólogo pueda planear esquemas de tratamiento más agresivos o específicos a través del uso de agentes antiangiogénicos.

HIPÓTESIS

Los niveles de expresión de las proteínas que intervienen en la apoptosis: Fas, caspasa 3 activada; antiapoptóticas: Bcl-2; angiogénicas: angiogenina, VEGF, bFGF, IL-8 y las que intervienen en la respuesta Th1/Th2: IFN γ , IL-4 e IL-6, afectan el comportamiento clínico de los pacientes con LLA *de novo*.

OBJETIVO

Correlacionar los niveles de expresión de proteínas apoptóticas y antiapoptóticas en las células blásticas, así como angiogénicas y de respuesta Th1/Th2 en matriz de médula ósea de pacientes con LAL *de novo* y su valor pronóstico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el valor pronóstico de la expresión de CD243 (MDR), Fas, caspasa-3 activada, CD34, Bcl-2, así como la incidencia de éstos en la población adulta con diagnóstico de LLA *de novo*.
- Determinar los niveles de las citocinas extracelulares para angiogénesis: IL-8, bFGF, angiogenina y VEGF en médulas óseas provenientes de pacientes con LLA *de novo* y anemia megaloblástica (grupo control).
- Determinar los niveles de las citocinas extracelulares que participan en la respuesta Th1/Th2: IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ en médulas óseas provenientes de pacientes con LLA *de novo* y anemia megaloblástica (grupo control).

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

Criterios de inclusión.

Pacientes mayores de 16 años que ingresaron al Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS, con diagnóstico clínico y morfológico de LLA, cuya muestra de médula ósea contenía celularidad suficiente ($CN > 4.0 \times 10^9/L$) para realizar el inmunofenotipo.

Pacientes mayores de 16 años que ingresaron al Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS, con diagnóstico clínico y morfológico de anemia megaloblástica. En ambos casos se solicita el consentimiento por escrito para la toma de médula ósea.

Criterios de exclusión.

Pacientes que ingresaron al Departamento de Hematología con diagnóstico de LLA, y que habían recibido tratamiento previamente.

Criterios de no inclusión.

Pacientes cuya médula ósea no contenía celularidad suficiente para el estudio de inmunofenotipo, o que decidieron no participar en el estudio.

Métodos.

Se realizó el análisis morfológico en sangre periférica y médula ósea utilizando la tinción de Wright para determinar la morfología blástica linfoide; además de las tinciones citoquímicas: ácido periódico Schiff (PAS), mieloperoxidasa, fosfatasa ácida y alfa naftil acetato esterasa; en todos los casos se aplicaron los criterios del grupo Franco-Americano-Británico (FAB) para realizar el diagnóstico.

A partir de cada una de las muestras se realizó la cuantificación de las células nucleadas por método automatizado, utilizando el equipo Sysmex XT-2000i para ajustar la cantidad de células a $10^6/100 \mu\text{L}$ en PBS a partir de la cual se tomaron alícuotas de $100 \mu\text{L}$ para ser depositadas en tubos Falcon, posteriormente, a todas las muestras se les realizaron estudios de inmunocitofluorometría y se les aplicaron los criterios del Grupo Europeo para la Inmunotipificación de las Leucemias (EGIL) (Bene, y cols., 1995) y así poder caracterizar a cada una de ellas. Los anticuerpos monoclonales que se utilizaron para realizar la caracterización de las leucemias fueron: HLADR-PerCP, CD34PerCP, TdT-FITC, CD117PerCP, anti-glicoproteína-P-PE, CD5PerCP, CD7FITC, CD10FITC, CD19PerCP, CD20PerCP, CD22FITC, CD79aPE, antiIgM-PE, CD13PE, CD14PerCP, CD15PE, CD33PE, CD64FITC, CD41aFITC, CD235aPE, antiLin1FITC, CD123, CD11cAPC así como los marcadores de interés para este trabajo: Fas-PE, antiBcl-2FITC, anti caspasa-3 activadaPE.

Cuenta de células nucleadas.

Se obtuvo la cuenta de células nucleadas ($\times 10^9 / \text{L}$) utilizando el equipo Sysmex XT-2000i. Se ajustó la concentración de células nucleadas a $10^6 \text{ cel} / 100\mu\text{L}$ en PBS de acuerdo con la fórmula

$$C_1 V_1 = C_2 V_2; \text{ para obtener } V_2 = (C_1 V_1) / C_2.$$

Donde:

C_1 = Concentración de células nucleadas contadas en el equipo Sysmex XT-2000i.

V_1 = Volumen inicial de la alícuota de células.

C_2 = Concentración final de células a la que se quiere llegar.

V_2 = Volumen final al que se aforó.

Material biológico.

Se analizaron muestras de aspirado de médula ósea y sangre periférica de 130 individuos: 111 pacientes mayores de 16 años, quienes fueron diagnosticados de acuerdo con los criterios del grupo FAB como LLA *de novo*; y 19 pacientes con anemia megaloblástica (controles no oncohematológicos), a cada uno de los cuales se les obtuvieron 5 mL de sangre periférica y 5 mL de médula ósea, ambas muestras heparinizadas; todos ellos con consentimiento informado. Los niveles de expresión para Bcl-2, CD243, Fas y caspasa-3 activada; fueron evaluados en 111 pacientes con diagnóstico de LLA y 19 controles; las concentraciones de citocinas para angiogénesis y de respuesta Th1/Th2 fueron realizadas en plasma de médula ósea de 48 pacientes y 19 controles.

Análisis de citometría de flujo.

Todas las determinación de los diferentes marcadores de superficie e intracelulares en las células blásticas se realizaron por citometría de flujo utilizando un equipo FACSCalibur de 4 colores (Becton-Dickinson, San José California).

Calibración del equipo.

Se calibró el equipo utilizando perlas calibradoras y el programa "FACSCComp" para obtener las condiciones óptimas de éste en los voltajes de los tubos fotomultiplicadores, compensación de fluorescencias y sensibilidad. Para lograr esto se colocó en el tubo **1**: 1 mL de amortiguador de fosfatos más una gota de perlas sin teñir y una gota de perlas marcadas con APC; en el tubo **2**: 3 mL de amortiguador de fosfatos, una gota de perlas sin teñir, una gota de perlas teñidas con isotiocianato de fluoresceína, una gota de perlas teñidas con ficoeritrina, una gota de perlas teñida con PerCP y una gota de perlas teñidas con APC.

Los voltajes promedio con los que se obtuvieron las condiciones óptimas del citómetro fueron las siguientes:

PARÁMETRO	DETECTOR	AMPLIFICADOR	UMBRAL	COMPENSACIÓN
FSC(tamaño)	E 00	2.96	110	
SSC(granularidad)	412	1.00		
FL 1	740	Log		
FL 2	680	Log		
FL 3	782	Log		
FL4	722	Log		
FL1 - %FL2				1.8
FL2 - %FL1				22.9
FL2 - %FL3				1,8
FL3 - %FL2				11,8
FL3 - %FL4				0,4
FL4 - %FL3				7,0

La corriente de los LASER fue de 6.24 amperios y un poder de los mismos de 14.55 mWatt.

Preparación de las muestras para el análisis.

Tinción:

En tubos Falcon se colocaron 10^6 células blásticas en 100 μ L de amortiguador de fosfatos, se adicionaron 20 μ L de anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, PerCP o APC; se mezcló e incubó durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad, transcurrido el tiempo se adicionó 1 mL de solución de lisis (1:10) y se mezcló e incubó durante 10 minutos a 4 °C en la oscuridad; una vez transcurrido el tiempo se centrifugó 300 X g durante 5 minutos, se decantó y se adicionaron 2 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) y se resuspendió, se volvió a centrifugar a 300 X g durante otros 5 minutos, transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y a los tubos que iban a marcarse con anticuerpos intracelulares, se les adicionó 200 μ L de solución permeabilizadora (1:10) e incubó durante 10 minutos

a 4 °C, posterior a esto, se les adicionó 2 mL de PBS, se centrifugó a 300 X g durante 5 min, se decantó y se les adicionó el anticuerpo intracelular de interés, se incubó durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad, transcurrido el tiempo se les adicionó 2 mL de PBS, se centrifugaron nuevamente a 300 X g durante 5 minutos, se decantó y a todos los tubos se les adicionó 0.8 mL de amortiguador de fosfatos más 0.2 mL de paraformaldehído al 1 % en solución salina isotónica. Se resuspendió en vortex a baja velocidad y finalmente con el tubo en esas condiciones se adquirieron los datos.

Adquisición de datos de los marcadores intra y extracelulares.

La adquisición de los datos para marcadores extra e intracelulares se realizó con el programa de “Cell Quest Pro” versión 5.1.1.

Se adquirieron 50,000 eventos en toda la población celular y con el tubo de control de isotipo se seleccionó la región blástica con CD45^{low} ajustando primero la autofluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes en una gráfica de puntos en la escala logarítmica 10^1 , tanto para el eje de las abscisas (FL1, isotiocianato de fluoresceína o FL3, PerCP) como para el eje de las ordenadas (FL2, ficoeritrina o FL4, APC), colocando dicha autofluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo en un porcentaje mínimo de 99.0 %.

Una vez fijados los marcadores de autofluorescencia, se procedió a adquirir las suspensiones celulares de los demás tubos en donde ya había células a las cuales estaban unidos los anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, PerCP, APC), respetándose tanto la región como la localización de los cuadrantes.

Análisis.

Se obtuvieron los resultados de dicha región para los diferentes marcadores monoclonales en forma de porcentaje. Fue importante que la región de las células seleccionadas mostrara porcentajes mayores del 20 % para antígenos extracelulares, y mayores de 10 % para antígenos intracelulares de acuerdo con los

criterios propuestos por el grupo EGIL. Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Becton Dickinson (San José CA. USA).

En el caso de la determinación de caspasa-3 activada, antes de llevar a cabo la tinción con el anticuerpo, primero se procedió a inducir la formación de caspasa-3 activada con camptotecina.

Inducción de apoptosis con camptotecina.

Se preparó una solución madre de camptotecina 1 mM (Sigma Chemical cat. No C-9911) en dimetilsulfóxido (DMSO Sigma Chemical). Se adicionó la camptotecina de 4-6 μM por cada $4-5 \times 10^5$ cels/mL (concentración final). Se incubó de 4-6 horas a 37 °C. Se procedió a la tinción intracelular para la detección de la caspasa-3 activada de acuerdo al procedimiento establecido por el fabricante (Johnson, y cols., 1997).

Determinación de citocinas extracelulares por el método de CBA (Cytometric Bead Array).

Método basado en un inmunoensayo en perla, capaz de detectar concentraciones de pg/mL; para la determinación de las proteínas solubles de nicho medular se utilizó este método de acuerdo al procedimiento establecido por el fabricante; todos los reactivos utilizados fueron de la marca Becton Dickinson (San José CA. EUA), y se analizaron con el programa CBA. A partir de los plasmas de médula ósea congelados a -73 °C. Las determinaciones que se realizaron fueron para: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN γ y para angiogénesis: IL-8, bFGF, angiogenina y VEGF.

Procedimiento.

Para la preparación de la curva estándar, se realizaron diluciones seriadas 1:2 con solución amortiguadora de la citocina de interés a partir de una solución concentrada de la misma. Se mezclaron 10 μL de suspensión de perlas de cada citocina humana a determinar, se centrifugó 200 X g durante 5 minutos y eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las perlas con amortiguador de fosfatos (misma cantidad que se eliminó), e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se

transfirieron 50 μ L de perlas mezcladas a cada tubo de ensayo, y adicionaron 50 μ L de reactivo de detección. Posteriormente se adicionaron 50 μ L de diluciones de estándar y los sueros por analizar a los tubos correspondientes previamente marcados. Se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas en la oscuridad. Se lavaron todos los tubos con amortiguador de lavado, y se centrifugaron a 200 X g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 300 μ L de amortiguador a cada tubo y se procedió al análisis de las muestras.

Adquisición de las muestras.

Se utilizó el programa de CBA y un citómetro de flujo FACSAria (BD San José CA, USA), el cual se colocó en modo de adquisición. En una de gráfica de tamaño vs granularidad en modo Log, se disminuyeron los voltajes de granularidad a 100, y colocó el umbral de granularidad a 650. Se adquirieron todos los eventos utilizando la plantilla creada en este programa para tal fin.

Análisis de las muestras.

Se siguieron las guías del usuario, se transfirieron los archivos FACS del experimento, a la computadora con el programa CBA y se crearon dos nuevos archivos que se etiquetaron: uno como estándares y otro como muestras.

Análisis estadístico.

Fue un estudio prospectivo observacional en donde se realizó comparación de las medianas de las proteínas en estudio entre el grupo de pacientes con el grupo donador de médula ósea no oncohematológica. Para este propósito se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Para evaluar el valor pronóstico de cada marcador celular se utilizó el modelo de regresión logística.

Se evaluó la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a partir del día en que el paciente logró la remisión de la enfermedad, hasta el día en que se presentó la recaída o muerte, y la supervivencia global (SG) a partir del diagnóstico de la enfermedad hasta la fecha de muerte o última evaluación. Para este propósito se utilizó la curva de Kaplan y Meier y la comparación entre dos o más curvas se

analizó por medio de la prueba de logaritmo de rangos. Para el análisis estadístico de todos los resultados se utilizó el programa de SPSS versión 15.0.

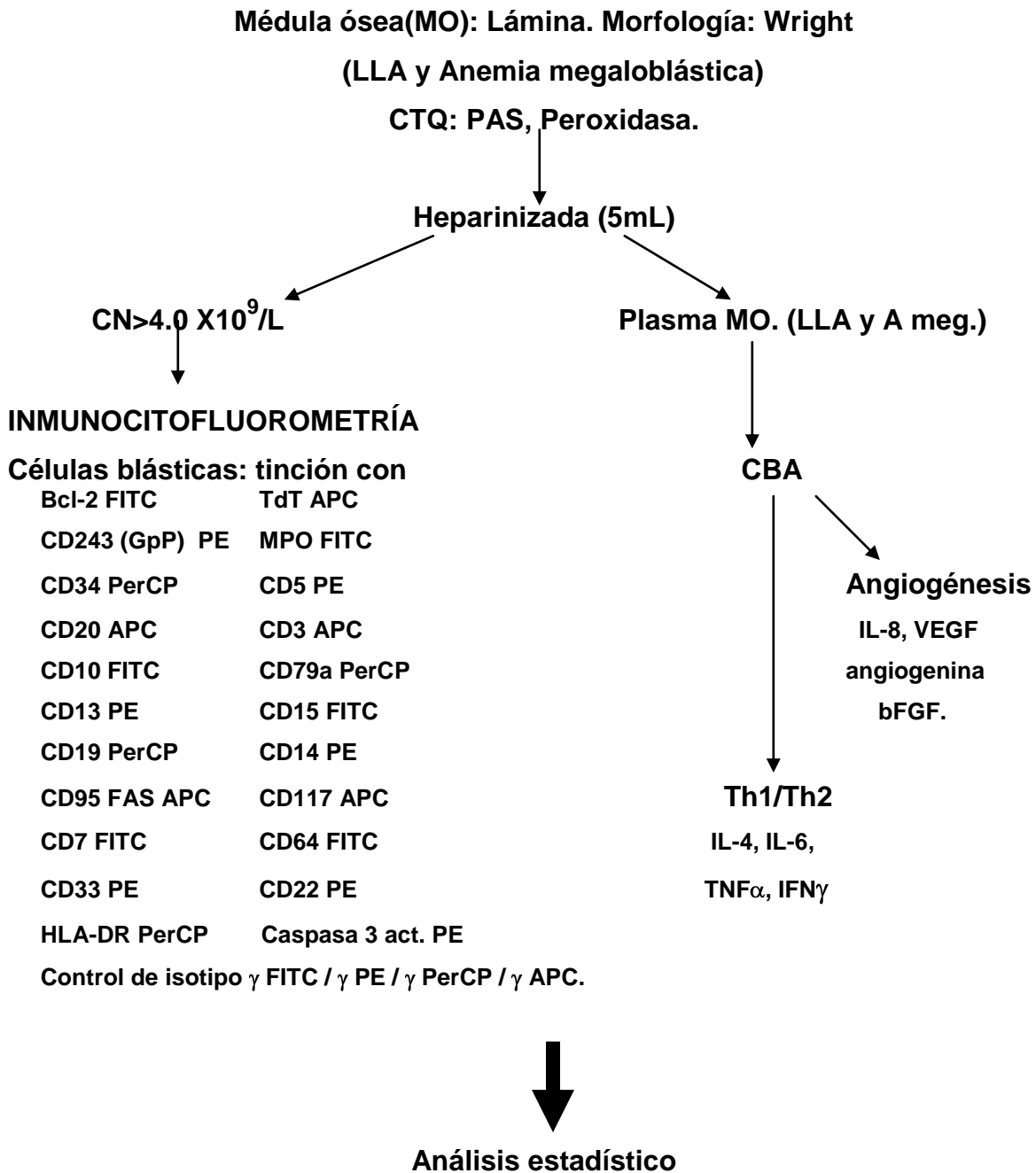


Figura 4. Diagrama de trabajo para el estudio de las proteínas pro, antiapoptóticas y citocinas de nicho medular en pacientes con LLA *de novo*.

III. RESULTADOS.

Se analizaron 130 individuos, 111 pacientes y 19 médulas óseas de pacientes con anemia megaloblástica (control no oncohematológico). Al clasificarlos de acuerdo a los criterios del grupo Franco Americano Británico, 5 fueron del tipo LLA L1 y 106 del tipo LLA L2. De los pacientes, 56 fueron hombres y 55 mujeres, de los testigos 8 hombres y 11 mujeres, la mediana de edad para pacientes fue 30.4 años con un intervalo de 16 a 73. En relación con los testigos la mediana de edad fue de 49 años con un intervalo de 26 a 74. Los resultados se resumen en la **Tabla 1** y se representan en la **Figura 5**. En ambas se muestra la mediana de edad del grupo de estudio, distribuidos por inmunofenotipo de acuerdo a los criterios del grupo EGIL. Llama la atención que la LA bifenotípica se presentó en el grupo más joven con una mediana de edad de 23 años.

Tabla 1. Distribución de la población estudiada por inmunofenotipo y mediana de edad.

Grupo	No	Porcentaje	Edad (años)	
			Mediana	Rango de edad
LLA-B	56	43	35.5	16-69
LLA-B/ CD33+	16	12	32	16-60
LLA-T	16	12	31	16-73
LA-bifenotípica	23	18	23	16-66
Grupo testigo	19	15	49	26-74
Total	130			

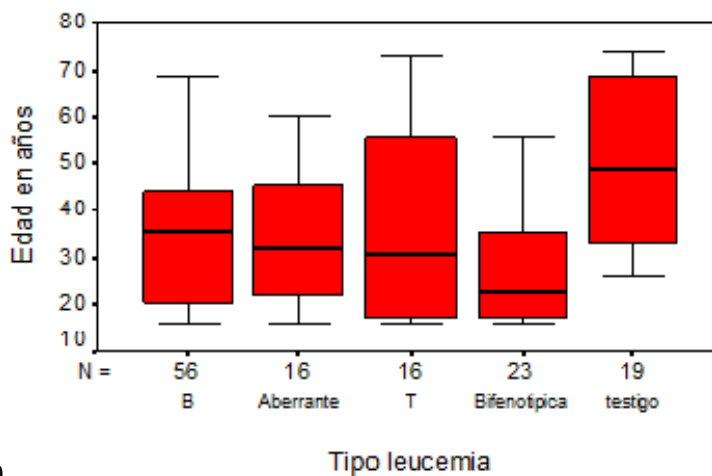


Figura 5. Distribución de la población estudiada por edad e inmunofenotipo. El gráfico muestra la comparación entre las medianas de edad (años), los percentiles 25 y 75 % y el rango de edad de los diferentes grupos de estudio.

En la caracterización de las muestras del grupo de estudio por inmunofenotipo se obtuvieron los resultados que se resumen en la tabla No 1, donde se muestra que: 56 (43 %) de los casos fueron de LLA de estirpe B, siendo ésta la más frecuente, seguida por LA bifenotípica 23 (18 %), 16 (12 %) de LLA de estirpe T, 16 (12 %) de LLA de estirpe B con un marcador mielóide aberrante y 19 (15 %) del grupo control.

La caracterización inmunofenotípica de las leucemias linfoides agudas de acuerdo con los criterios propuestos por el grupo EGIL, en este grupo de pacientes, se determinaron los antígenos HLADR, CD34, TdT, CD10, CD19, CD22; encontrando que los pacientes con LLA-B, más un marcador mielóide aberrante, LA bifenotípica y LLA-B presentaron niveles de expresión más altos para estos marcadores que el grupo testigo y que el grupo de LLA-T; los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Comparación de las medianas de expresión de los marcadores HLADR, CD34, TdT, CD10, CD19, CD22 con el grupo testigo y el valor de p.

Medianas de los marcadores							
Grupo	%HLADR	%CD34	%TdT	%CD10	%CD19	%CD22	P
LLA-B	76.5	55.7	20.0	12.2	45.2	55.5	<0.05
LLA-B/CD33+	85.6	70.8	23.1	40.0	34.6	29.8	<0.05
LLA-T	29.4	4.4	1.4	0.4	3.3	5.8	>0.05
LA-Bifenotípica	84.6	86.1	15.5	10.0	37.8	29.7	<0.05
Testigo	24.3	2.5	0.6	0.5	5.8	5.2	

En la **Tabla 2** se muestra que el HLADR se expresa en mayor porcentaje en LLA-B con un marcador aberrante CD33⁺, LA bifenotípica y LLA-B; y en menor porcentaje

en LLA-T. La misma relación se presentó para CD34, TdT, CD10, CD19 y CD22, obteniendo diferencias significativas para todos los grupos, con relación al grupo testigo, excepto para LLA-T.

El marcador mielóide que se presentó en las LLA-B fue CD33, y en las LA bifenotípicas fueron CD13 y CD33; presentándose como doble positivo la expresión de CD10/CD13, como se muestra en la **Figura 6**.

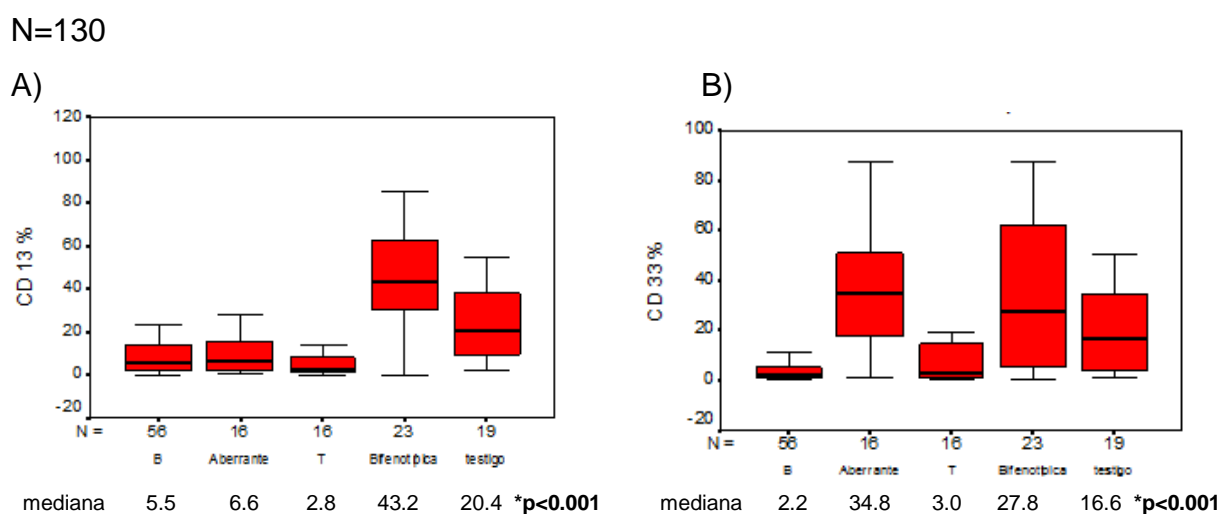


Figura 6. Comparación de las medianas de los niveles de expresión de CD13 y CD33 en la población estudiada. . El gráfico muestra la comparación entre las medianas de A) CD13 (en porcentaje), y B) CD33, los percentiles 25 y 75 % y el rango de expresión de dichos marcadores (porcentajes) para los diferentes grupos de estudio.

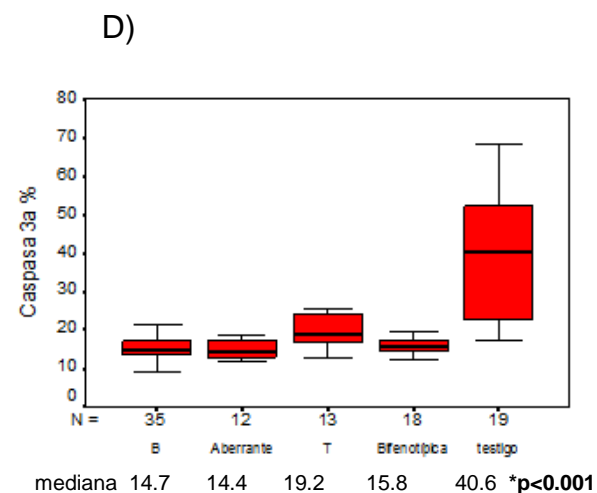
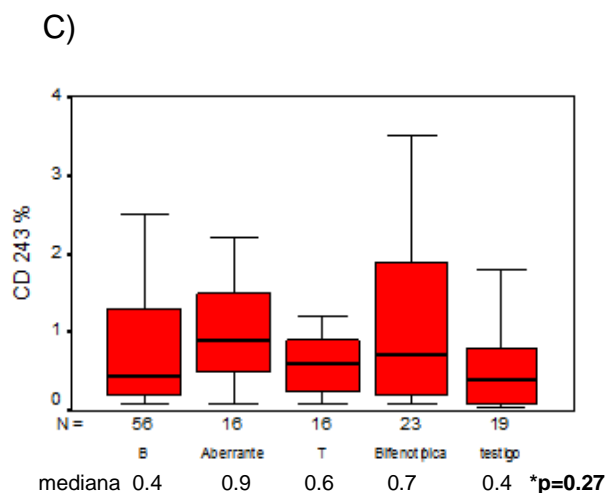
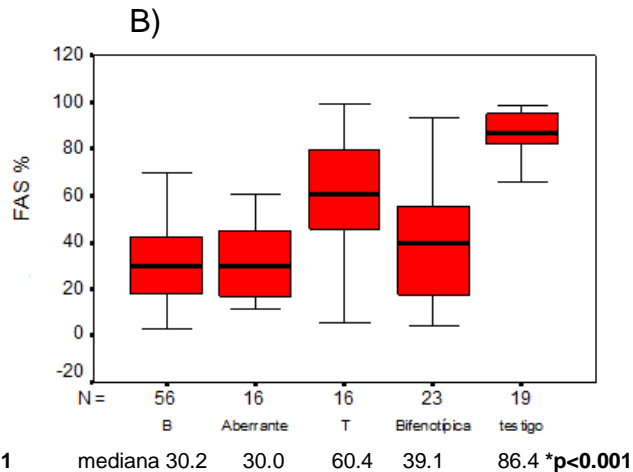
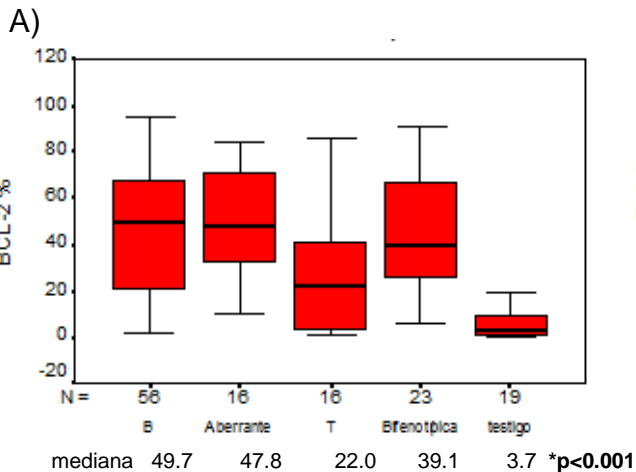
La expresión de proteínas de apoptosis y antiapoptosis, se encontró elevada para Bcl-2, disminuidos para Fas y Caspasa-3 activada en los grupos de LLA-B, LLA-B con marcador mielóide aberrante y LA bifenotípica, respecto al grupo testigo ($p < 0.05$) y de LLA-T; los resultados se resumen en la **Tabla 3** y se muestran en la **Figura 7**.

Tabla 3. Comparación de las medianas de expresión de las proteínas Bcl-2, Fas, CD243, caspasa-3 activada contra el grupo testigo y valores de p.

Medianas de los marcadores

Grupo	%Bcl-2	%CD95Fas	%CD243	%Casp3a	P
LLA-B	49.7	30.2	0.4	14.7	<0.05
LLA-B/CD33+	47.8	30.0	0.9	14.4	<0.05
LLA-T	22.0	60.4	0.6	19.2	>0.05
LA-Bifenotípica	39.1	39.1	0.7	15.8	<0.05
Testigo	3.7	86.4	0.4	40.6	

N=130



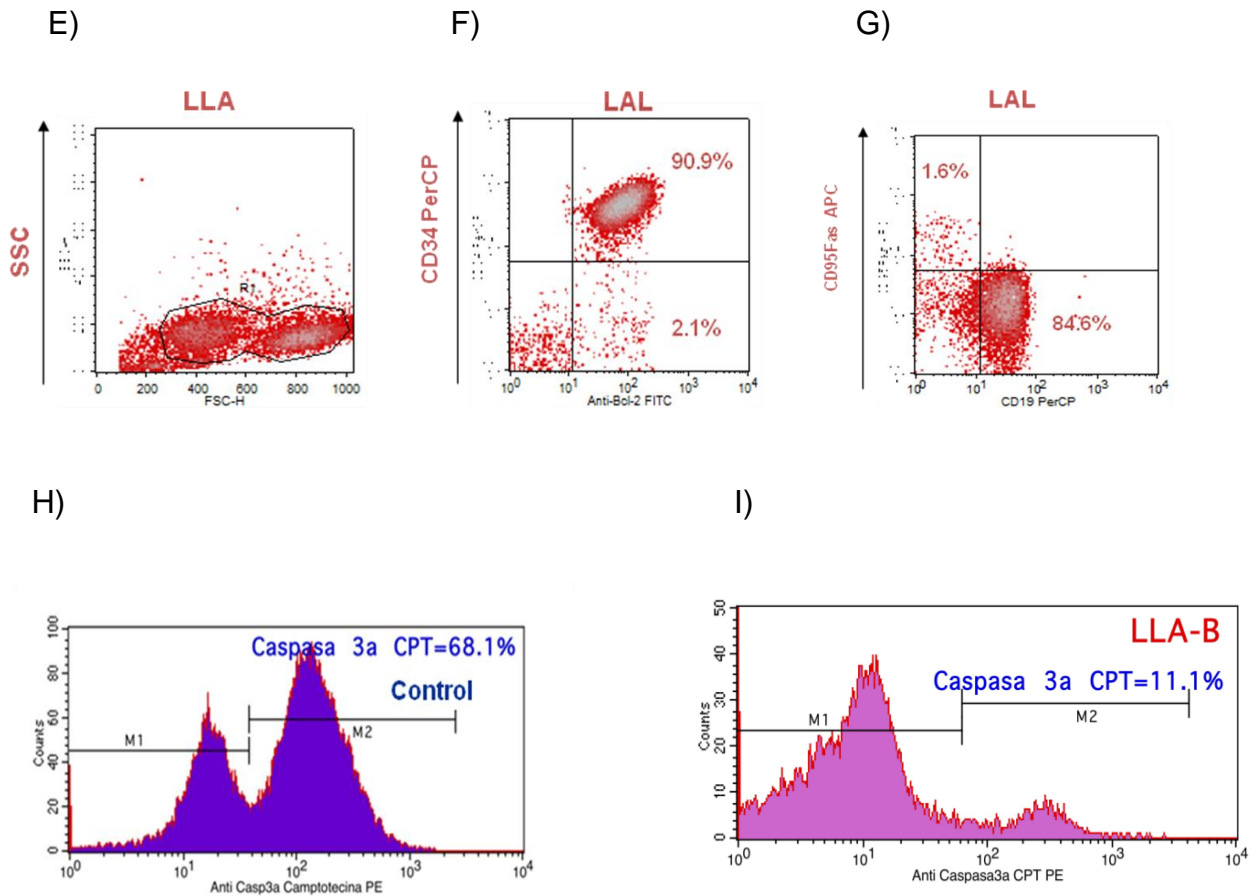


Figura 7. Comparación de las medianas de los niveles de expresión para: Bcl-2, Fas, CD243, caspasa-3 activada, e imágenes de citometría para éstas proteínas, en la población estudiada. Los gráficos A, B, C y D, muestran la comparación entre las medianas, los percentiles 25 y 75 %, así como el rango de expresión (en porcentaje) para: Bcl-2, Fas, CD243 y caspasa-3 activada respectivamente, en los diferentes grupos de estudio. En E, F y G, se muestran imágenes de puntos de citometría de flujo obtenidas para: tamaño vs granularidad; Bcl-2 vs CD34+; CD19 vs Fas respectivamente. En H e I se muestran los histogramas de la expresión para caspasa-3 activada de células control como para células blásticas de los pacientes con LLA *de novo* respectivamente.

Desde que se inició el protocolo se realizó el seguimiento de los pacientes, por lo que con los resultados obtenidos y el seguimiento, se realizaron las curvas de supervivencia de Kaplan y Meier, por diagnóstico: LLA-B, LLA-B con CD33+, LLA-T, LA-bifenotípica, y el grupo de LLA-B con CD33+ más LA-bifenotípica, encontrando que presentan mejor pronóstico y supervivencia libre de enfermedad los pacientes con LLA de estirpe T que el resto de los grupos, ya que este grupo de pacientes presenta una mediana para SLE de 207 días ($P < 0.01$), no observándose lo mismo en la supervivencia global (SG) ($P = 0.1$), dado que en esta última todos los grupos de

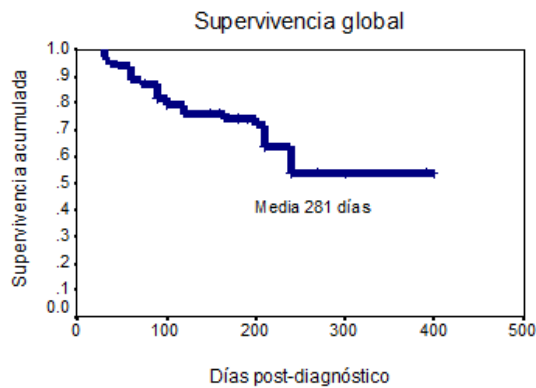
estudio presentan SG mayores a 210 días y menores a 275; como se muestra en la **Tabla 4** y **Figura 8**.

Tabla 4. Comparación de las medianas de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE); valores de p del grupo de pacientes estudiados.

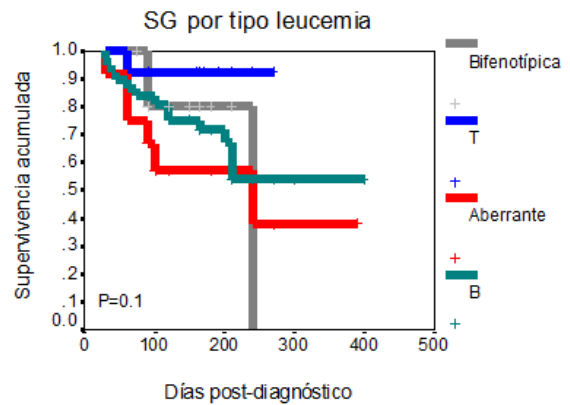
Grupo	SG mediana (días)	P	SLE mediana (días)	P
LLA-B	275	0.1	180	0.02
LLA-B/CD33+	224	0.1	90	0.02
LLA-T	254	0.1	207	0.02
LA-Bifenotípica	210	0.1	109	0.02
LA Aber+bifen	243	0.1	109	0.01

N=111

A)



B)



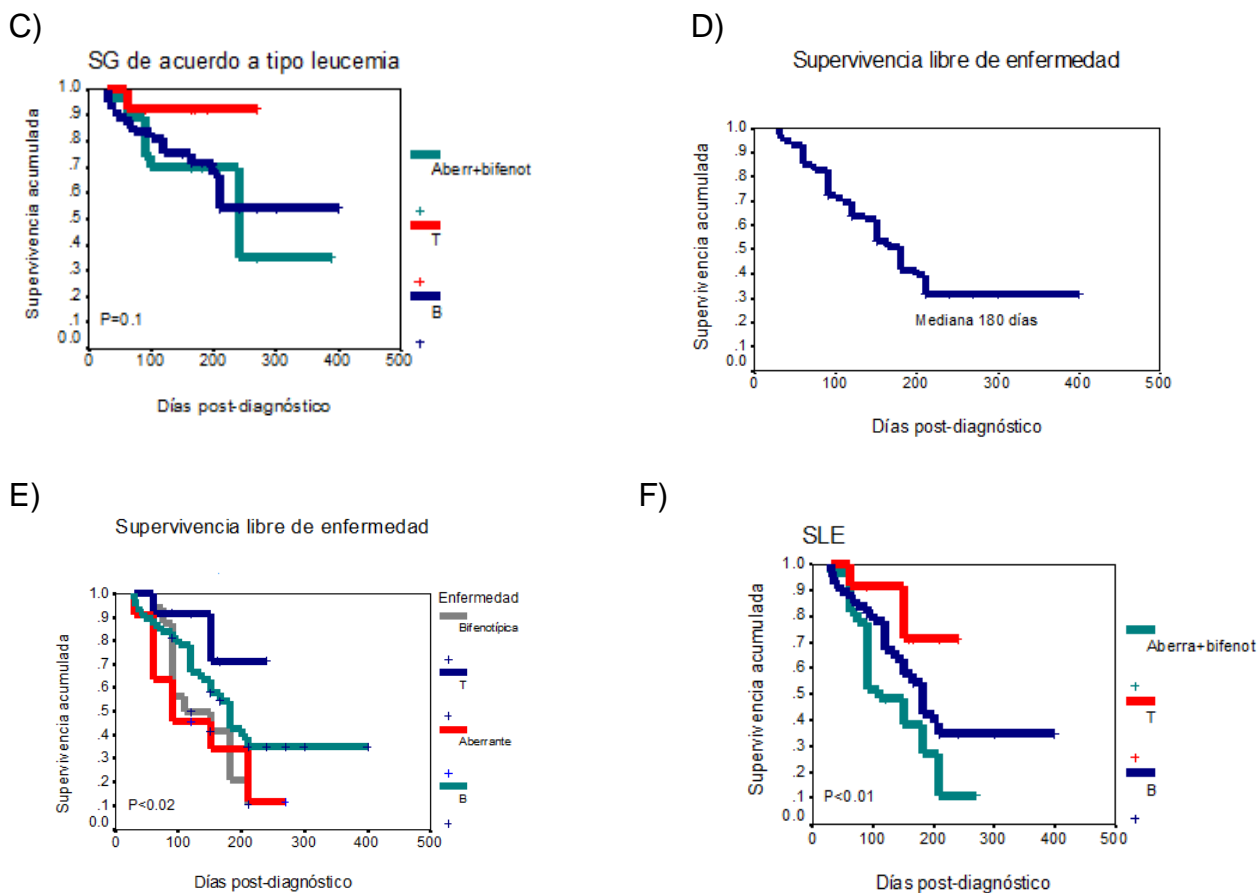


Figura 8. Supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad del grupo de pacientes estudiados, distribuidos por diagnóstico definitivo. En A y D se muestra supervivencia global y libre de enfermedad de todo el grupo de pacientes; en B y E comparación de las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad por tipo de leucemia respectivamente; y C y F comparación de las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad, cuando se unen los grupos de LLA con un marcador mielode aberrante con LA-bifenotípica del grupo de pacientes con LLA *de novo*. B, C, E y F muestran además que las LLA-T son las que presentaron mejor pronóstico y mayor supervivencia global y libre de enfermedad.

Se relacionó la SLE de cada uno de los grupos de acuerdo con la expresión de las proteínas Bcl-2, Fas, CD243 y caspasa-3 activada en las células blásticas de pacientes con LLA *de novo* para lo cual se tomaron en consideración como valores de corte, solamente aquellos que estuvieron por arriba de la mediana, obteniendo nuevamente mejor pronóstico para los pacientes del grupo de LLA-T; se observó que la diferencia en la SLE para LLA-T con respecto al resto de los grupos, fue significativa: para Bcl-2 (P<0.008), para Fas (P<0.009), CD243 (P<0.01) y para caspasa-3 activada (p<0.02), como se resume en **Tabla 5** y **Figura 9**.

Tabla 5. Comparación de las medianas de las curvas de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con LLA *de novo* distribuidos por diagnóstico definitivo y proteína en estudio.

Grupo de estudio	Mediana de expresión / valor de P (Bcl-2 alto)	Mediana de expresión / valor de P (CD95Fas alto)	Mediana de expresión / valor de P (CD243 alto)	Mediana de expresión / valor de P (Casp-3 act.alto)
LLA-B	49.7 / (0.008)	30.2 / (0.009)	0.4 / (0.01)	14.7 / (0.02)
LLA-B/CD33+	47.8 / (0.008)	30.0 / (0.009)	0.9 / (0.01)	14.4 / (0.02)
LLA-T	22.0 / (0.008)	60.4 / (0.009)	0.6 / (0.01)	19.2 / (0.02)
LA-Bifenotípica	39.1 / (0.008)	39.1 / (0.009)	0.7 / (0.01)	15.8 / (0.02)

N=111

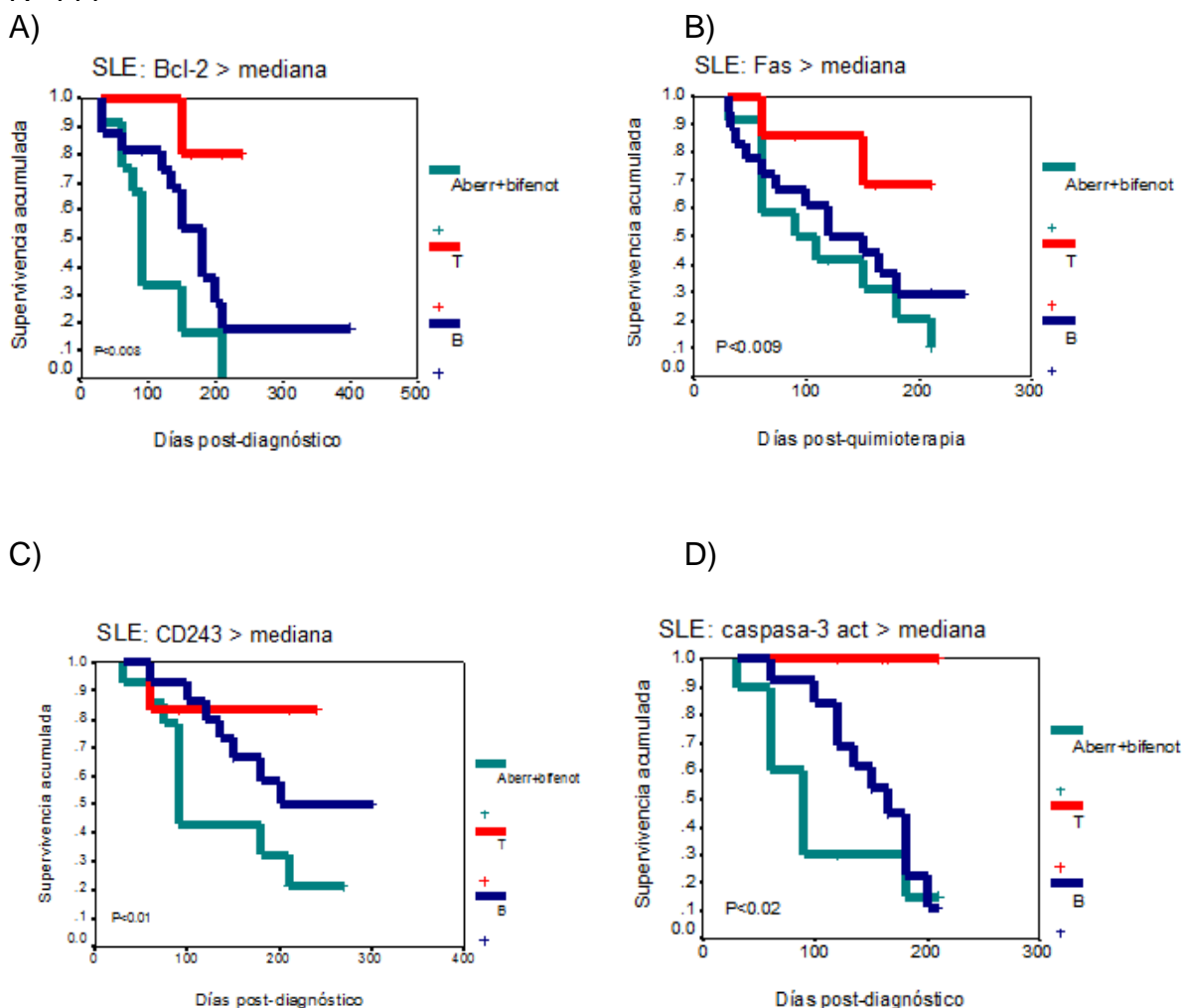


Figura 9. Comparación de las medianas de las curvas de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con LLA *de novo*, de acuerdo a la proteína y al grupo de pacientes estudiados.

Se determinaron los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2, Fas, CD243 y caspasa-3 activada en las células blásticas de pacientes con LLA *de novo* por citometría de flujo. Se obtuvieron las medianas de las proteínas y con aquellos valores que estuvieron por arriba de estas, se construyeron las curvas de Kaplan y Meier para determinar el pronóstico en el grupo de pacientes estudiados. Se presentan los resultados de: A) Bcl-2 (P<0.008), B) Fas (P<0.009), C) CD243 (P<0.01) y para D) caspasa-3 activada (p<0.02).

Se determinaron los niveles de concentración de las citocinas IFN γ y TNF α por citometría de flujo en el plasma de médula ósea de 67 pacientes (29 de LLA-B, 5 de LLA-B con marcador mielóide aberrante, 8 de LLA-T, 9 de LA bifenotípica, y 16 testigos). En relación con la determinación del IFN γ en el nicho medular, se observó que éste se encontró disminuido aunque no de manera significativa con respecto al grupo control (P=0.156) en todos los grupos de leucemia, siendo los más bajos para la LLA-T; de igual manera para las concentraciones del factor de necrosis tumoral (TNF α) (P=0.34) aunque la concentración más baja se observa en el grupo testigo; los resultados de estos análisis distribuidos por diagnóstico se presentan en la **Figura 10**.

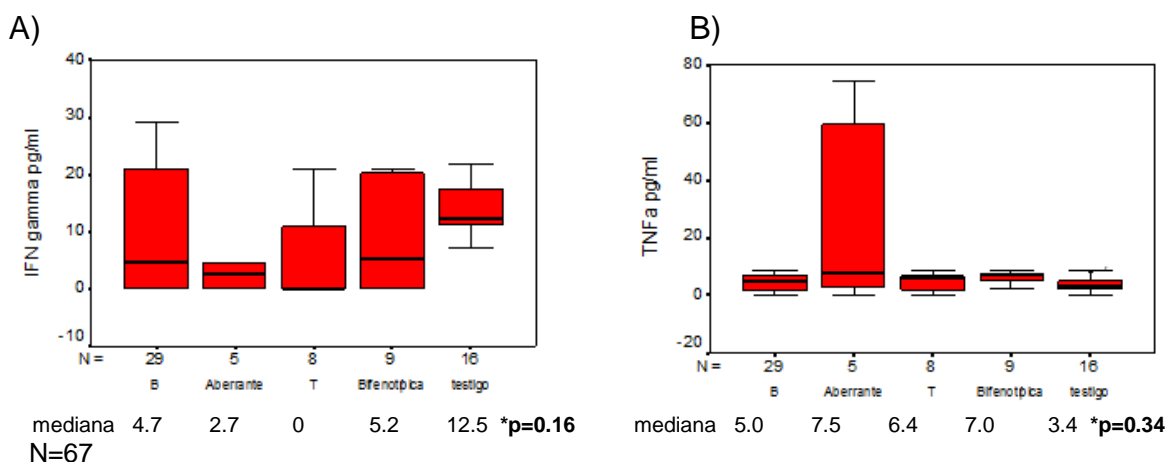


Figura 10. Comparación de las concentraciones de IFN γ y TNF α en plasma de médula ósea de pacientes con diagnóstico de LLA *de novo* contra el grupo testigo. En A) se muestra la comparación de los valores de las medianas, percentiles 25 y 75 % de IFN γ del grupo de pacientes con LLA *de novo*, los cuales están discretamente disminuidos respecto al control (P=0.156), siendo los más bajos para LLA-T. En B) la comparación de las medianas de los niveles de TNF α , ligeramente más altos que la población control (P=0.34).

Con respecto a las citocinas que intervienen en la respuesta Th2 en el nicho medular, se determinaron los niveles de las citocinas A) IL-4 y B) IL-6 por citometría de flujo en el plasma de médula ósea de 67 pacientes (29 de LLA-B, 5 de LLA-B con

marcador mioelide aberrante, 8 de LLA-T, 9 de LA bifenotípica, y 16 testigos), se observó que las concentraciones de IL-4 se encontraron disminuidas con respecto al grupo control ($P=0.05$); siendo las más bajas para LLA-T, mientras que para IL-6, ésta se encontró significativamente más elevada en los pacientes respecto al grupo control ($P=0.003$), obteniéndose más alta en el grupo de LLA-B con un marcador mioelide aberrante, los resultados se muestra en la **Figura 11**.

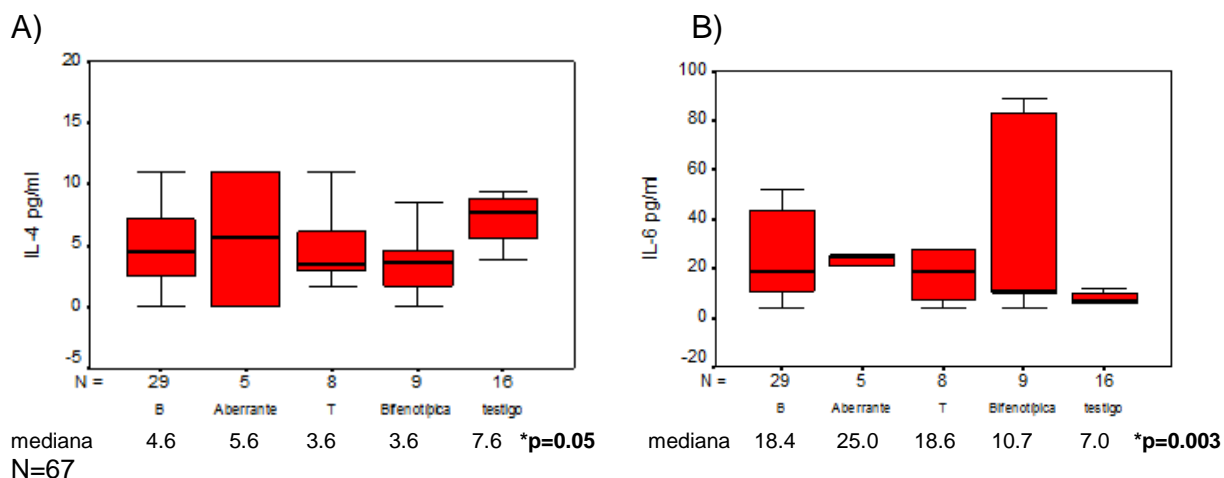


Figura 11. Comparación de las concentraciones de IL-4 e IL-6 en plasma de médula ósea de pacientes con diagnóstico de LLA de novo contra el grupo testigo. En A) se muestra la comparación de los valores de mediana de IL-4 de los pacientes en estudio contra el grupo testigo, en donde los valores del grupo de pacientes se observa disminuido de manera significativa, respecto al grupo control ($P=0.05$). En B) se muestra la comparación de las medianas de los niveles de IL-6 del grupo de pacientes en estudio contra el grupo testigo, en donde se observó que fueron significativamente más elevados en los grupos de estudio que en el testigo ($P=0.003$).

Las citocinas que intervienen en la angiogénesis, se determinaron en el nicho medular de 67 pacientes (29 de LLA-B, 5 de LLA-B con marcador mioelide aberrante, 8 de LLA-T, 9 de LA bifenotípica, y 16 testigos). La concentración del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) se encontró ligeramente aumentada aún sin ser significativa, con respecto al grupo control ($P=0.49$); por otro lado, la concentración del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), se encontró elevada en el grupo de LA-bifenotípica, con la mediana de cero en el resto de los grupos, incluyendo al grupo testigo ($P=0.004$). Los resultados distribuidos por grupo de leucemia se muestran en la **Figura 12**; al determinar la concentración de angiogenina, ésta se encontró por arriba de los valores de la mediana del grupo

testigo, sin ser significativa ($P=0.08$), siendo más elevada para el grupo de LLA-B con marcador mielode aberrante. En relación con la IL-8, la cual participa también en este proceso, se observó un incremento importante en los grupos de LLA con respecto al testigo ($P<0.001$), obteniendo el valor más elevado para el grupo de LLA-T. Los resultados se resumen en la **Figura 12**.

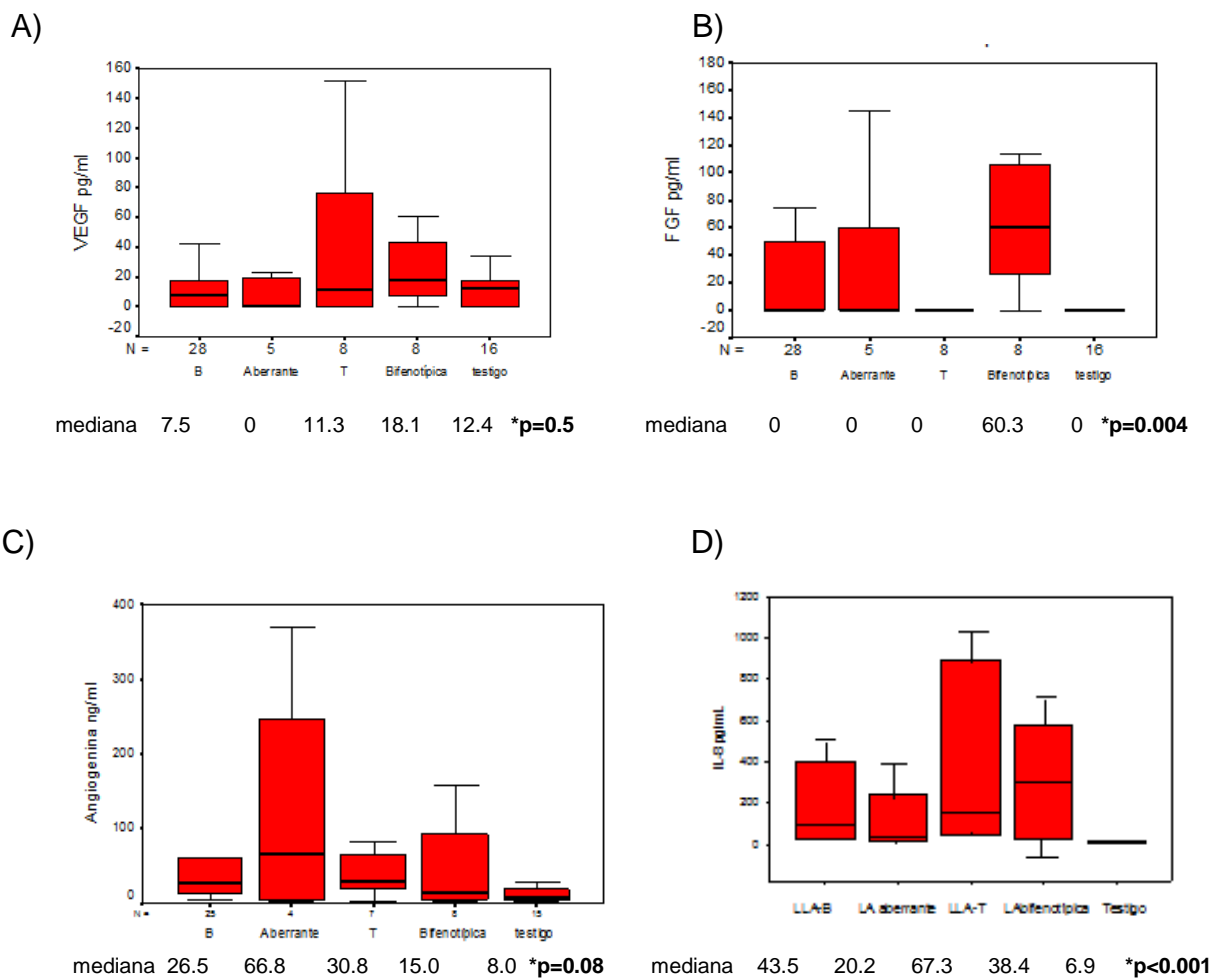


Figura 12. Comparaciones de los niveles de concentración de las citocinas VEGF, bFGF, angiogenina e IL-8. Se muestran las comparaciones de las medianas de A) VEGF, B) bFGF, C) angiogenina y D) IL-8 en el plasma de médula ósea del grupo de pacientes en estudio contra el grupo control. Se muestran los valores de mediana, los percentiles 25 y 75 % del grupo de pacientes con LLA *de novo* y del grupo testigo. En A) los niveles de expresión de VEGF no muestran diferencia significativa respecto al grupo testigo ($P=0.495$); en B) el valor de las medianas difiere significativamente respecto al grupo testigo para la expresión de bFGF únicamente en el grupo de LA-bifenotípica ($P=0.004$); con respecto a los niveles de angiogenina en C), se muestra que éstos, solo tienden a encontrarse elevados respecto al grupo testigo ($P=0.08$); y en D) las medianas de los niveles de expresión de IL-8, fueron más altas en los grupos de estudios respecto al testigo ($P<0.001$).

IV. DISCUSIÓN

El bloqueo del proceso de apoptosis en las células progenitoras normales o la desregulación de su ciclo celular, puede resultar en una proliferación incontrolada y contribuir al desarrollo de la leucemia. Las células tumorales poseen mecanismos de evasión de la apoptosis inhibiendo tanto la vía intrínseca como la extrínseca de este proceso (Hugh, y cols., 2003; Delia, y cols., 1992).

En este trabajo se estudió la presencia o ausencia de las proteínas involucradas en ambas vías de la apoptosis como: Fas, Bcl-2 y la presencia de la caspasa-3 activada en 111 pacientes adultos, mayores de 16 años, con leucemia linfoblástica aguda *de novo* (LLA); de los que al clasificarlos de acuerdo a los criterios del grupo Franco Americano Británico, 5 fueron del tipo LLA L1 y 106 del tipo LLA L2 y no se encontró predominio de la enfermedad por género. La mediana de edad para la población adulta en estudio, fue de 30.4 años con un intervalo de 16 a 73; la edad promedio de presentación de este padecimiento obtenida por Jaffe, y cols., (2001) en adultos fue de 20 años, observándose, al igual que en este trabajo, que dicha enfermedad afecta a población muy joven y en edad productiva.

La expresión de los diferentes antígenos de línea celular en los pacientes, ayudó a la clasificación de la enfermedad utilizando los antígenos HLADR, CD34, TdT, CD10, CD19, CD22. Los resultados alojaron 4 Grupos, a saber: LLA-B más un marcador aberrante, LA bifenotípica y LLA-B, todos ellos presentaron niveles de expresión más altos que el grupo testigo y el grupo LLA-T, lo cual está acorde con los estudios realizados por el grupo europeo para la inmunotipificación de las leucemias (EGIL) (Bene, y cols., 1995).

Con respecto al marcador mielóide aberrante que se presentó en las LLA-B, este fue el CD33; y en las LA bifenotípicas fueron CD13 y CD33, expresándose simultáneamente en las células leucémicas dos marcadores de diferente línea celular, lo que se conoce como doble positivo para la expresión de CD10/CD13 en estas últimas. En relación con la expresión de proteínas apoptóticas y

antiapoptóticas de los grupos de LLA-B, LLA-B con marcador mielóide aberrante, LA bifenotípica; respecto a los grupos testigo y de LLA-T, se encontró expresión aumentada para Bcl-2 ($p < 0.05$), al igual que en los estudios realizados por otros autores en células de linfoma folicular humano (Tsujiimoto, y cols., 1985); disminución de CD95, como se ha obtenido en el trabajo realizado por Gerzuk, y cols., (1998) en síndromes mielodisplásicos; y disminución en los niveles de caspasa-3 activada; como se ha observado en los estudios realizados por Svingen, y cols., (2000); en donde el nivel disminuido de procaspasa-3 se utilizó como marcador de mal pronóstico. Cuando se analizaron las curvas de supervivencia de Kaplan y Meier simultáneamente, por subgrupos de LLA, se encontró que presentó mejor pronóstico la LLA de estirpe T que el resto de los grupos ($p < 0.05$), asimismo, también se determinó el pronóstico del padecimiento respecto a la supervivencia libre de enfermedad tomando en consideración el nivel de expresión obtenido por arriba de la mediana de Bcl-2, Fas, CD243 y caspasa-3 activada, obteniendo nuevamente que el grupo con mejor pronóstico fue el de LLA-T ($p < 0.02$), no siendo así para los otros grupos (tabla 5 y figura 9).

Al respecto, existen estudios sobre Bcl-2 en población adulta para síndromes mielodisplásicos (Jane, y cols., 2000), LMA (Kornblau, y cols., 1999; Campos, y cols., 1993; Campos, y cols., 1994), y enfermedades neurodegenerativas (Friedlander, 2003) pero son escasos los estudios en pacientes adultos con LLA, aunque se han realizado algunos en población infantil (Coustan-Smith, y cols., 1996).

Nosotros encontramos niveles elevados de Bcl-2 que es el resultado de la traslocación t(14;18) en el gen de Bcl-2, la cual ocurre en el 80 a 90 % de los linfomas de células B (Reed, 2005), en nuestro caso se encontró más elevada en todas las LLA de estirpe B. Al estar elevada la proteína Bcl-2, esta impide que se libere el citocromo c y por consiguiente, no se activa la vía de las caspasas (Vía intrínseca); asimismo, se encontró una disminución significativa de Fas que activa a las procaspasas 8,10 y finalmente a la 3, lo que indica que tampoco se activa la vía extrínseca de muerte, además, también se obtuvo una disminución significativa de

caspara-3 activada, por lo que nuestros resultados indican que las células blásticas de las leucemias de estirpe B evaden tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis. Aunado a esto, además, dichas células sobreexpresan la proteína de multirresistencia a drogas (MDR o glicoproteína P); lo que finalmente se asoció con un mal pronóstico para el paciente debido a la pobre o escasa respuesta al tratamiento quimioterapéutico, todo ello al no poder inducirse la muerte en las células neoplásicas (figuras 7 y 9). En el grupo de LLA-T se presentaron niveles de expresión de las proteínas proapoptóticas CD95, caspara-3 activada, así como la antiapoptótica Bcl-2, en concentraciones muy semejantes a las del grupo testigo, lo que indica que la inducción de la apoptosis por estas vías no se encuentra alterada en dichas células, por lo cual los pacientes con esta variedad de leucemia linfocítica presentan mejor pronóstico que en aquellos con diagnóstico de LLA-B. El grupo de pacientes estudiados, presentaron una mediana de supervivencia global y libre de enfermedad de 281 y 180 días respectivamente, resultados que están acordes con los obtenidos por Faderl, y cols., (1999) y los de Prokop, y cols., (2000), en estudios realizados donde determinaron Bcl-2 y caspara-3 en población infantil; y asocian la recaída de los niños con LLA con una disminución de la relación Bax/Bcl-2 y a la pérdida espontánea de caspara-3 *in vivo*.

La glicoproteína P ha sido ampliamente estudiada, se localiza en la membrana plasmática, sus funciones son como bomba de flujo ATP dependiente. Existen trabajos realizados en pacientes con leucemia mieloide aguda (Holmes, y cols., 1994), en diferentes estadios de la enfermedad y distintos regímenes de quimioterapia, en donde solo el 45 % de los pacientes con expresión de glicoproteína llevaron a cabo la remisión completa, mientras que el 81 % de los casos con glicoproteína p negativo la obtuvieron. Estudios realizados por Nooter y cols., (1995), sobre la expresión del RNAm para glicoproteína P, encontraron que esta estaba significativamente elevada en el 84 % de los pacientes con leucemia linfocítica crónica y en el 30 % con leucemia mieloide aguda; en la mayoría de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, leucemia de células peludas y linfoma no Hodgkin se encontró que tenían niveles bajos de expresión de este RNAm, resultados que están acorde con los

obtenidos en este trabajo respecto a que también obtuvimos niveles bajos de expresión para esta proteína.

Al determinar las citocinas que participan en la respuesta Th1-Th2 en el plasma de la médula ósea, se encontró un aumento en la concentración de IL-6 y disminución de IL-4 e interferón gamma (IFN γ), comparados con el grupo control. En estudios realizados *in vitro*, el IFN γ ha demostrado un fuerte efecto inhibitorio sobre los progenitores hematopoyéticos más comprometidos a la diferenciación de las células tallo, a través de la activación de vías apoptóticas (Zeng, y cols., 2006); asimismo, en estudios realizados en pacientes con anemia aplásica, se ha encontrado que el IFN γ y el factor de necrosis tumoral (TNF), suministrados en dosis elevadas, reducen la cantidad de células progenitoras hematopoyéticas *in vitro*, debido a que estas citocinas inducen la apoptosis de las células CD34+ a través de la vía independiente de Fas (Maciejewski, y cols., 1995). Por otro lado, Zhang y cols., (2000) demuestran que los niños con LLA, presentaron niveles significativamente más bajos de células Th1 productoras de IFN γ y altos de células Th2 productoras de IL-4, sugiriéndose, que la expresión alterada de dichas citocinas, juega un papel importante en el desarrollo de la leucemia.

En el presente estudio se encontró un aumento significativo de IL-6, disminución discreta no significativa para IFN γ en el grupo de LLA, aunque la concentración más baja fue para el grupo de LLA-T, mientras que los niveles de IL-4 estuvieron significativamente más bajos que el grupo control. Los niveles bajos de IFN γ indican que no hay una cantidad suficiente de esta citocina para activar la vía independiente de Fas y llevar a la célula neoplásica a apoptosis. Esto se corrobora a través del incremento significativo de Bcl-2 y la disminución de la caspasa-3 activada. Asimismo, Lottem y Sachs, (1999) reportaron niveles significativamente disminuidos de IL-4; en pacientes con LLA, ya que la IL-4, es un inhibidor de la multiplicación celular, por tanto sugieren que dicha interleucina participa induciendo la apoptosis, por consiguiente, al encontrarse disminuida en el nicho medular, no hay suficiente cantidad para inducir la apoptosis de las células malignas y estas continúan

proliferando. Los niveles significativamente elevados de IL-6 reportados en este estudio pueden tener actividades hematopoyéticas, ya que esta estimula a las células progenitoras tempranas e induce al linfocito B para producir inmunoglobulinas (Hirano, y cols., 1986). También se ha descrito que en mieloma, es esencial para la proliferación y diferenciación de los plasmablastos ya que evita la apoptosis inducida por Fas al inhibir la vía de JNK/SAPK (Xu, y cols., 1998; Chauhan, y cols., 1997).

En cuanto a la determinación de los marcadores de angiogénesis, se encontró que las concentraciones de VEGF estuvieron ligeramente aumentadas sin ser significativas, las del bFGF se encontraron elevadas en el grupo de LA bifenotípica y no se detectó en el resto de los grupos. La concentración de angiogenina se obtuvo ligeramente elevada, siendo mayor en el grupo de LLA-B con un marcador mielode aberrante; mientras que la IL-8 se encontró significativamente incrementada en todos los grupos, con el valor más alto para la LLA-T.

La células hematopoyéticas y no hematopoyéticas secretan factores angiogénicos, además, se ha descrito que el VEGF está involucrado en la supervivencia o proliferación de la célula progenitora leucémica (Schuch y cols., 2002). La señalización a través del receptor 3 de VEGF la cual une a la isoforma VEGF-C, promueve la proliferación, supervivencia y resistencia a la quimioterapia en células de leucemia aguda (Diaz S. y cols., 2002).

El bFGF, es un factor angiogénico y mitogénico de múltiples tipos celulares con una función importante en la diferenciación celular. En médula ósea se secreta por las células del estroma y es un potente mitógeno para dichas células. El bFGF incrementa la actividad estimulante de colonias de IL-3 y el GM-CFS en las células CD34+ CD33-, *in vitro* (Gabbianelly, y cols., 1990); se ha informado que este factor sobrerregula el receptor 2 de VEGF en aves, el cual puede ser un mecanismo por el que las células mesodérmicas responden a VEGF e inicien la vasculogénesis (Bussolin, y cols., 1996).

En estudios realizados por Holash y Wiegand (1999), encontraron que las células tumorales producen angiogenina; en el presente trabajo, el incremento no fue significativo; sin embargo, ponen de manifiesto que dichas células están produciendo VEGF y angiogenina, ambos, factores muy importantes para que las células tumorales generen microvasculatura para proveerse de nutrientes. Holash y Maisonpierre (1999), encontraron que la expresión de angiogenina más la presencia de niveles elevados de VEGF en tejidos tumorales, facilitan el proceso de angiogénesis tumoral. En nuestro estudio también encontramos un aumento significativo en los niveles de bFGF solo en LA-bifenotípica y nulos en los otros grupos de LLA estudiados; resultados que concuerdan con lo obtenido por Faderl, y cols., (2005), en LLA del adulto de reciente diagnóstico, en donde los niveles elevados de VEGF y bFGF fueron predictivos de una supervivencia larga; aunque en nuestro caso no hemos correlacionado los niveles de estas citocinas de angiogénesis con la SLE y SG. En estudios realizados por Pérez-Atayde (1997), en 40 niños con LLA en donde se analizó el papel de los factores angiogénicos, se demostró un aumento significativo de la densidad de la microvasculatura en la médula ósea de los niños con LLA, en comparación con la médula ósea control, obteniendo niveles elevados de VEGF y bFGF en los pacientes en remisión. En el presente estudio se encontró elevado el VEGF solamente en la LA bifenotípica y no se detectó en el resto de los grupos de LLA. Yogendra (2004), propone que VEGF interactúa con los receptores presentes en la superficie de la célula tumoral y adicionalmente, permite la migración de la célula endotelial, su proliferación y por consiguiente, la permeabilidad vascular.

Otra citocina de la que no se ha establecido su papel en la angiogénesis normal, pero que es importante en la angiogénesis tumoral, es la IL-8 (Yuan y cols., 2000). La IL-8 es sintetizada por neutrófilos, monocitos, células cebadas y fibroblastos. La producción de IL-8 es inducida por estimulación con citocinas inflamatorias como TNF α , IL-1, IL-3, GM-CSF. La IL se almacena en los cuerpos de Weibel-palade de las células endoteliales de la microvasculatura (Utgaard, y cols., 1998), y regula la expresión de LFA-1 y media la liberación de metaloproteínas como elastasa,

gelatinasa B y β -glucuronidasa por los neutrofilos (Fibbe, y cols., 2000; Fibbe, y cols., 1999).

Estudios realizados por Luca, y cols. (1997), encontraron que los niveles elevados de IL-8 en el tejido tumoral, estimula la producción de metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), la cual degrada la membrana basal, remodela la matriz extracelular y facilita la angiogénesis tumoral. En este trabajo, la IL-8 se encontró significativamente aumentada en todos los grupos de pacientes con LLA. A este respecto, Faderl, y cols., 2005, encontraron que los niveles elevados de IL-8 se asociaron con una SG corta. En nuestro caso, no se ha realizado el análisis para correlacionar los niveles de IL-8 con la SLE y la SG; sin embargo, tomando en consideración que los niveles obtenidos de IL-8 fueron elevados, este resultado está acorde con el hecho de que la SG y la SLE en nuestros grupos de estudio estuvieron disminuidos.

Con base en los resultados obtenidos, queda claro que las células tumorales de la LLA-B y sus diferentes subgrupos, tienen alteradas las vías de apoptosis, lo cual les permite sobrevivir. Así mismo, los agentes inductores del proceso de muerte como el $IFN\gamma$ también están disminuidos y por consiguiente tampoco hay estímulo de muerte.

Por otro lado, tomando en consideración que la angiogénesis tumoral es el resultado del balance entre los estimuladores e inhibidores de este proceso, varios inhibidores endógenos de dicha angiogénesis ya han sido caracterizados, como el $IFN\gamma$ y la IL-4, que en nuestro estudio, ambos estuvieron disminuidos en los pacientes con LLA respecto al grupo control, lo implica que no realizan su función inhibidora y por consiguiente, se estimula la angiogénesis. Así mismo, los niveles elevados de IL-8 secretados por el tejido tumoral también van a activar la angiogénesis, y por lo tanto, su proliferación. Finalmente, las células neoplásicas de la LLA, particularmente las de los subgrupos de estirpe B, tienen un comportamiento biológico diferente, sin embargo, los pacientes con esta patología, presentan en común una pobre respuesta al tratamiento y una supervivencia corta.

V. CONCLUSIONES

1. Los niveles de expresión de Bcl-2, Fas y caspasa-3 activada en las células blásticas de los pacientes con LLA, indican que dichas células presentan inhibición de la apoptosis tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca.
2. Los niveles elevados de Bcl-2 y disminuidos de caspasa-3 activada y Fas, fueron factores pronósticos predictivos de una supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad corta.
3. Respecto a la respuesta Th1/Th2, los niveles disminuidos de IFN γ e IL-4 y altos de IL-6 en el nicho medular de pacientes con LLA, ratifican la inhibición de la apoptosis.
4. En relación con las citocinas de angiogénesis, se encontraron incrementadas VEGF, bFGF, angiogenina e IL-8, en los pacientes con LLA.

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.
2. Arase H, Arase N, Nakagawa K, Good RA, Onoé K. 1993. NK1.1⁺ CD4⁺8⁻ Thymocyte with specific lymphokine secretion. *Eur J Immunol.* 23: 307-310.
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275 (5302): 964–967.
4. Ashkenasi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* Jun; 2 (6): 420-430.
5. Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.*392: 245-251
6. Basilico C, Moscatelli D. 1992. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* 59: 115-165.
7. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European group for the immunological characterization of leukemias (EGIL). *Leukemia.* 9: 1783-1786.
8. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2 (10): 737–744.
9. Borst P, Evers R, Kool M, et al. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 92: 1295-1302.
10. Brizzi MF, Battaglia E, Montrucchio G, et al. 1999. Thrombopoietin stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis by a platelet-activating factor-dependent mechanism. *Circ Res.* 84: 785-796.
11. Bussolino F, Albini A, Camussi G, et el. 1996. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer.* 32A: 2401-2412.

12. Butturini A, Gale RP. 1992. Causes of leukemia. En: Keating A, Armitage J, Burnett A, Newland A (eds). Haematological Oncology. Vol 2. Cambridge: Cambridge University Press. 103-117.
13. Campos L, JP Rouault, O Sabido, P Oriol, N Roubi, C Vasselon, E Archimbaud, JP Magaud and D Guyotat. 1993. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. Blood. 81: 3091-3096.
14. Campos L, Odile Sabido, Jean-Pierre Rouault, and Denis Guvotat. 1994. Effects of *BCL-2* Antisense oligodeoxynucleotides on in vitro proliferation and survival of normal marrow progenitors and leukemic cells. Blood. 84: 595-600.
15. Chauhan D, Kharbanda S, Ogata A, et al. 1997. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. Blood. 89: 227.
16. Cohen L and Sachs L. 1981. Constitutive gene expression in myeloid leukemia and cell competence for induction of differentiation by the steroid dexamethasone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 353 – 357.
17. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D. 1999. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. Genes Dev. 13 (11): 1382–1397.
18. Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui CH, McNinch L, Evans WE, Raimondi SC, Behm FG, Arico M and Campana D. 1996. Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 87: 1140-1146.
19. Deans RJ, Moseley AB. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol. 28: 875-884.
20. Delia D, Aiello A, Soligo D, et al. 1992. Bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. Blood. 79:1291-1298.
21. Dias S, Choy M, Allitalo K, Kafii S. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell, proliferation, survival and resistance to chemotherapy. Blood. 99: 2179-2184.

22. Dvorak HF. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 20: 4368-4380.
23. Faderl S, Thall PF, Kantarjean HM, Talpaz M, Harris D, et al. 1999. Caspase-2 and caspase-3 as predictors of complete remission and survival in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Clinical cancer research.* 5: 4041-4047.
24. Faderl S, Do KA, Johnson MM, Keating M, O'Brien S, Jilani I, Ferrajolin A, Ravandi-Kashani F, Aguilar C, Dey A, Thomas DA, Giles FJ, Kantarjan HM and Albitar M. 2005. Angiogenic factors may have a different prognostic role in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 106: 4303-4307.
25. Fibbe WE, Pruijt JF, Velders GA, et al. 1999. Biology of IL-8 induced stem cell mobilization. *Ann N y Acad Sci.* 872: 71-82.
26. Fibbe WE, Prujit JF, van Kooy KY, et al: 2000. The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8 induced stem cell mobilization. *Semin Hematol.* 37: 19-24.
27. Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285: 1182-1186.
28. Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med.* 1: 27-31.
29. Friedlander RM. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 348: 1365-75.
30. Fuhrmann-Benzkein E, Ma MN, Rubbia-Brandt L, et al. 2000. Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients. *Int J Cancer.* 85: 40-45.
31. Gabbianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, et al. 1990. "Pure" hematopoietic progenitors: Permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science.* 249:1561.
32. Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, et al. 1998. A role for tumor necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 103; 176-188.
33. **Haase D, Feuring-Buske M, Konemann S, Fonatsch C, Troff C, et al. 1995. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the**

level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. Blood. 86: 2906-2912.

34. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA and Bloomfield CD. 2000. 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.* 1; 53-66.
35. Hart DN. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 90: 3245-3287.
36. Hatzi E, Murphy C, Zoepfel A, et al. 2002. N myc oncogene overexpression down-regulates IL-6: evidence that IL-6 inhibits angiogenesis and suppresses neuroblastoma tumor growth. *Oncogene.* 221: 3552-3561.
37. Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds). 2002. *Leukemia.* 7th edn. Philadelphia: Saunders. Chap 9. Malignant disease. pp: 501-508.
38. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407. 770-6.
39. Hengartner MO, Horvitz HR. 1994. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell.* 76: 665-76.
40. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. 1986. Complementary DNA for a novel interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 324: 73.
41. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. 1999. Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* 284:1994-1998.
42. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. 1999. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 18: 5356-5362.
43. Holmes JA, West RR. 1994. The effect of MDR-1 gene expression on outcome in acute myeloblastic leukemia. *Br J Cancer.* 69: 382-392.
44. Holt vd B, Löwenberg B, Burnett AK, Knauf WU, Shepherd J, Piccaluga PP, Ossenkoppele GJ, Verhoef GEG, Ferrant A, Crump M, Selleslag D, Theobald M, Fey MF, Vellenga E, Dugan M and Sonneveld P. 2005. 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*. 106: 2646-2654.
45. Horvitz HR. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 59: Suppl. 1701s-1706s.
 46. Hrusak O, Porwit-Mac Donald A. 2002. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*. 16: 1233-1258.
 47. Hugh J. M. Apoptosis and leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2003. 123: 577–585.
 48. Inoue K, Kohno T, Takakura S, Haya Shi, Mizoguchi H, Yokota J. 2000. Frequent microsatellite instability and Bax mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk Res*. 24: 255-262.
 49. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman J. 2001. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press.
 50. Jane E. Parker, Ghulam J. Mufti, Feyrooz Rasool, Aleksandar Mijovic, Stephen Devereux and Antonio Pagliuca. 2000. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*. 96: 3932-3938.
 51. Johnson N and Parkin JM. 1997. Camptothecin causes cell cycle perturbations within T-lymphoblastoid cells followed by dose dependent induction of apoptosis. *Leuk. Res*. 21:961-972.
 52. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, et al. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*. 21: 165-70.
 53. Kitada S, Pedersen IM, Schimmer A, Reed JC. 2002. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignances. *Oncogene*. 21: 3459-3474.
 54. Kitada S, Reed JC. 2004. MCL-1 promoters insertions dial-up aggressiveness of chronic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 96: 642-643.
 55. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. 1999. An inventory of the human BBAC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1461: 237-262.

56. Kornblau SM, Thall PF, Zeev Estrov, Walterscheid M, Patel S, Theriault A, Keating MJ, Hagop Kantarjian, Estey E, and Andreeff M. 1999. The Prognostic Impact of BCL2 Protein Expression in Acute Myelogenous Leukemia Varies with Cytogenetics¹. *Clinical Cancer Research*. Vol. 5, 1758–1766.
57. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, et al. 1999. 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*. 94: 1086-1099.
58. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. 1997. Cytochrome c and the dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91: 479-89.
59. Litmann T, Brangi M, Hudson E, et al. 2000. The multidrug resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci*. 113: 2011-2021.
60. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86: 147-57.
61. Lotem J and Sachs L. 1996. Differential suppression by protease inhibitors and cytokines of apoptosis induced by wild-type p53 and cytotoxic agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 12507-12512.
62. Lotem J, Kama R and Sachs L. 1999. Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 (21): 12016–12020.
63. Lotem J and Sachs L. 2002. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene*. 21: 3284-3294.
64. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Sing RK, Reich R, Bar-Eli M. 1997. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol*. 151: 1105-1113.
65. Luther-Wyrsh A, Nissen C, Wodnar-Filipowics A. 2001. Intracellular Fas ligand is elevated in T lymphocytes in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 114: 884-890.

66. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 7 (11): 1194–1201.
67. Maciejewski JP, Selleri C, Anderson S, Young NS. 1995. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood.* 85:3183-3190.
68. Mancini M, Scappaticci D, Cimino G, Nanni M, Demme V, Elia L, Tafuri A, Vignetti M, Vitale A, Cuneo A, Castoldi G, Saglio G, Pane F, Mecucci C, Camera A, Specchia G, Tedeschi A, Di Raimondo F, Fioritoni G, Fabbiano F, Marmont F, Ferrara F, Cascavilla N, Todeschini G, Nobile F, Kropp MG, Lioni P, Tabilio A, Luppi M, Annino L, Mandelli F and Foá R. 2005. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood.* 105: 3434-3441.
69. Mangi MH, Newland AC. 2000. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 111: 43-51.
70. Marie J, Huet S, Faussat A et al. 1997. Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. *Leukemia.* 11: 1086-1094.
71. Marie J, Zhou D, Gurbuxani S, et al. 1996. MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms. *Eur J Cancer.* 32A: 1034-1038.
72. Marie JP, Legrand O. 2003. Drug resistance in acute leukaemia and reversión. *Turk J Med Sci.* 33: 271-279.
73. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, et al. 1986. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 7297-7301.
74. Nistico A, Young NS. 1994. Gamma interferon gene expression in the bone marrow of patients with aplastic anemia. *Ann Intern Med.* 120: 463-469.
75. Nooter K, Burger H, Stoter G. 1995. Multidrug resistance-associated protein (MRP) in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* 20: 381-393.
76. Ortuño F, Orfao A. 2002. Aplicación de la citometría de flujo en el diagnóstico y seguimiento de las leucemias agudas. *Med Clin (Barc).* 118: 423-436.

77. Padro T, Ruiz S, Bieker R, et al. 2000. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 95: 2637-2644.
78. Pérez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow u, et al.1997. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*. 150: 815-821.
79. Persano L, Crescenzi M, Indraccolo S. 2007. Anti-angiogenic gene therapy of cancer: Current status and future prospects. *Mol. Asp. Med*. 28: 87-114.
80. Prokop A, Wieder T, Sturm I, Essmann F, Seeger K, Wuchter C, Ludwig WD, Henze G, Dorken B & Daniel PT. 2000. Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia*. 14. 1606–1613.
81. Reed JC and Pellecchia M. 2005. Apoptosis-based therapies for hemotologic malignancies. *Blood*. 106:408-418.
82. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Dirección General de Epidemiología. México. 2002.
83. Schneider E, Ploemacher RE, Navarro S, Van Beurden C and Dy M. 1991. Characterization of murine hematopoietic progenitor subsets involved in interleukin-3-induced interleukin-6 production. *Blood*. 78: 329-338.
84. Schuch G, Mchlut M, Bartsch G Jr, et al. 2002. *In vivo* administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1 predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia *in vivo*. *Blood*. 100: 4622-4628.
85. Scott KA, Holdsworth H, Balkwill FR, Dias S. 2000. Exploiting changes in the tumour microenvironment with sequential cytokine and matrix metalloprotease inhibitor treatment in a murine breast cancer model. *Br. J. Cancer* 83 (11): 1538–1543.
86. Sloand E, Kim S, Maciejewski JP, Tisdale J, Folimann D, Young NS. 2002. Intracellular interferon gamma in circulating and marrow T cells detected by flor cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood*.100: 1185-1191.

87. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N and Galipeau J. 2006. Interferon- γ -stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 107: 2570-2577.
88. Svingen PA, Karp JE, Krajewski S, Mesner PW, Gore SD, et al. 2000. Evaluation of Apaf-1 and procaspases-2, -3, -7, -8 and -9 as potential prognostic markers in acute leukemia. *Blood*. 96, 3922-3931.
89. Tarlakovic E, Tenstad E, Funderud S, Rian E. 2005. CD10⁺ stromal cells form B-lymphocyte maturation niches in the human bone marrow. *J Pathol*. 205: 311-317.
90. Thomas DA, Giles FJ, Cortés J. 2001. Antiangiogenesis therapy in leukemia. *Acta Haematol*. 106: 190-207.
91. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 1985. 228: 1440-1443.
92. Utgaard JB, Jahnsen FI, Bakka A, et al. 1998. Rapid secretion of prestored interleukin-8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med*. 188:1751-1756.
93. Woessner S, Sans Sabrafen J, Lafuente R, Florensa L. 1985. Asymptomatic bone marrow infiltration by blast cells. *N Engl J Med*. 312: 1129-1130.
94. Xu FH, Sharma S, Gardner A, et al. 1998. Interleukin-6 induced inhibition of multiple myeloma cell apoptosis: support for the hypothesis that protection is mediated via inhibition of the JNK/SAPK pathway. *Blood*. 92: 241.
95. Yogendra S. 2004. Tumor angiogenesis: Clinical implications. *Nepal J Neurosci*. 1:61-63.
96. Young NS, Calado RT and Scheinberg P. 2006. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*. 108: 2509-2519.
97. Yuan A, Yang PC, Yu CJ, et al. 2000. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 162: 1957-1963.
98. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. 1993. The *C elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 75: 641-52.

99. Zeng W, Miyasato A, Chen G, Kajigaya S, Young NS and Maciejewski JP. 2006. Interferon- γ -induced gene expression in CD34 cells: identification of pathologic cytokine-specific signature profiles. *Blood*. 107: 167-175.
100. Zhang XL, Komada Y, Chipeta J, et al. 2000. Intracellular cytokine profile of T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 49: 165-72.
101. Zhou H, Luo Y, Misutani N, Misutani N, Reisfeld RA and Xiang R. 2005. T cell-mediated suppression of angiogenesis results in tumor protective immunity. *Blood*. 106: 2026-2032.
102. Zimm S, Collins J, Riccarrdi R, et al. 1983. Variable bioavailability of oral mercaptopurine in maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med*. 308: 1005-9.