

# Identificación de los niveles de Caspasa-3 activa en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda resistentes a los agentes quimioterapéuticos.

Manuela Ramírez-Gómez<sup>1</sup>, María Camila Carmona-Martínez<sup>1</sup>,  
Miguel Ángel Mendivil-Pérez<sup>2</sup>

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar los niveles de caspasa-3 activa en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) con resistencia a la quimioterapia.

**Métodos:** Se obtuvieron 6 muestras de aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda que fueron resistentes al tratamiento convencional en un servicio de oncología pediátrica de la ciudad de Medellín. Para cada una de las muestras se aplicó las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo para detectar los niveles de Caspasa-3 activa.

**Resultados:** Se analizaron las muestras de 6 pacientes con LLA resistentes al tratamiento y 2 muestras de pacientes con otra patología que fueron tomados como controles. En la inmunofluorescencia indirecta se realizó una detección cualitativa, donde se observó una baja reactividad al marcador Caspasa-3 en los pacientes resistentes al tratamiento. En la citometría de flujo se realizó un análisis cuantitativo, la positividad para Caspasa-3 en pacientes resistentes al tratamiento fue de  $1.44\% \pm 1.44$  y en pacientes susceptibles al tratamiento fue de  $16.35\% \pm 1.57$ .

**Conclusión:** Se demostró que los pacientes con LLA resistentes al tratamiento tienen una expresión disminuida de los niveles de Caspasa-3 activa, resaltando que los niños menores de 5 años tenían valores cercanos a 0% de esta molécula. Este hallazgo permite el avance de esta molécula como un biomarcador importante para el estudio de la resistencia de las leucemias a los regímenes de quimioterapia convencional, por lo que es razonable sugerir su inclusión en la batería de pruebas de seguimiento de los pacientes posterior al tratamiento.

- 
1. Estudiantes de pregrado Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia Seccional Oriente, Medellín, Colombia.
  2. Microbiólogo y Bioanalista, MSc., PhD. Grupo de Neurociencias de Antioquia, área Temática Neurodegenerativas, Neuroquímica y Biología Molecular, Sede de investigación Universitaria, SIU Calle 62 N° 52-59, Universidad de Antioquia., Medellín, Colombia

Correspondencia: Manuela Ramírez-Gómez; [manuela.ramirez2@udea.edu.co](mailto:manuela.ramirez2@udea.edu.co)

Recibido:

Aceptado:

Cómo citar: Ramírez-Gómez M, Carmona-Martínez MC, Mendivil-Pérez MA. Identificación de los niveles de Caspasa-3 activa en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda resistentes a los agentes quimioterapéuticos. Medellín, Colombia. Iatreia. 2019.

## **PALABRAS CLAVE**

*Leucemia linfoblástica aguda; Apoptosis; Caspasa-3; Inmunofluorescencia indirecta; Citometría de flujo.*

## **SUMMARY**

### **Identification of Active Caspase-3 levels in pediatric patients with therapy-resistant acute lymphoblastic leukemia.**

**Objective:** Determine the levels of Active Caspase-3 in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia therapy resistant.

**Methods:** Seven bone marrow samples were obtained from pediatric patients with therapy-resistant acute lymphoblastic leukemia in a pediatric oncology service in the city of Medellín. For each samples it was applied indirect immunofluorescence and flow cytometry for detection of Active Caspase-3 levels.

**Results:** Seven bone marrow samples with therapy-resistant acute lymphoblastic leukemia and two control samples with another pathologies were analyzed. Using the indirect immunofluorescence, a qualitative detection was performed, where a low reactivity to the Caspase-3 marker was detected in patients resistant to the treatment. In the flow cytometry a quantitative analysis was performed, the positivity of Caspase-3 in patients resistant to the treatment was  $1.44\% \pm 1.44$  and in patients susceptible to the treatment was  $16.35\% \pm 1.57$ .

**Conclusions:** It was shown that patients with therapy-resistant acute lymphoblastic leukemia have a diminished expression of Active Caspase-3 levels, highlighting that

children under 5 years had values close to 0% of this molecule. This finding allows the advance of this molecule as a important biomarker for the study of therapy-resistant leukemias, so it is reasonable to suggest its inclusion in the patients's follow-up tests.

## **KEY WORDS**

*Acute lymphoblastic leukemia; Apoptosis; Caspase-3; Indirect Immunofluorescence; Flow cytometry.*

## **INTRODUCCIÓN**

La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad que afecta la médula ósea, generando la proliferación de blastos de origen linfoide que salen a sangre periférica sin una función definida, esta neoplasia es de mayor frecuencia en la población pediátrica, con mayor incidencia entre las edades de 2 a 5 años (1-2). El tratamiento utilizado para el manejo de esta enfermedad es la quimioterapia que se divide en tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento, cuya finalidad es bloquear la multiplicación y destruir las células malignas (3). Sin embargo, en el curso de este tratamiento se puede presentar falla terapéutica desencadenada por una resistencia a la acción de los medicamentos, generada, entre otros, por procesos de muerte acarreados por una resistencia al proceso de apoptosis. La Caspasa-3 es una enzima necesaria para llevarse a cabo el proceso de apoptosis que genera un balance entre la proliferación y pérdida celular, la acción de esta molécula culmina en la fragmentación del DNA y el desmantelamiento de la estructura celular. Este proceso se puede ver afectado por la hipermetilación de genes supresores de

tumores como p53 y APAF1, generando una resistencia a la apoptosis (4-6). En la actualidad no hay estudios específicos sobre los niveles de Caspasa-3 activa en pacientes con leucemia linfoblástica aguda que han sido resistentes a la quimioterapia convencional por lo que surge la necesidad de indagar su correlación, siendo este el objetivo de la investigación. Para cumplirlo se seleccionaron pacientes con resistencia a la quimioterapia, asistentes al servicio de oncología pediátrica del hospital San Vicente Fundación, a partir de los cuales se tomaron muestras de aspirado de médula ósea, en el que se determinaron los niveles de Caspasa-3 por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y citometría de flujo, los resultados obtenidos evidencian una disminución en la expresión de Caspasa-3 en los pacientes con LLA resistentes al tratamiento.

## **METODOLOGÍA**

Se realizó un estudio Observacional analítico de corte transversal. Se seleccionaron 6 pacientes con LLA resistentes a la quimioterapia convencional, que fueron diagnosticados, caracterizados y tratados por el servicio de oncología pediátrica del hospital San Vicente Fundación, Medellín (Antioquia), entre noviembre 2017 y julio 2018, a los cuales se les realizó un aspirado de médula ósea, estas muestras fueron almacenadas y refrigeradas en el grupo de neurociencias de Antioquia, área Temática Neurodegenerativas, Neuroquímica y Biología Molecular, para determinar los niveles de caspasa-3 mediante las técnicas: inmunofluorescencia indirecta, la cual fue previamente estandarizada con extendidos de células CD34 que se obtuvieron a partir

de donantes de aféresis y finalmente, por citometría de flujo.

### **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Para llevar a cabo esta técnica se realizaron los siguientes procedimientos: Fijación del extendido de médula ósea, permeabilización y bloqueo, adición de anticuerpo primario y por último adición del anticuerpo secundario

### **Fijación**

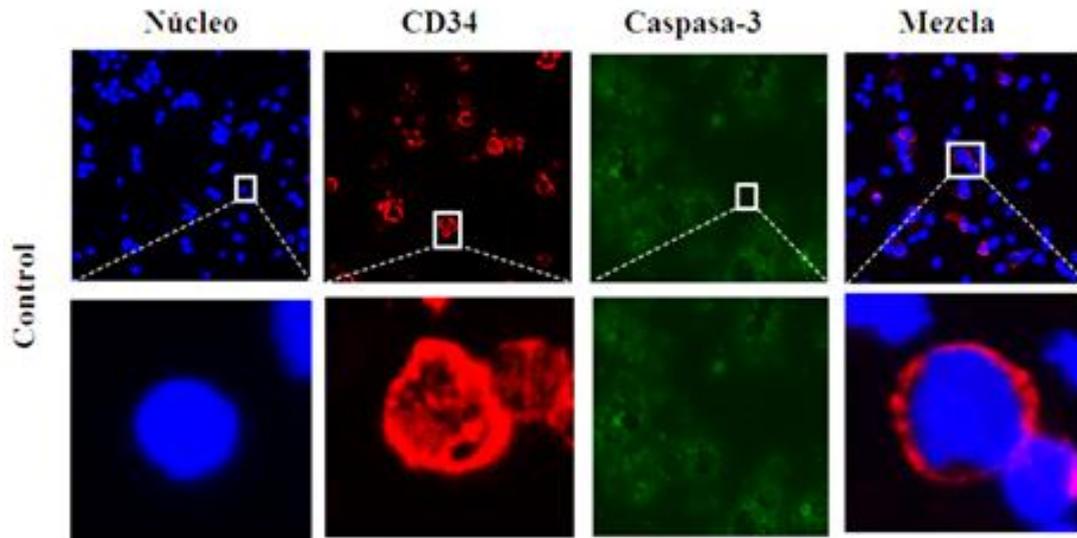
Se cubrieron las placas con metanol puro a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Pasado este tiempo se realizaron dos lavados con PBS cada lavado tuvo una duración de 5 minutos.

### **Permeabilización y bloqueo:**

Se adicionó en un tubo Falcon, Albúmina sérica bovina (concentración final 5%) y tritón x 100 (concentración final, 0.15%) por último se aforó con solución PBS. Para la permeabilización de la célula se utilizó el detergente tritón X 100 debido a que este no disuelve las proteínas celulares. Esa solución se adicionó a las placas por 30 minutos. Después, se lavaron rápidamente con PBS para eliminar exceso de albúmina y tritón. Luego se prepararon y adicionaron los anticuerpos primarios de la siguiente manera:

### **Adición de Anticuerpo primario**

Se utilizaron 4 tubos, en el tubo 1 se adicionó 1ml de la solución permeabilización y bloqueo preparada anteriormente, en el tubo 2 se adicionaron 300 $\mu\text{l}$  de dicha solución y se mezclaron con 700  $\mu\text{l}$  de PBS. En el tubo 3 se preparó una solución de anticuerpo con mayor concentración (5:200), para lo cual se tomaron 200 $\mu\text{l}$  de la solución preparada en el tubo 2 y se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de los



**Figura 1:** Determinación de CD34 (rojo), caspasa-3 (verde) y núcleo (azul) y la imagen combinada de las fotografías en extendidos provenientes de aféresis de células CD34+.

anticuerpos primarios contra Caspasa-3 activa (origen conejo) y CD34 (origen ratón), finalmente se preparó el tubo 4 con el anticuerpo con menor concentración, en el que se diluyeron 2µl de los anticuerpos mencionados, en 200 µl de la solución preparada en el tubo 2. Los anticuerpos preparados se adicionaron en cada extendido y se almacenaron en una cámara húmeda por 24 horas a 4°C.

#### **Adición de Anticuerpo secundario**

A las 24 horas se lavaron las placas 5 veces por 5 minutos con PBS, luego se adicionó los anticuerpos secundarios y se observó la reacción en el microscopio de inmunofluorescencia así: Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit (1:500 en PBS) y Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse (1:500 en PBS). Los núcleos de las células fueron marcados con el colorante de fluorescencia azul DAPI. Los anticuerpos secundarios y la tinción nuclear fueron incubados durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad, tiempo después del cual las placas fueron lavadas 5 veces durante 5

minutos con PBS, para posteriormente ser montadas con el medio de preservación de fluorescencia Fluorsave. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia Floyd Cell Imaging Station (Life Technologies).

#### **Citometría de flujo**

Para la citometría de flujo, una muestra de 100 µl de médula ósea fue incubada con solución de lisis de eritrocitos durante 30 minutos a 37° C. Posteriormente fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos y resuspendidas en PBS con anticuerpo primario anti-Caspasa-3 en la misma concentración utilizada para la inmunofluorescencia. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas con anticuerpo secundario Alexa Fluor 594. Las células posteriormente fueron lavadas y leídas en un citómetro de flujo Fortessa II (Beckton Dickinson). Como controles se utilizaron células fijadas, previamente caracterizadas como sensibles a la quimioterapia, almacenadas

en el biobanco del Grupo de Neurociencias de Antioquia.

## RESULTADOS

### Caracterización de pacientes

En la tabla 1 se pueden apreciar los datos de los 8 pacientes partícipes de la presente investigación, con un código asignado a cada uno, diagnóstico de la enfermedad, conteo de blastos en porcentaje, sexo biológico, edad y riesgo atribuido a la enfermedad. Dos de los ocho pacientes (códigos 1 y 2) fueron designados como controles, cuyas patologías diagnosticadas fue aplasia medular y mononucleosis infecciosa respectivamente, los 6 pacientes restantes fueron diagnosticados con LLA de diferente linaje: 2 pacientes diagnosticados con LLA cuyo linaje afectado fue el de células T con predominio en los pacientes de sexo masculino y en los 4 pacientes restantes, el linaje comprometido fue el de las células B cuyo sexo biológico predominante fue el femenino. Se puede observar que la neoplasia afectó a pacientes pediátricos cuyas edades oscilan entre los 1 y 13 años, confirmando lo mencionado en la literatura

con respecto a la afección de la LLA en la población pediátrica.

### Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta

Al realizar la estandarización de la prueba con las dos concentraciones de anticuerpos empleadas, se observó que no hubo diferencia significativa entre las dos concentraciones (datos no mostrados), por lo que se utilizó los anticuerpos de menor concentración para realizar la inmunofluorescencia indirecta (Figura 1). Se evidencia el núcleo celular, la glucoproteína transmembranal o clúster de diferenciación CD34 positivo y el marcador apoptótico caspasa-3, negativa. Estos resultados indican que los anticuerpos utilizados reconocen específicamente los antígenos (CD34+) y que no presentan fluorescencia inespecífica (caspasa-3 negativa). En la **tabla 2** se indican los porcentajes de células CD34+ contados a partir de la inmunofluorescencia. Estos datos fueron obtenidos a partir de la tinción realizada a dos extendidos controles, llevada a cabo por triplicado por tres observadores diferentes.

	Código	Diagnóstico	Blastos en sangre	Sexo	Edad (años)	Riesgo
<b>Controles</b>	1	Aplasia	N/A	M	6	N/A
	2	Mononucleosis infecciosa	N/A	F	5	N/A
<b>T-LLA</b>	A	T-LLA	96%	F	7	Alto
	B	T-LLA	67%	M	9	Intermedio
<b>B-LLA</b>	C	B-LLA	0,1%	F	5	Alto
	D	B-LLA	89%	F	1	Alto
	E	B-LLA	96%	F	9	Intermedio
	F	B-LLA	81%	F	13	Intermedio

N/A: No aplica; T-LLA: Leucemia linfoblástica aguda de células T; B-LLA: Leucemia linfoblástica aguda de células B.

**Tabla 1.** Datos de los pacientes suministrados por el Hospital San Vicente fundación

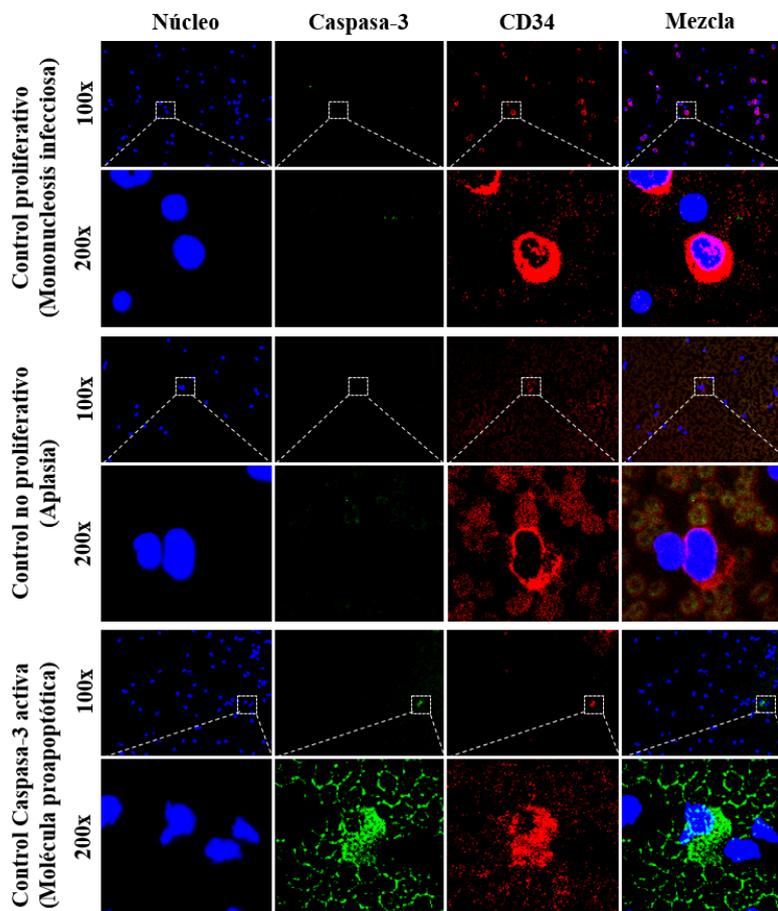
Código control	% de blastos
1	6 ± 3%
2	14 ± 4,16%

**Tabla 2.** Resultados del conteo de células CD34+ a partir de inmunofluorescencia de extendidos de aféresis de células CD34+.

### Inmunofluorescencia para CD34 y caspasa-3 en controles y pacientes

Con el fin de comprobar la estandarización de la inmunofluorescencia a continuación se realizó la determinación de CD34 y

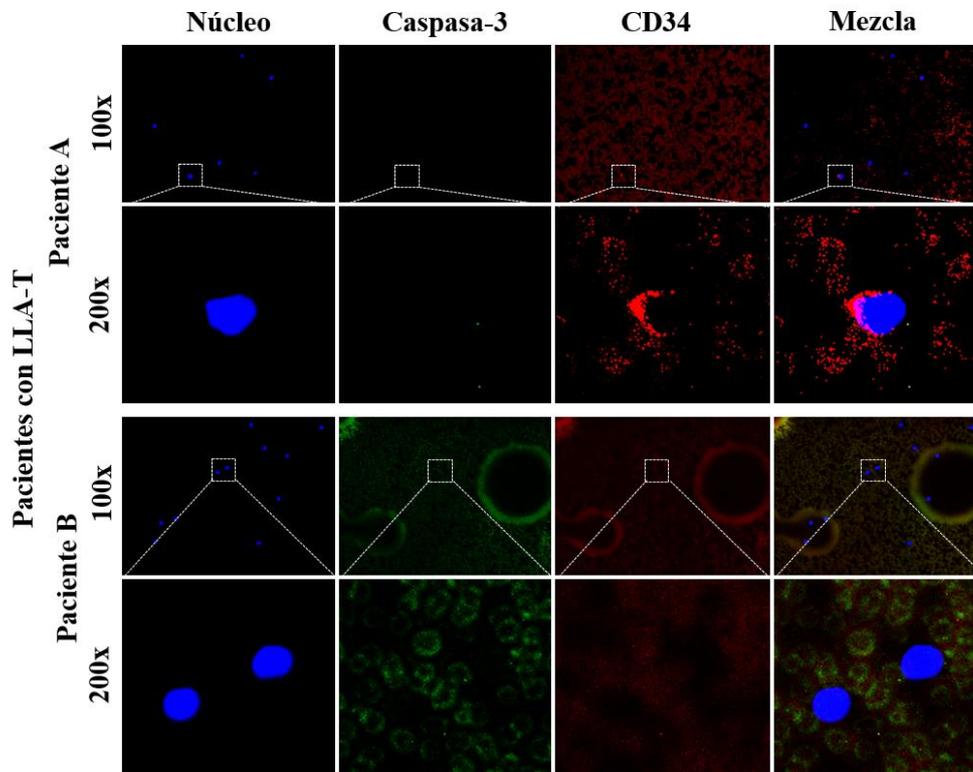
Caspasa-3 por microscopía de fluorescencia (**Figura 2**) en células con alto grado de proliferación (mononucleosis infecciosa), filas 1 y 2, baja tasa de proliferación (aplasia medular), filas 3 y 4, y en células expuestas a un fármaco inductor de apoptosis, filas 5 y 6. Mientras que las muestras 1 y 2 mostraron altos y bajos niveles de fluorescencia para CD34, respectivamente y ninguna fluorescencia para caspasa-3, La muestra expuesta al agente pro-apoptótico mostró positividad y co-localización para CD34 y caspasa-3.



**Figura 2:** Determinación de CD34 (rojo), Caspasa-3 (verde) y núcleo (azul) y la imagen combinada de las fotografías a partir de células con alta tasa de proliferación (filas 1 y 2), baja tasa de proliferación (filas 3 y 4) y expuestas a una molécula pro-apoptótica (filas 5 y 6).

A continuación, se realizó inmunofluorescencia de dos de los extendidos obtenidos de pacientes con diagnóstico de LLA-T, indicando una

reactividad baja para CD34, pero así mismo, una reactividad baja para el marcador caspasa-3 (**Figura 3**).



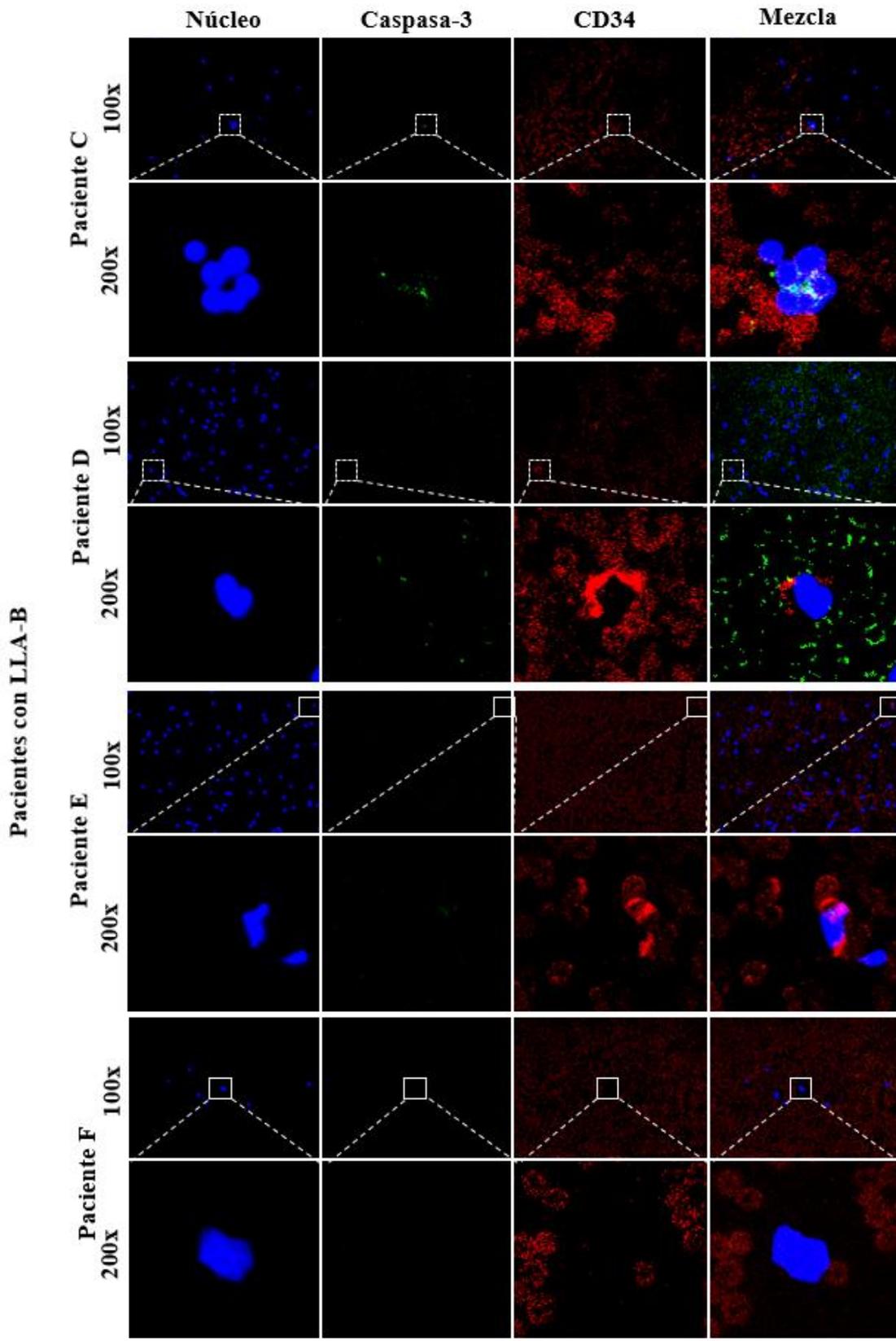
**Figura 3:** Determinación de CD34 (rojo), Caspasa-3 (verde) y núcleo (azul) y la imagen combinada de las fotografías a partir de células obtenidas de los pacientes A (filas 1 y 2) y B (filas 3 y 4), diagnosticados con LLA-T

Finalmente, se realizó inmunofluorescencia de los 4 extendidos obtenidos de pacientes con diagnóstico de LLA-B, mostrando reactividad para CD34, pero baja reactividad para el marcador caspasa-3 (**Figura 4**).

**Citometría de flujo para Caspasa-3, controles susceptibles y pacientes con resistencia a la quimioterapia**

Finalmente, se realizó la determinación por citometría de flujo del marcador caspasa-3 en controles susceptibles a la quimioterapia

(A'-D') y en células provenientes de pacientes con resistencia (A-F). Nótese que las células controles, fueron positivas a la fluorescencia del Alexa Fluor (AF) 594, queriendo decir que expresaron porcentajes de positividad de caspasa-3 entre el 14.4% y el 18.2%, mientras que en las células de pacientes con resistencia el porcentaje de positividad fue menor al 4.27%. Con respecto a la media de fluorescencia, los controles tuvieron un valor más alto que la media de los pacientes con unos valores promedio de 889.75 y 205.5



**Figura 4:** Determinación de CD34 (rojo), Caspasa-3 (verde) y núcleo (azul) y la imagen combinada de las fotografías a partir de células obtenidas de los pacientes C (filas 1 y 2), D (filas 3 y 4), E (filas 5 y 6) y F (filas 7 y 8) diagnosticados con LLA-B.

respectivamente. Los promedios de la mediana fueron para los controles y los pacientes 230.33 y 134.33 respectivamente, dos de los controles se encontraron por debajo de 257.5 y los otros dos por encima del punto medio contrario a lo que se

observa en los pacientes donde solo dos de estos estuvieron por debajo del punto medio (Tabla 3). Siendo estos valores estadísticamente significativos entre los pacientes y controles ( $P < 0,05$ ).

Control	Media	Mediana	AF594+	AF594-
A'	686	339	16,7%	83,3%
B'	1053	225	14,4%	85,6%
C'	696	210	16,1%	83,9%
D'	1124	256	18,2%	81,8%
<b>Promedio ± Desviación estándar</b>	<b>889,75 ± 231,35</b>	<b>257,5 ± 57,61</b>	<b>16,35% ± 1,57</b>	<b>83,65% ± 1,57</b>

Paciente	media	mediana	AF594+	AF594-
A	166	138	0,670%	99,3%
B	196	154	1,44%	98,6%
C	260	155	1,35%	98,7%
D	138	89	0,466%	99,5%
E	213	139	0,502%	99,5%
F	260	131	4,27%	95,7%
<b>Promedio ± Desviación estándar</b>	<b>205,5 ± 49,4*</b>	<b>134,33 ± 24,14*</b>	<b>1,44% ± 1,44*</b>	<b>98,55% ± 1,45*</b>

\*  $P < 0,05$

**Tabla 3:** Datos estadísticos del análisis de la fluorescencia para caspasa-3 mediante citometría de flujo en controles susceptibles y células de LLA resistentes a la quimioterapia.

## DISCUSIÓN

Nuestro estudio estuvo enfocado en determinar los niveles bajos de Caspasa-3 asociados a la proliferación de células malignas en pacientes con LLA. La importancia de este tipo de leucemia radica en que actualmente está relacionada con cerca del 75% de las leucemias en pacientes de edades pediátricas. Teniendo en cuenta que para ejecutarse el proceso de apoptosis es necesaria la activación de la Caspasa-3, buscamos la asociación de esta enzima con la resistencia al tratamiento quimioterapéutico convencional. La

importancia de la caspasa-3 radica en que su actividad catalítica está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular, participando en los procesos que desencadenan la degradación del DNA, el desmantelamiento de la estructura celular, la detención del ciclo celular y, por supuesto, la eliminación de células cancerígenas en el organismo (7-9). En este estudio, en primera instancia, estandarizamos las condiciones metodológicas de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta para la

detección de marcadores de inmadurez leucocitaria (CD34) y de la caspasa-3, en la que se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales anti- CD34 y -caspasa-3 activa y anticuerpos monoclonales secundarios acoplados a moléculas fluorescentes. De igual manera, empleamos la técnica citometría de flujo, previamente estandarizada en el laboratorio de Neurociencias, utilizando los anticuerpos contra caspasa-3, con el fin de validar la cuantificación de la expresión de dicha molécula. Estas técnicas modernas tienen una sensibilidad y especificidad mayor del 80%, más aún, en la actualidad la citometría de flujo es la prueba más utilizada para inmunotipificación de la LLA por el uso de biomarcadores específicos como CD10, CD19, CD22 (LLA-B) y CD3, CD7, CD5, CD2 (LLA-T) (10).

En el estudio realizado se mostró evidencia de que los pacientes con LLA, resistente al tratamiento, presentan una expresión disminuida de Caspasa-3, con reactividad de inmunofluorescencia y valores de intensidad media y mediana de fluorescencia y porcentajes de activación menores que los encontrados en muestras provenientes de pacientes con leucemias susceptibles al tratamiento. Dado que el mecanismo de acción de la terapia antineoplásica se basa, entre otros, en la inducción de apoptosis, y al tener esta molécula niveles bajos de activación en estos pacientes, es razonable considerar que los fármacos utilizados en la quimioterapia de rutina no están ejerciendo su función, por lo que no hay mejoría de los pacientes. En este contexto, otros estudios han sugerido que los valores disminuidos de Caspasa-3 contribuyen en la proliferación de células malignas en diferentes

neoplasias como cáncer de mama, cáncer de mucosa oral, entre otros (11-13).

Un factor importante en el pronóstico de la LLA es la edad del paciente, afectando principalmente niños menores de 15 años (10); en los datos de los pacientes suministrados por el hospital San Vicente Fundación se especifica el riesgo para cada uno de ellos, encontrándose todos en las categorías de riesgo intermedio y alto. Para esta clasificación se tuvo en cuenta la edad, recuento de blastos, fenotipo, caracterización citogenética/molecular y la invasión al sistema nervioso central (blastos en líquido cefalorraquídeo). Entre los resultados obtenidos mediante la citometría de flujo, es importante resaltar que los porcentajes de Caspasa-3 positiva (de acuerdo con la fluorescencia del anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 594) se encontraron más disminuidos en los pacientes menores de 5 años, con un promedio de 0.547%, en comparación con los pacientes mayores de 5 años, con un promedio de 2,35%. Presentando en ambos casos, valores disminuidos de Caspasa-3, hallazgos que generan un mal pronóstico a los pacientes por su resistencia al tratamiento convencional. Con respecto al género femenino y masculino se ha demostrado que la LLA afecta principalmente a los hombres (14), hecho que no se ve reflejado en el grupo de pacientes estudiados en este trabajo, lo que puede ser atribuido al tamaño de la muestra. Por lo que futuros estudios que incluyan un tamaño poblacional mayor, darían indicios del comportamiento epidemiológico de esta resistencia en la población infantil. A pesar del tiempo destinado a la búsqueda de los pacientes, una limitación del estudio fue el poco número de muestras con el que se

contó, esto debido a la baja incidencia tanto de esta neoplasia, como de la misma resistencia. Sumado a esto, el contar con un solo convenio institucional hospitalario, redujo considerablemente la posibilidad de obtener un mayor número de casos.

Con los resultados de este estudio, es factible sugerir que la determinación de la activación de la caspasa-3 pudiera constituir un biomarcador importante para el estudio de la resistencia de las leucemias a los regímenes de quimioterapia convencional, por lo que es razonable proponer su inclusión en la batería de pruebas de seguimiento de los pacientes posterior al tratamiento. De igual manera, se sugiere la inclusión del estudio de varias proteínas participantes en el proceso de apoptosis, y que nos ayuden a esclarecer mejor el papel de estas proteínas y las consecuencias derivadas con la presencia de bajos niveles en pacientes con LLA resistentes al tratamiento, todo esto con el fin de generar mejores aproximaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

## CONCLUSIONES

La LLA es una neoplasia de importancia que afecta principalmente a niños. La detección de niveles bajos de Caspasa-3 activa en estos pacientes puede servir en el futuro con el apoyo de más investigaciones como un biomarcador para evaluar la resistencia a la quimioterapia convencional de las leucemias e indicador de proliferación celular.

## ASPECTOS ÉTICOS

Se firmaron los consentimientos informados por parte de los padres de cada uno de los pacientes utilizados en el estudio.

## AGRADECIMIENTOS

Grupo de Neurociencias de Antioquia, área temática de enfermedades Neurodegenerativas, Neuroquímica y Biología molecular, liderado por los profesores Carlos Vélez Pardo y Marlene Jiménez Del Río. Y al Doctor Javier Fox del servicio de oncología pediátrica del Hospital Universitario San Vicente Fundación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pennella Carla L, Rossi Jorge G, Baialardo Edgardo M, Alonso Cristina N, Gutter Myriam R, Sánchez La Rosa Cristian G et al. Leucemia linfoblástica aguda en niños con síndrome de Down: análisis comparativo con pacientes sin síndrome de Down. Arch. argent. pediatr. [Internet]. 2018 ago. [citado 2019 Feb 24]; 116 (4): e500-e507.
2. Fuentes, Lissette et al. Características de la leucemia linfoblástica aguda y neutropenia febril en niños y adolescentes atendidos en un hospital de Guayaquil, Ecuador. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública [online]. 2018, v. 35, n. 2 [Accedido 12 abril 2019], pp. 272-278.
3. Castro-Arechaga, Stephanie et al. Sobrevida global y libre de enfermedad en una cohorte peruana de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública [online]. 2018, v. 35, n. 3 [Accedido 12 abril 2019], pp. 416-425.
4. Melo A, Artigas CG, Muñoz S, Brebi P, Hoffstetter R, Roa JC. Perfil de Metilación de Genes Supresores de Tumores APAF1, ASSP1, p73 y FHIT en Pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil. Int J Morphol 2013;31(3):973-979.
5. García Robles Reggie, Ayala Ramírez Paola, Acosta Vega Natalia. Alteración en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en cáncer gástrico. Rev. Cienc. Salud [Internet]. 2009 Apr [citado 2019 abril 12]; 7(1): 83-94.
6. Melo A, Artigas CG, Fritz C, Díaz P, Muñoz S, Brebi P, Roa JC. Hipermetilación del Gen Supresor de Tumores p53 en Pacientes Pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda. Int J Morphol. 2014;32(4):1243-1247.
7. Lavrik I, Golks A, Krammer P. Caspases: Pharmacological Manipulation Of Cell

Death. *J. Clin. Invest.* 2005; 105: 2665–2672

**8.** Almudena Porras e Isabel Marzo. La ciencia al alcance de la mano. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II. Universidad Complutense de Madrid / Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Mayo 2010.

**9.** Elinos C, Maldonado V, Meléndez J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. Recepción 15 de agosto del 2001; aceptación 26 de noviembre del 2001.

**10.** Agriello, Cazap E, Dourisboure N, Fernández R, Ferrari F, Fischman L, Funes L, Giménez M, González A, Lang J, Osorio C, Moirano M, Oliveira M, Rey N, Riccheri I, Zanella L. Leucemias Agudas. Sociedad Argentina de Hematología, Guías de Diagnóstico y Tratamiento, 2017.

**11.** Pu X, Storr SJ, Zhang Y, et al. Expresión de caspasa-3 y caspasa-8 en el cáncer de mama: la caspasa-3 se asocia con la supervivencia. *La apoptosis* .2016; 22 (3): 357-368.

**12.** Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., & Li, C. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International Journal Of Cancer*, 143(4), 921-930. doi: 10.1002/ijc.31374

**13.** García García V, González-Moles M, Bascones Martínez A. Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral: Resultados preliminares. *Avances en Odontoestomatología*. 2006;22(5)

**14.** Correa V J, Gómez R J, Posada S R. *Fundamentos de pediatría*. Medellín: CIB; 2012.