

Gaceta Médica de México

Volumen
Volume 138

Suplemento
Supplement 1

Marzo-Abril
March-April 2002

Artículo:

Aplicaciones de la tecnología moderna en el laboratorio de Hematología

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.medigraphic.com

Aplicaciones de la tecnología moderna en el laboratorio de Hematología

Introducción

Abel Lomelí-Guerrero*

No hace mucho, el médico clínico dudaba de un resultado de un laboratorio no esperado o en desacuerdo con su impresión clínica. Las técnicas eran manuales, laboriosas y sujetas a riesgo del error humano. Todo se resumía a cuantificar químicamente un compuesto, a un conteo de células y en todo caso a identificar sus características morfológicas. En la actualidad, la automatización y robotización han permitido optimizar tiempo y recursos, se ha ampliado enormemente la diversidad de estudios posibles, y los avances tecnológicos y en el conocimiento de los fenómenos biológicos y su aplicación combinada nos han llevado a un punto que hace unas décadas apenas se podía vislumbrar.

En los siguientes noventa minutos, cuatro expertos en la materia nos presentarán algunos aspectos de esta tecnología moderna y sobre todo de su aplicación y posibilidades actuales.

La citofluorometría multiparamétrica, usando un número y variedad cada vez mayores de anticuerpos monoclonales nos han permitido conocer mucho más precisamente la expresión fenotípica y el comportamiento biológico de las células. La aplicación de esta tecnología actualmente resulta de gran utilidad, no sólo en el diagnóstico de las leucemias y otras enfermedades malignas, sin en el estudio de la patobiología de las células malignas, permitiendo el diseño de esquemas de tratamiento mucho más específicos y efectivos; pero además resulta de gran utilidad en el estudio de diferen-

tes alteraciones moleculares y funcionales de glóbulos rojos y plaquetas. El doctor Alejandro Ruiz Argüelles y la EBC Lilna Romero se referirán a algunos de estos aspectos.

El Banco de sangre ha dejado de ser justamente eso, un simple sitio de acopio y distribución de sangre para convertirse en un servicio clínico, de interconsulta y de investigación en donde las técnicas de biología molecular se han posicionado de manera contundente en el estudio de las infecciones transmitidas por transfusión sanguínea. La clonación de las secuencias de los genes de los grupos sanguíneos está encontrando aplicación para el mejor conocimiento de la patobiología en las diversas situaciones en que éstos están involucrados. El MC Guillermo Escamilla se referirá a algunas de estas aplicaciones, la MC Aurora de la Peña nos mostrará: 1) como la Lipoproteína (A) (Lp(A)) es capaz de inhibir la actividad fibrinolítica del endotelio y favorecer de esta manera los procesos de aterotrombosis, 2) como las diferentes isoformas de apo (a), determinadas genéticamente tienen una mayor o menor afinidad por los sitios de unión de lisina de la fibrina, y determinan una mayor o menor inhibición competitiva de la activación del plasminógeno, y resaltan la importancia de la determinación de las características funcionales (fenotipo), más que cuantitativas de la Lp(a) como factor de riesgo para la enfermedad aterotrombótica.

Estoy seguro que el simposio resultará de gran interés y utilidad para todos nosotros.

* Secretaría de Salud Jalisco, Guadalajara, Jalisco. México.

I. La citología analítica moderna en el laboratorio de hematología

Alejandro Ruiz-Argüelles*

En la práctica tradicional de la hematología, las células integras, por sí mismas, han sido subestimadas como analitos capaces de brindar información clínica útil o importante. En el arsenal de pruebas que los laboratorios de hematología son capaces de realizar, contrasta la lista de analitos solubles susceptibles de ser cuantificados, con la lista de células cuya presencia o cantidad pueden aportar información. En estudios rutinarios de la sangre, médula ósea u otros fluidos corporales, se investiga el número total de eritrocitos, plaquetas y leucocitos. En muchos casos, la información incluye algunos datos sobre el volumen y forma de los primeros; y las proporciones relativas de subtipos de los últimos, hasta donde pueden distinguirse por sus características morfológicas y/o propiedades tintoriales. En pacientes con hemopatías malignas, el laboratorio se esmera además en clasificar a las células neoplásicas por algunos rasgos morfológicos distinguibles a la microscopía de luz.¹

Las células son unidades extraordinariamente complejas, capaces de exhibir cambios moleculares sutiles asociados con estados patológicos definidos. El análisis de moléculas en distintos compartimentos celulares ha permitido definir no solamente subgrupos celulares con funciones específicas distintas, o en diversos estadios de maduración, sino también la identificación de marcadores biológicos de utilidad diagnóstica y pronóstica con la capacidad de modificar sustancialmente las prácticas médicas encaminadas a preservar o restaurar la salud. El área de las hemopatías malignas es tal vez la más privilegiada por la introducción, relativamente reciente, de nuevas técnicas de citología analítica.

Esta revisión pretende describir un panorama de las nuevas técnicas para análisis celular y su impacto en la práctica de la hematología. No se revisarán las técnicas histoquímicas que han sido empleadas por muchas décadas para la detección de enzimas celulares y que, a la luz de los conocimientos actuales, tienen utilidad muy limitada.

Detección de antígenos

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales en la segunda mitad del siglo XX revolucionó la tecnología del

laboratorio clínico en general. En el caso específico de la citología analítica, el descubrimiento de múltiples antígenos celulares, aunado a la citometría de flujo, resultó en cambios dramáticos en el conocimiento de la fisiología de la hematopoyesis, y en consecuencia, en el mejor entendimiento, diagnóstico y tratamiento de las anomalías de este proceso.²

En las células hematopoyéticas se han logrado identificar más de 180 estructuras antigénicas, denominadas por consenso antígenos CD, que se asocian a diferentes funciones celulares pero que, además, han permitido conocer la ontogenia de las diversas estirpes celulares. Aunque no existen antígenos CD específicos de células neoplásicas, el estudio simultáneo de varios de estos antígenos en una misma célula, sí permite demostrar aberraciones, primordialmente de asincronismo de su expresión, que distinguen a las células hematopoyéticas normales de las neoplásicas. Este abordaje ha sido empleado para detectar y clasificar inmunológicamente distintas variedades de leucemias, linfomas y neoplasias de las células plasmáticas, lo que tiene claras implicaciones de pronóstico y, por ende, distintos requerimientos terapéuticos. La clasificación correcta de la estirpe celular involucrada en un proceso neoplásico no solo permite emplear tratamientos más enérgicos en pacientes con variedades de pronóstico agresivo, sino también obviarlos en aquellos casos con pronóstico favorable. La supervivencia y la calidad de vida mejoran en ambos grupos de pacientes, y la eficiencia de los tratamientos –entendida como una relación adecuada entre el costo y los beneficios– también se ve favorecida²⁻⁶. En la experiencia del departamento de inmunología de los Laboratorios Clínicos de Puebla, la morfología por sí sola fue congruente con el diagnóstico inmunofenotípico en el 73% de un total de 648 casos de leucemia aguda. Veintitrés pacientes en que el diagnóstico morfológico fue de leucemia aguda linfoblástica, pero el inmunofenotipo mostró su origen mieloide, hubiesen sido subtratados; en tanto que 18 pacientes en que ocurrió lo contrario, hubiesen sido tratados en forma más agresiva de lo requerido. En estos últimos habría que considerar, además de los riesgos propios de los esquemas de tratamiento de las leucemias

* Clínica Ruiz Puebla, Puebla, México.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Laboratorios Clínicos de Puebla, Díaz Ordaz 808, Puebla, PUE 72530 México. Teléfono: 222 243 8100. Facsímil: 222 243 8428

Correo-e: aruiz1@puebla.megared.net.mx

mieloides, el incremento notable de su costo y la necesidad de apoyo en otros servicios. De este análisis destaca también la frecuencia alarmante con que el inmunofenotipo detectó alguna forma de leucemia aguda en muestras de pacientes en quienes el estudio morfológico de la médula ósea no lo hizo. Los resultados se resumen en el cuadro I.

Dado que en estos resultados no se incluyó el análisis de un número grande de sujetos sanos o afectados por otras enfermedades, no es válido calcular valores de sensibilidad y de especificidad nosográficas para el estudio morfológico aislado; sin embargo, sí pueden estimarse los valores predictivos del método. Así, el valor predictivo de un resultado positivo del estudio morfológico (en pacientes seleccionados por otros datos clínicos como muy probablemente afectados por leucemia aguda) es de 99.7%, pero el valor predictivo de un resultado negativo (en la misma población de individuos) es solamente del 38%. Dicho de otro modo, si la morfología no detecta leucemia en pacientes sospechosos de tenerla, la predicción será incorrecta en 6 de cada 10 casos. Esta información sugiere que debe reconsiderarse el verdadero papel del inmun-

Cuadro I. Distribución de resultados positivos y negativos para leucemia aguda obtenidos por morfología y por citometría de flujo multiparamétrica.

	Inmunofenotipo positivo	Inmunofenotipo negativo
Morfología positiva	374	1
Morfología negativa	169	104

fenotipo en el estudio del paciente con leucemia aguda y, dejar de ser una herramienta de clasificación para convertirse en un criterio de diagnóstico.

Es también interesante mencionar la asociación que existe entre el número de células neoplásicas que pueden detectarse por métodos morfológicos y por técnicas inmunológicas: si bien cuando se analizan números grandes de casos, las cifras obtenidas por uno y otro método sí tienden a correlacionar en forma significativa, existen gran cantidad de casos en que la morfología sobrestima el número de blastos, en tanto que en otros, por cierto más abundantes, ocurre lo contrario. Estos últimos casos pueden ser peculiarmente deletéreos en la práctica clínica ya que, de acuerdo a criterios tradicionales, el hallazgo de un número de blastos menor al 3% en una muestra de médula ósea es considerado como excluyente del diagnóstico de leucemia aguda.

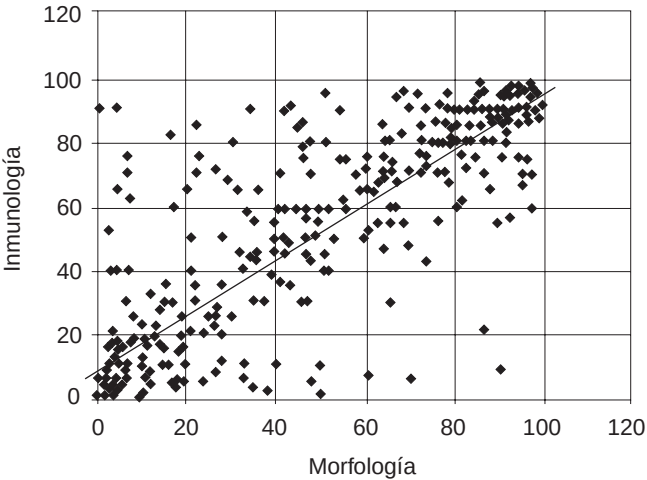


Figura 1. Correlación entre el porcentaje de blastos determinados por morfología (microscopía de luz) y el definido por métodos inmunológicos (citometría de flujo multiparamétrica) en 366 casos de leucemia aguda. A pesar de que existe correlación significativa ($r^2=0.6870$, $y = 0.8541(x) + 4.11$), abundan los casos en que la morfología sobre- o subestima el número real de células malignas

La demostración de fenotipos aberrantes se ha empleado asimismo para determinar la presencia de cantidades muy pequeñas de células neoplásicas en pacientes que han sido sometidos a tratamiento y se encuentran en remisión clínica. En ellos, las técnicas morfológicas son insensibles para detectar células neoplásicas cuando su proporción es menor al 1%, mientras que el empleo de anticuerpos fluorescentes y citometría de flujo es capaz de encontrar 1 célula maligna entre 10,000 a 50,000 células normales. La demostración inequívoca de estas células leucémicas residuales permite al hematólogo clínico decidir sobre la interrupción o la continuación del tratamiento, toda vez que la experiencia en diversos centros indica que, cuando un paciente tiene más de 1 célula maligna por cada 10,000 células normales, la recaída es altamente probable. El empleo conjunto de la citometría de flujo y las técnicas de hibridación *in situ* de ácidos nucleicos, puede ser un abordaje que mejore la sensibilidad de la detección de enfermedad residual mínima.

Otro ejemplo muy tangible de la utilidad de la detección de células infrecuentes a través de la demostración de sus antígenos es la enumeración de los precursores hematopoyéticos totipotenciales, a través de evidenciar en su superficie la presencia del atígeno CD34. En pacientes que han de someterse a trasplantes de células hematopoyéticas, bien sea obtenidas de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical, e independientemente de si se trata de un procedimiento autólogo o alogénico, es menester

conocer el número de células CD34+ presentes en el (los) injerto(s), para asegurar que su cantidad es adecuada para restaurar la hematopoyesis. A la fecha, solamente mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos y citometría de flujo, es posible cuantificar estas células, cuya frecuencia en la médula ósea normal es mejor al 2%.^{7,8}

Otra indicación adicional de la utilidad de la detección de antígenos en la membrana celular es el diagnóstico de la hemoglobulinuria paroxística nocturna, entidad en la que una anomalía del gen PIG-A condiciona el anclaje deficiente de proteínas no estructurales a glicosilfosfatidilinositol. Los antígenos CD55 y CD59, reguladores fisiológicos de la activación del complemento, se encuentran disminuidos o ausentes en ciertas poblaciones de las células sanguíneas, y así condicionan la mayor susceptibilidad a hemólisis intravascular, mediada por complemento, que caracteriza a este padecimiento. El empleo de anticuerpos monoclonales fluorescentes específicos y su detección por citometría de flujo permite la demostración de estas deficiencias, aún cuando las poblaciones celulares afectadas sean escasas. Por ello, es común que en pacientes con esta enfermedad, la citometría de flujo sea diagnóstica, aun cuando las pruebas tradicionales de hemólisis en medio ácido o en presencia de inulina, que requieren de abundancia de células deficientes, arrojen resultados negativos.^{9,10}

Detección de anomalías en el contenido celular de ácido desoxirribonucleico (ADN)

La cuantificación del ADN total del núcleo celular es factible a través de la utilización de algunos fluorocromos que se insertan de manera homogénea en la doble hélice del ADN. Su análisis por citometría de flujo permite conocer las proporciones de células que se encuentran en las fases de reposo (G0/G1), síntesis (s), post-síntesis y mitosis (G2/M) en el ciclo celular. Adicionalmente, es posible mediante este análisis sencillo, detectar la presencia de células aneuploides, es decir aquellas cuyo contenido total de ADN es diferente a lo normal. El empleo de reactivos cromogénicos en conjunto con microscopios con capacidad de análisis cuantitativo (*image analyzers*) permite además observar las características morfológicas de las células aneuploides.

Existen revisiones extensas sobre el tema,¹¹ por lo que basta mencionar aquí que en pacientes con leucemia, mieloma y linfoma, la demostración de células hipo o hiperploides modifica en forma importante el pronóstico y supervivencia de los enfermos, y puede ser utilizada como un criterio para decidir opciones terapéuticas en algunos pacientes.

Detección de traslocaciones por hibridación in situ

La clasificación completa de las hemopatías malignas, principalmente con fines de establecer el pronóstico de cada paciente, no puede realizarse únicamente por criterios morfológicos citoquímicos o inmunofenotípicos, sino que se hace necesario demostrar la presencia o ausencia de ciertas traslocaciones cromosómicas en las células neoplásicas.

El cuadro II resume las traslocaciones más frecuentes, cuya detección ha mostrado ser de utilidad clínica por modificar el pronóstico del padecimiento.

Un abordaje altamente sensible, pero técnicamente complicado, para detectar estas traslocaciones, es la amplificación de secuencias génicas mediante la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), particularmente útil en la detección de enfermedad residual mínima en pacientes que ya han sido sometidos a tratamiento.^{12,13} En el momento del diagnóstico, cuando hay abundancia de células malignas, las traslocaciones arriba descritas pueden demostrarse perfectamente mediante la hibridación *in situ* de sondas fluorescentes de ADN complementarias a cada uno de los genes que participan en el quimerismo. Así el empleo de dos fluorocromos distinguibles entre sí, para marcar cada uno de los segmentos genéticos involucrados, permite la observación directa de la fusión en las células neoplásicas. Esta metodología, denominada FISH por sus siglas en inglés (fluorescent in situ hybridization), es más sencilla desde el punto de vista técnico, y requiere de menor equipamiento especializado para su realización. Los resultados además pueden obtenerse en menor tiempo.¹⁴

Dada la menor sensibilidad del método de FISH en relación con aquella de RT-PCR, la manera más razonable para indicar uno u otro estudio en la práctica clínica sería emplear FISH para demostrar una determinada traslocación al momento del diagnóstico, y reservar la RT-PCR para la detección ulterior de enfermedad residual mínima, a través de poner en evidencia la misma traslocación.

Un abordaje que parece ser interesante para la detección de enfermedad residual mínima es la combinación secuencial de la selección celular electromagnética (*cell sorting*)¹⁵ y el análisis de las células purificadas –presuntamente neoplásicas– por el método de FISH. Una de las mayores limitaciones de la sensibilidad de la citometría de flujo para la detección de enfermedad residual es, precisamente, la incapacidad relativa de asegurar que las células identificadas como malignas por sus características inmunofenotípicas, cuando su frecuencia es menor de 1×10^{-4} , realmente lo sean. Sin embargo, cuando estos escasos eventos se aíslan físicamente, y puede demostrarse en ellos la misma traslocación que el método de FISH demostró al momento del diagnóstico, entonces es indudable que represen-

Cuadro II. Traslocaciones de utilidad clínica en la clasificación de padecimientos oncohematológicos

Traslocación	Quimerismo	Padecimiento asociado
t(8;14)(q24;q32)	LgH/MYC/CEP8	Leucemia linfoblástica B, Linf. No-Hodgkin, Burkitt
t(8;21)(q22;q22)	AML1/ETO	Leucemia mieloide M2
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL p190	Leucemia linfoblástica, cromosoma Philadelphia
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL p210	Leucemia granulocítica crónica
11q23	MLL	Leucemias agudas (10)
t(12;21)(p13;q22)	TEL/AML1	Leucemia linfoblástica B en niños
t(14;18)(q32;q21)	Bc12/IgH	Linfomas centro follicular y células pequeñas
t(15;17)(q22;q21)	PML/RAR a	Leucemia promielocítica
Inv (16)(p13;q22)	CBFB/MYH11	Leucemia mielomonocítica

tan residuos de la misma población maligna. En nuestro laboratorio hemos realizado algunos estudios preliminares usando este sistema, y comparado sus resultados con los de RT-PCR, y la sensibilidad de ambos métodos parece ser muy semejante.

Conclusión

El estudio de las células, como analitos por sí mismos se expande en forma importante y demuestra ser mucho más informativo de lo que se hubiese esperado. El laboratorio de hematología es posiblemente donde se encuentran el mayor número de aplicaciones de probada utilidad clínica. La información derivada del análisis de antígenos, del estudio de ploidía y de la demostración de traslocaciones, ha modificado la práctica clínica en esta especialidad. La citología analítica provee al hematólogo de bases sólidas que le permiten tomar las decisiones terapéuticas más acertadas y ofrecer a sus pacientes las mejores oportunidades de cantidad y calidad de vida.

Existen muchas otras áreas en constante expansión que abarcan la instrumentación –baste mencionar el ejemplo del *laser scanning cytometer*–, el desarrollo de programas analíticos, reactivos como anticuerpos, ligando solubles, sustratos enzimáticos, sondas de ADN, fluorocromos y otros trazadores pero principalmente están las aplicaciones de utilidad clínica.

Referencias

- Ruiz-Argüelles GJ. Leucemias agudas. En: GJ Ruiz-Argüelles. editor. Fundamentos de Hematología 1^a ed. México. Editorial Médica Panamericana. México 1994. p. 137-145.
- Pirruccello SJ, Aoun P. Hematopoietic cell differentiation: monoclonal antibodies and cluster designation (CD)-defined hematopoietic cell antigens. In: Keren DF, McCoy JP J, Carey JL, editores. Flow cytometry in clinical diagnosis. Chicago, IL, USA: ASCP Press; 2001. p. 65-97.
- Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Argüelles A, Basso G, Braylan R, Rothe G, Lacombe F, Lanza F, Papa S, Lucio P, San Miguel JF. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. Clin Chem 1999;45:1708-1717.
- Orfao A, Ruiz-Argüelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: its applications in hematology. Haematologica 1995;80:69-81.
- Ruiz-Argüelles A. Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. Clin Chim Acta 1992; 211: S13-S27, 1992.
- Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, López-Martínez B, López-Tapia JD, Lobato-Mendizábal E, Marín-López A. Immunologic classification of acute leukemia in México according to the first Latinamerican Consensus Conference for Immunophenotyping of Leukemia. Cancer Res Ther Control 1999;10:163-166.
- Ruiz-Argüelles A, Orfao A. Caracterización y evaluación de células toripotenciales en sangre periférica y médula ósea. En Ruiz-Argüelles GJ; San Miguel JF (Editores). Actualización en leucemia. Editorial Médica Panamericana. México. 1996. p. 79-82.
- Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Marín-López A, Delgado Lamas JL. Non-cryopreserved peripheral blood stem cells autotransplants for hematological malignancies can be performed entirely on an outpatient basis. Am J Hematol 1998; 58: 161-164.
- Piedras J, López-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. Cytometry 2000; 42: 234-238.
- Ruiz-Argüelles GJ, Ramírez-Cisneros FJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Morales-Aceves R. Deficiencia e proteínas de superficie ancladas por glucosil-fosfatidilinositol en células de pacientes mexicanos con hipoplasia medular. Rev. Invest Clin 1999;51:5-9.
- Check I. Clinical applications of DNA content analysis. In: Keren DF, McCoy JP J, Carey JL, editores. Flow cytometry in clinical diagnosis. Chicago IL, USA: ascp Press; ASCP Press. 2001. p. 641-662.
- Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Elisele J, Reyes-Núñez V, Pérez-Romano B, Ruiz-Argüelles A, Ramírez-Cisneros

- FJ, López-Martínez B, López-Tapia D, Rivadeneyra-Espinosa L.** Assessment of residual disease in acute leukemia by means of polymerase chain reaction. *Rev Invest Clin* 2000;52:118-124.
13. **Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Ruiz-Argüelles A.** Continued complete remission after a PML/RAR- α positive autograft in acute promyelocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1996;56:186-187.
 14. **Martín PL, Look AT, Schnell S, et al.** Comparison of fluorescence *in situ* hybridization, cytogenetic analysis, and DNA index analysis to detect chromosomes 4 and 10 aneuploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18:113-121.
 15. **Orfao A, Ruiz-Argüelles A.** General concepts about cell sorting techniques. *Clin Biochem* 1996;29:5-9.

II. Biología molecular en banco de sangre

Guillermo Escamilla-Guerrero*

La conjugación de diversos actores y acciones como son el aporte de la genética clásica identificar la segregación de los genes y la asociación con sus fenotipos correspondientes; la bioquímica tratando de relacionar las actividades de las proteínas con su estructura tridimensional y secuencia; los intentos de la biología para asignarle a éstas un espacio dentro de las funciones celulares, y el impresionante desarrollo tecnológico en las décadas de los 70 y 80 que permitió el análisis y manipulación de genes y proteínas, crearon una nueva disciplina conocida como biología molecular,¹ cuyo impacto en la medicina moderna y en especial en banco de sangre se ha puesto de manifiesto en los últimos años.

La medicina transfusional se ha convertido en un campo multidisciplinario al cual se van incorporando los más recientes desarrollos tecnológicos que desafían a las metodologías clásicas actualmente en uso. Un ejemplo de ello es la aplicación de los protocolos de laboratorio de Biología Molecular – de extracción, purificación, amplificación, detección e identificación de secuencias de ácidos nucleicos² – para prevenir la transmisión de agentes infecciosos vía transfusión, el diagnóstico de enfermedad, los genotipos, la generación de proteínas recombinantes y la producción de genes funcionales en la terapia génica.³

Dos factores importantes en prevenir la transmisión de agentes infecciosos secundarios a una transfusión son la selección cuidadosa del donante y las pruebas de tamizaje que se realizan; sin embargo, se asocia al menos cuatro factores a estos ensayos para mantener un riesgo mínimo de transmisión.⁴ (1) virus antigénicamente variantes que no comparten los epítopes que se detectan en la técnica, (2) período ventana (3) inmunosupresión y, (4) limitaciones propias de la técnica. Es factible disminuir significativamente este riesgo al

emplear técnicas que detectan el genoma del agente infeccioso. Diferentes métodos se encuentran disponibles para la prueba de ácidos nucleicos (NAT: nucleic acid amplification tests)⁵ (1) PCR (polymerase chain reaction); (2) RT/PCR (reverse transcriptase/polymerase chain reaction);⁶ (3) LCR (ligase chain reaction);⁷ (4) NASBA (nucleic acid sequence based amplification);⁸ (5) SDA (strand displacement amplification),⁹ (6) Q β replicase amplified assay, y; (7) bDNA (Chiron quantiplex assay and the ampliprobe system). El potencial que se les asocia a estas técnicas es: (a) alta sensibilidad pues detectan 10 –18g de ácido nucleico; (b) aplicables en pools de plasmas, (c) reducen el período ventana; (d) detección de infecciones “latentes”, (e) diferenciación de infección en recién nacidos; (f) diferenciación de cepas. Uno de los principales inconvenientes es el de su alta sensibilidad que puede generar falsos positivos.

La combinación de técnicas como son las de PCR alelo específico; RFLP (Fragmentos Polimórficos Generados con Enzimas de Restricción), hibridación, clonación entre otras, aplicadas en la mayoría de los genes que codifican las proteínas que portan los antígenos de grupos sanguíneos y/o las transferasas de los carbohidratos grupo específico, ha permitido establecer genotipos y dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la diversidad de grupos sanguíneos¹⁰ como son las mutaciones puntuales (sin sentido; silenciosas; codones de paro); sitios alternativos del procesamiento del mRNA; deleciones; inserciones, etc.^{11,12} Por ejemplo, en la predicción de la enfermedad hemolítica del recién nacido, tomando el binomio de madre portadora de un anticuerpo (anti D, anti K o anti-c) circulante y la determinación del genotipo del antígeno correspondiente en el DNA del feto, éste se puede obtener de tres fuentes diferentes: amniocentesis; 3% DNA fetal libre de células

* Banco de Sangre, Instituto Nacional de Pediatría fetca@prodigy.net.mx

circulante en el plasma materno¹³ y, obtención de RNA o DNA a partir de eritroblastos fetales circulantes en la madre.¹⁴ En el proceso de amplificación se incorporan los primeros de dos o más alelos en la mezcla de reacción, método conocido como multiplex.¹⁵ En trombocitopenias y neutropenias aloinmunes se han realizado intentos de aplicar la predicción de fenotipos expresados mediante la determinación de los genotipos basados en la técnica de PCR de antígenos en plaquetas y en granulocitos.¹⁶

La tecnología de proteínas recombinantes implica acción de dos elementos: las células huésped de diferentes fuentes (bacterias, levaduras, mamífero, etc), y el gen de la proteína deseada (a partir de su mRNA se prepara el complemento conocido como cDNA); éste es insertado en un vehículo llamado vector al cual se le integra un marcador de expresión e introducido en la célula huésped.¹⁷ Las modificaciones postraduccionales requeridas por la proteína recombinante pueden ser realizadas por la misma célula mediante una cotransfección insertando el cDNA de la enzima requerida. Ejemplo de ellas son: factores de coagulación VIII, IX, VII y VIIa; factores estimuladores de colonia granulocito (G-FEC), granulocito/monocito (GM-FEC), eritropoyetina; interferón alfa (INT- α); interleucina 2 (L-2); hemoglobina; albúmina; alfa galactosidasa (convierte eritrocitos de grupo B en O).¹⁸ Algunas proteínas que funcionan como antígenos en pruebas de tamizaje (HIV, HCV etc) son empleados en forma rutinaria en las pruebas de ELISA. Otro aspecto en la aplicación de la tecnología recombinante es la producción de antígenos eritrocitarios mediante transfección, reactivos aplicables en la detección de anticuerpos circulantes. No es de dudar que en un futuro próximo se produzca un panel de antígenos recombinantes, sin embargo las proteínas que son dependientes de la conformación aún son el reto. La producción de anticuerpos recombinantes es también un campo en el que se ha incursionado, la aplicación de técnicas como son el "phage-display", en la cual el cDNA complementario amplificado por PCR de los genes que codifican cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos se introduce en partículas de fagos (virus bacteriano con una molécula de DNA de doble cadena de 45 kb), seleccionando aquellos que expresen los fragmentos

Fab (fragmento de unión al antígeno) y Fv (fragmento variable), los que a su vez son transfectados y amplificados en *Escherichia coli* ofrece amplias perspectivas tanto en laboratorio como en terapia transfusional.¹⁹

Se define como terapia génica a la introducción de material genético nuevo en las células de un organismo con propósitos terapéuticos. Al final de la década de los 80 se hizo posible la transferencia de genes humanos en un paciente con una inmunodeficiencia severa combinada, generando grandes expectativas para otras patologías como la hemofilia²⁰ y en 1997 se aplica una alternativa más utilizando animales transgénicos productores de leche enriquecida como factor VIII funcional. Las posibilidades que en un futuro ofrecen estas metodologías en el banco de sangre se limitaran a la imaginación de los investigadores que incidan en este campo.

Referencias

1. **Judson HF.** El octavo día de la creación. México: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; 1987.
2. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory NY, USA; 1989.
3. **Anderson WF.** Human gene therapy. Science 1992;151:156.
4. **Holland PV.** Viral infections and the blood supply. N. Engl. J. Med. 1996; 334(26): 1734.
5. **Flanagan P, Barbara J.** PCR testing of plasma pools: from concept to reality. Trans Med Rev 1999;13:164-176.
6. **Castro FJ, Suleda S, Esteban JI, Viladomiu L, Martell M, Dragon E, Esteban R, Guardia J.** Evaluation of hepatitis C virus RNA RT/PCR qualitative and quantitative second generation assays. J Virol Met 2001;91:51-58.
7. **Zebala JA, Barany F.** Implications for the ligase chain reaction in gastroenterology J. Clin Gastroenterol 1993; 17 (2):171-174.
8. **Kievits T, van Gemen B, van Strijp D.** NASBA isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. J Virol Methods 1991;35:273-278.
9. **Walter GT, Little MC, Nadeau JG.** Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/dna polymerase system. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:392-395.
10. **Anstee DJ, Cartron JP.** Toward an understanding of the red cell surface. In: Garratty G, editors. Applications of molecular biology to blood transfusion medicine. 1st ed. USA: AABB; 1997. p. 17-40.
11. **Ríos M.** Advances in blood group genotyping. Gac Med Méx 2000;136(2):79-83.

III. Aterotrombosis e inhibición de la fibrinólisis por lipoproteína(a).

Aurora de la Peña-Díaz*

La enfermedad aterotrombótica cardiovascular o cerebrovascular, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países occidentales. En nuestro país, ocurrieron 65,603 defunciones por enfermedad arterial coronaria en 1996.¹

Numerosos factores tanto genéticos como ambientales dan origen a la aterosclerosis y entre ellos están: la lipoproteína de baja densidad (LDL), la hipertensión arterial, la diabetes y el tabaquismo. A estos factores debe sumarse la lipoproteína (a). La Lp(a) tiene una estructura muy parecida a la LDL, ambas poseen un núcleo de lípidos de composición similar rodeado por la apolipoproteína B-100, la Lp(a) tiene además otra apolipoproteína, apo(a) que le confiere características antigénicas y fisiopatológicas diferentes, favorece el desarrollo de la placa aterosclerosa y favorece el desarrollo y permanencia de un trombo, por lo que se considera el punto común entre la aterosclerosis y la trombosis.

La presencia de una LDL en la estructura de Lp(a) se asocia al desarrollo de la aterosclerosis y la similitud entre la estructura de la apolipoproteína (a) y el plasminógeno, precursor de la plasmina, se asocia a las propiedades trombogénicas de la Lp(a), Figura 1.

Bajo esta perspectiva, se realizaron numerosos estudios epidemiológicos que describen una asociación positiva entre la elevada concentración plasmática de Lp(a) y un incremento en las enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares, la reestenosis de puentes coronarios, la reoclusión de angioplastias y el desarrollo prematuro de aterosclerosis, en ocasiones

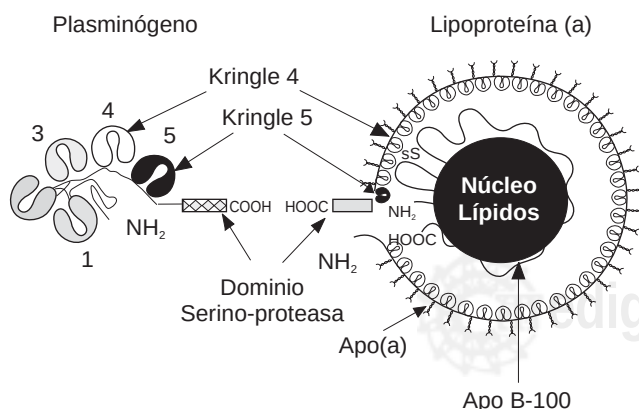
asociada a altas concentraciones de LDL y/o a bajas concentraciones de HDL. La mayoría de estudios prospectivos confirman estos resultados, aún cuando no existe un acuerdo en el límite de corte para considerar una concentración plasmática normal; ya que algunos autores consideran que es de 20 mg/dL y otros hasta 30 mg/dL, también el empleo de técnicas y anticuerpos diferentes en su detección, monoclonales o policlonales generan divergencias en los resultados.

Sin embargo, otros estudios no encuentran asociación entre la Lp(a) y la enfermedad arterial coronaria. Esta discrepancia en los resultados podría deberse entre otros motivos, a la gran heterogeneidad estructural de la molécula de apo(a) que se traduce en una heterogeneidad funcional como inhibidor competitivo del plasminógeno, disminuyendo la formación de plasmina.^{2,3}

Es también importante resaltar que existen diferencias en la concentración y en la presencia de distintas isoformas en poblaciones genéticamente diferentes, por lo que las diferencias se encuentran no sólo entre individuos sino entre poblaciones.

Este trabajo propone una nueva estrategia para explorar la capacidad trombogénica de la Lp(a) a través del estudio funcional de la unión de la apo(a) a la fibrina como indicador de la asociación de la Lp(a) al proceso aterotrombótico.

Con esta finalidad se estudiaron un grupo de enfermos con manifestaciones aterotrombóticas: enfermedad arterial coronaria (EAC) y enfermedad vascular cerebral (EVC). Los resultados se compararon con los de un grupo control y confirman que existe una asociación entre la unión de Lp(a) a la fibrina y la enfermedad aterotrombótica.



Referencias

1. Izaguirre R, De la Peña A, González H, Ramírez A, Quiroz A, Cortine E, Huerta M, Lupi E. Eficacia del clopidogrel como inhibidor de la agregación plaquetaria dependiente de ADP. Un estudio en individuos con enfermedad arterial coronaria. Arch Inst Cardiol Mex 2000;70:472-80.
2. De la Peña-Díaz A, Izaguirre-Ávila R, Anglés-Cano E. Lipoprotein Lp(a) and atherothrombotic disease. Arch Med Res 2000;31:353-59.
3. Anglés-Cano E, De la Peña Díaz A, Loyau S. Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein (a). Ann N Y Acad Sci 2001;936:261-75.

* Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez». México, D.F.

IV. Citometría de flujo: su aplicación en el diagnóstico y clasificación de leucemia aguda

Lina Teresa Romero-Guzmán*

La citometría de flujo (CF) es un método de análisis multiparamétrico de las propiedades fisicoquímicas de células aisladas en forma dinámica, objetiva y cuantitativa. Con el progreso en el desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AcMo) y la rápida evolución de la CF, esta metodología se ha convertido en una herramienta indispensable para el estudio del inmunofenotipo y es de gran utilidad en el diagnóstico y clasificación de la leucemia aguda (LA). Las LAs son un grupo de enfermedades malignas, heterogéneas con variantes clínicas, morfológicas, inmunológicas y moleculares. La clasificación de las LAs de acuerdo con el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) está basada en el examen de médula ósea sobre criterios morfológicos y citoquímicos.¹ Sin embargo, esos criterios fallan en la reproducibilidad de la identificación de los subtipos de LA, que son producto de una misma línea hematopoyética y, en ocasiones, también entre leucemias de diferentes líneas. Como antecedente en el estudio del inmunofenotipo, es importante recordar los patrones antigénicos de diferenciación hematopoyética normal, especialmente en la evaluación de médulas en las cuales las células leucémicas no han remplazado completamente la hematopoyesis normal. Reconociendo los patrones de maduración de los elementos normales, es posible reconocer la presencia de población leucémica. En médulas en las cuales el infiltrado leucémico es extenso, las células malignas son reconocidas y la inmunotipificación es fácil; sin embargo, la identificación de poblaciones pequeñas de células leucémicas requiere de la separación por medio de las propiedades de dispersión de la luz y análisis de fluorescencia. Una vez aislados los blastos se aplican estrategias de mapeo electrónico, seguidas de cuantificación precisa y caracterización inmunofenotípica de cada tipo celular.² El análisis por CF de la LA es interpretativo para definir un diagnóstico definitivo, combinando los patrones de distribución de la población y la intensidad de expresión del antígeno, las células maduras de médula ósea (MO) tienen una expresión elevada del CD45 (Antígeno común leucocitario). Cuando el CD45 es combinado con la dispersión de la luz lateral (side scatter, SS), la cual separa líneas celulares basadas en la complejidad citoplásmica, en la muestra de MO se pueden identificar sus diversos constituyentes por la diferente intensidad de expresión

sobre la superficie que se observa como acúmulos de eventos distintos.³ Las LA reflejan el patrón de adquisición de antígenos (Ag) que se observa en la diferenciación hematopoyética normal, e invariablemente muestran también distintos rasgos inmunofenotípicos aberrantes. El conocimiento detallado de esos patrones fenotípicos de diferenciación produce una clasificación más precisa. Utilizando un panel de AcMo ha sido posible: identificar la línea específica de origen de las células y su nivel de maduración, y reconocer los subtipos de LAL de línea celular T y de línea celular B.^{4,5} En el Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría (INP), en el periodo de 1987 a 1995, se estudiaron 402 pacientes con diagnóstico reciente de LA. En ellos se identificaron cinco subtipos inmunológicos fundamentales en los que se expresan una serie de marcadores de superficie característicos: LAL nula 5%, pre B-precoz 7.5%, común 74.6%, B 3.5% y T 9.4%. Se observó un predominio de los LAL de precursor de célula B CD10⁻ en niños menores de un año y precursor de célula B CD10⁺ a partir del año de edad. Con estos resultados se demostró que la incidencia de los distintos subtipos inmunológicos de la LAL y la distribución en cuanto a edad y sexo son muy similares a lo publicado en población caucásica en otras partes del mundo.⁶

El análisis inmunofenotípico ha demostrado tener gran importancia práctica, entre los factores más importantes destacan: que ha permitido una mejor definición y caracterización de las blastos, ha confirmado la naturaleza heterogénea de la enfermedad, se ha demostrado que los Ags de superficie son marcadores de las distintas etapas y estadios de diferenciación de la población celular leucémica y que ésta transformación y la expansión clonal pueden surgir en diferentes etapas de los linfocitos T o B. Referente a las características clínicas y hematológicas y los principales subtipos de LAL, se ha observado que existe una asociación estadísticamente significativa entre ellas, como por ejemplo, cifras altas de leucocitos asociadas con LAL-T y menor carga tumoral en LAL-B. Por otra parte, se ha podido establecer una mejor correlación entre la etiología de la leucemia y los factores epidemiológicos (genéticos o ambientales). Asimismo, con el estudio del inmunofenotipo se ha podido observar la asociación, estadísticamente significativa,

*Jefe del Laboratorio de Hemato-Oncología,

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Instituto Nacional de Pediatría. D.F. e-mail: ltrg1027@yahoo.com

Cuadro I. Anticuerpos monoclonales utilizados para asignación de la estirpe, estado de maduración y caracterización en LA

Estirpe	B	T	M
Asignación	cCD79a cCD22 CD19	cCD3 CD7	cMPO CD13 CD33
Estado de maduración	CD34 TdT	CD34 TdT	CD34 CD15 HLA-DR
Caracterización adicional	CD10 CD20 CD22 c μ k/L	CD1 CD2 CD3 CD5	CD14 CD41 Glf-A

tualmente y en base al Primer Consenso Latino-Americano para la clasificación inmunológica de la leucemia, se recomienda un panel de anticuerpos de primera línea para identificación de la estirpe ya que estos se expresan en el citoplasma antes de su inserción en la membrana celular y han demostrado ser altamente específicos y un segundo grupo de AcMo para establecer el grado de diferenciación.⁷ La expresión de los antígenos intracitoplásmicos CD79a, CD22, CD3 y MPO son los marcadores específicos de línea B, T o mieloides, que se pueden identificar en forma mas temprana.⁸ En el Servicio de Hematología del INP, en el periodo de 1997 a 1998, se estudiaron 100 pacientes consecutivos diagnosticados con LA. Se realizó la clasificación inmunológica usando tres grupos de AcMo. Se identificaron 74 casos de LAL-B, siete casos de LAL-T y 19 casos de LAM, en este estudio los marcadores citoplásmicos CD79a, CD22,

Cuadro II. Distribución de casos LAL de estirpe B, T y LAM de acuerdo al Inmunofenotipo Instituto Nacional de Pediatría 1997 - 1998

Estirpe B	No. Casos	CD34	TdT	HLA-DR	cCD79a	cCD22	CD19	CD10	CD20	CD22
BCP-CD10-	6	3	6	6	6	6	6	0	0	0
BCP-CD10+	63	36	61	58	63	61	61	63	22	50
Pre-B	5	1	5	5	5	5	5	5	3	4
Estirpe T		CD34	TdT	HLA-DR	cCD3	CD2	CD5	CD7	CD1	CD3
Reciente	3	1	3	2	3	2	3	3	0	0
Comun	3	1	3	0	3	3	3	3	3	0
Madura	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
LAM		CD34	TdT	HLA-DR	cMPO	MPO	CD13	CD14	CD33	CD41
M1	2	1	0	2	2	2	1	0	1	0
M2	3	2	0	3	3	3	2	0	2	0
M3	5	1	0	1	5	5	4	2	4	0
M4/Eo	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
M5	4	1	0	3	4	2	1	3	1	0
M7	4	3	0	3	4	0	1	0	1	4

entre los distintos subtipos inmunológicos y el pronóstico, además ha proporcionado un marco de referencia racional para el diseño de estrategias terapéuticas estirpe-específicas. A medida que se ha incrementado el número de los AcM para la inmunotipificación, ha sido posible detectar pequeñas desviaciones de los esquemas de diferenciación normal de los linfocitos B o T y demostrar diversidad inmunológica en LAL, a la vez que se ha identificado la expresión antigénica asincrónica o aberrante y la expresión inesperada o inapropiada. Ac-

CD3 y MPO fueron marcadores B, T y mieloides altamente sensibles y específicos. Esta clase de procedimientos ha permitido una mayor precisión diagnóstica y refinamiento de la clasificación inmunológica.⁹ En conclusión, esta metodología puede ser útil para diseñar protocolos para la clasificación inmunológica de manera algorítmica, empezando el escrutinio con dos paneles de AcMo, para asignación de la estirpe e identificación del estado de maduración y un tercero para caracterización adicional (Cuadros I y II).

Importancia del índice de DNA en LAL

El DNA de las células puede ser teñido con fluorocromos tales como el Ioduro de Propidio, el cual se intercala entre las bases de las cadenas del DNA en forma estequiométrica. Es posible cuantificarlo en las diversas fases del ciclo celular por medio de la CF debido a que la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA.¹⁰ En 1985, Look y colaboradores demostraron en pacientes con LAL con Índice de DNA (IDNA) > 1.16, éste se relacionaba en forma importante con un pronóstico mejor.¹¹ Así también en la Reunión de Consenso de Citometría para el Análisis de DNA (EEUU, 1992) se estableció la utilidad del IDNA como indicador individual de valor pronóstico.^{12,13} El IDNA es un parámetro que define la diferencia del contenido de DNA entre la población normal y una anormal (Fase G0/G1 de la muestra / Fase G0/G1 del control normal = 1). En el INP se definieron los valores de referencia (IDNA = 0.925 – 1.077) y en base a ellos fue posible detectar desviaciones cuantitativas en el contenido de DNA en diversas patologías. Se estudiaron 60 pacientes con diagnóstico reciente de LA de los cuales fueron 29 diploides (48.33%) y 31 aneuploides (51.7%). De estos últimos se observaron 8 hipodiploides (13.3%), 13 hiperdiploides (1.077-1.16) (21.7%) 10 hiperdiploides (>1.16) (15.7%). Se demostró asociación entre IDNA < 0.925 y carga tumoral alta (Leucocitos > 20,000 mm³) y mayor frecuencia en el grupo de edad 5.1 – 12 años. También en IDNA > 1.077 y carga tumoral baja (Leucocitos < 20,000 mm³). El IDNA conjuntamente con la cuenta de leucocitos son parámetros que ayudan a la identificación de un grupo de niños con LAL que tienen baja probabilidad de recaída cuando son tratados con terapia convencional.

Referencias

1. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnic HR et al.** Proposals for the classification of the acute leukaemias (FAB Cooperative Group). *Br J Haematol* 1976; 33:451-458.
2. **Weir EG, and Borowitz MJ.** Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin Hematol* 2001;38:124-138.
3. **Jennings D, Foon KA.** Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997;90:2863-2892.
4. **Foon KA, Tood RF.** Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986;68:1-31.
5. **Garand R, Vannier JP, Bene MC, Faure GC, Bernard A.** Correlations between acute lymphoid leukemia (ALL) immunophenotype and clinical and laboratory data at presentation. *Cancer* 1989;64:1437-1446.
6. **Paredes-Aguilera R, Romero-Guzmán L, López Santiago N, et al.** Inmunofenotipo de la leucemia linfoblástica en niños mexicanos. *Sangre* 1999;44:188-194.
7. **Ruiz-Argüelles A, Duque RE, Orfao A.** Report on the first Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Leukemia. *Cytometry (Commun Clinical Cytometry)* 1998;34:39-42.
8. **Knapp W, Strobl H, Majdic O.** Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry (Communications in clinical cytometry)* 1994;18:187-198.
9. **Paredes-Aguilera R, Romero-Guzmán L, López-Santiago N.** Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia. *Am J Hematol* 2001;68:69-74.
10. **Vindelov L, Christensen J, Jensen G, Nissen N.** Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization. 1983;3:332-389.
11. **Look TA, Robertson P, Williams D. et al.** Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985;65:1079-1086.
12. **Hedley D, Shankey TV, Wheelless L.** DNA Cytometry Consensus Conference. 1993; 14: 471-477.
13. **Duque RE, Andreef M, Braylan RC, Diamond LW, Peiper SC.** Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in neoplastic hematopathology. *Cytometry* 1993;14:492-496.