

Gaceta Médica de México

Volumen
Volume 138

Suplemento
Supplement 1

Marzo-Abril
March-April 2002

Artículo:

Temas selectos del 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*



Medigraphic.com

Temas selectos del laboratorio de hematología

Introducción

Lina Teresa Romero-Guzmán*

La Hematología prospera como especialidad médica cuando hay una estrecha relación de trabajo cooperativo entre el médico y el servicio del laboratorio que procesa y analiza las muestras de los pacientes que son importantes para el diagnóstico y tratamiento. En el pasado, el hematólogo tomaba y examinaba muestras de sangre periférica y médula ósea personalmente; sin embargo, con el avance que ha tenido la tecnología en el desarrollo de la instrumentación y siendo que los estudios se vuelven más sofisticados, se ha dado paso a que el personal de laboratorio se involucre cada vez más representando una parte importante de esta área.

Es necesario crear un puente entre el médico y el personal de laboratorio y esto se logra mediante la comunicación y la educación, por tanto, se ha diseñado un programa dirigido a médicos, químicos, técnicos de laboratorio e investigadores cuyo objetivo es proporcionar una descripción acerca de métodos de vanguardia para el estudio de enfermedades hematológicas haciendo énfasis en la presentación de opiniones de los autores en base a sus experiencias personales acerca de los temas seleccionados, enfocados principalmente a los procedimientos de control de calidad, métodos de implementación reciente para el estudio del metabolismo del hierro, biología molecular, citometría de flujo y la combinación de ambas metodologías.

Control de calidad

Las pruebas de laboratorio generalmente son uno de los indicadores más sensibles del estado de salud o enfermedad de un individuo. Se toman decisiones importantes acerca del manejo del paciente en base a pequeñas variaciones de esos datos. Los laboratorios deben tener muchos cuidados ya que muchos factores independientes a la enfermedad pueden afectar los valores de estas pruebas. El objetivo de analizar las muestras tomadas de los pacientes es obtener un resultado que describe la condición del paciente representada por la concentración del analito en sangre u otros fluidos, este resultado

ayuda al médico a elaborar un diagnóstico o tomar una decisión correcta, así lo primero que se requiere es una muestra adecuada y ésta se obtiene con los cuidados que requiere la fase preanalítica, la cual se define como el conjunto de los procesos y materiales requeridos antes de que la muestra sea procesada en el laboratorio. Así, la fase analítica es definida como el producto del proceso. Se ha descrito que el 47% de los errores se producen durante la fase preanalítica, 25.1% en la fase - analítica y 13.6% en la postanalítica. Un resultado correcto y una apropiada interpretación de la información puede guiar a no realizar pruebas innecesarias, reducir costos y entender de mejor forma los resultados.

Es por tanto indispensable contar con programas, de evaluación continua de la calidad internos y externos en todos los laboratorios dependiendo de las necesidades médicas y siguiendo las normas para organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos de acuerdo a las recomendaciones internacionales.

Metabolismo del hierro

Bajo el entendimiento de que la absorción, transporte, utilización y almacenamiento del hierro en el organismo se llevan a cabo fundamentalmente mediante mecanismos celulares y moleculares, éstos proporcionan las bases para el diseño y uso de las pruebas de laboratorio útiles para detectar deficiencia o sobrecarga de hierro y otras anormalidades del metabolismo del hierro. Avances en el estudio de esta área han permitido la caracterización de proteínas importantes como son la ferritina, la transferrina y sus receptores entre otros. Entre las pruebas que recientemente se han desarrollado, dos son principalmente de utilidad para uso clínico de rutina, la medida de la concentración del fragmento soluble del receptor de la transferrina en suero para el diagnóstico de anemia asociado con aumento en la hematopoyesis y con deficiencia de hierro tisular, y la detección de mutaciones en el gen HFE en el diagnóstico de hemocromatosis hereditaria.

*Jefe del Laboratorio de Hemato-Oncología. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C. Col. Insurgentes Cuicuilco. México, DF. CP. 04530. E-mail: ltrg1027@yahoo.com

Biología molecular

En los pasados 20 años se ha producido un gran progreso en la tecnología de la biología molecular (BM). Primero fue posible obtener información indirecta acerca de la estructura y función de los genes por hibridación de DNA/DNA y DNA/RNA para el conocimiento de la estructura y cantidad del DNA o RNA por medio de sondas moleculares. El siguiente avance fue la habilidad de fraccionar DNA en partes de tamaño predecible con enzimas de restricción bacterianas, esto produjo la invención de la técnica que ahora tiene un papel central en el desarrollo reciente de la genética molecular humana, llamada Southern Blot. Este método permite estudiar la organización de los genes directamente y proporciona la definición de un número de diferentes formas de patología molecular. Una vez que fue posible fraccionar el DNA se insertaron las piezas en vectores capaces de dividirse dentro de las bacterias generándose los archivos de DNA humano creciendo en cultivos bacterianos. Más tarde fue posible secuenciar los genes induciéndolos a sintetizar productos en microorganismos. En el momento que estuvo disponible el mapeo del genoma humano siguió la identificación de regiones de DNA altamente pleomórficas, siendo posible investigar cualquier gen de una enfermedad donde la causa era totalmente desconocida, facilitando el descubrimiento de genes de muchas enfermedades importantes. Considerables logros se han alcanzado en el entendimiento de la patología de las enfermedades a nivel molecular y esto ha tenido un particular impacto en Hematología, permitiendo avanzar en el conocimiento de la función de los genes y mecanismos de la enfermedad a casi todas sus áreas.

La BM se ha aplicado en el estudio de la leucemia aguda (LA). Las LAs constituyen una pequeña parte de todas las enfermedades malignas humanas, el número de genes identificados a través de traslocasiones cromosómicas es mayor que aquellos identificados en otros tipos de cáncer. Las técnicas de citogenética han sido mejoradas con el uso de moléculas de DNA marcadas con diversos fluorocromos y la posibilidad de que cualquier fragmento individual de DNA pueda ser revelado en células en metafase e interfase por hibridación *in situ* por fluorescencia. Esas nuevas técnicas son particularmente aplicables a la investigación de cariotipos complejos. El análisis de bandas G ha sido el eje en la identificación de anormalidades recurrentes en enfermedades malignas y ha permitido la identificación de los genes involucrados en muchas enfermedades. La introducción de las técnicas de hibridación *in situ* (FISH) ha sido de gran utilidad para complementar mayor precisión en la caracterización de anormalidades citogenéticas. Por medio de la hibridación genómica

comparativa se puede realizar un análisis de genoma cromosómico desbalanceado, directamente sobre el DNA extraído del tumor de interés. El multi-FISH es particularmente útil en el análisis de cariotipos complejos y podrán ser detectados rearreglos simples o complicados con el desarrollo futuro de combinaciones de sondas de telómeros con multi-FISH.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método de análisis de células aisladas de correlación multiparamétrica rápido y dinámico. Los avances en la tecnología de hibridomas, biotecnología e inmunobiología asociada con los de química de fluorocromos y sistemas computacionales han contribuido al menos en la evolución de tres fases de la citometría clínica. La primera fue el inmunofenotipo de leucemias y linfomas, segundo fue la necesidad de conteo del marcador de superficie celular CD4 en respuesta a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y tercero la cuantificación de células CD34 y evaluación de la respuesta inmune seguida de trasplante alogénico. Más adelante ha tenido importancia la detección de antígenos específicos de células T, células dendríticas así como células metastásicas circulantes, análisis de ciclo celular, identificación de moléculas intracelulares entre otros. Por tanto, es necesaria la actualización relacionada con esta metodología incluyendo apropiada caracterización de Ags de citoplasma y superficie de la célula, óptimo mapeo electrónico y adecuados reactivos y procesos, con el fin de ampliar su utilidad en el estudio de las enfermedades hematológicas. Por otra parte es necesario conocer sus limitaciones con el objeto de mejorar la interpretación de los resultados.

En relación a la pregunta acerca de la identificación de un grupo de pacientes pediátricos de LAL de bajo riesgo, la importancia de la misma radica en que aunque diferentes regímenes de tratamiento pueden producir índices de curación equivalentes y efectos tóxicos agudos similares, la frecuencia, el tipo y la gravedad de las secuelas a largo plazo pueden ser bastante diferentes. El reconocimiento de los efectos nocivos a largo plazo de las modalidades terapéuticas en LAL, debe resultar necesariamente en modificaciones en las terapias establecidas. Estas modificaciones son un proceso dinámico y demuestran la preocupación de los médicos y sus equipos de trabajo en mejorar la calidad de vida de los sobrevivientes del cáncer en la infancia. Los progresos de la biotecnología como el inmunofenotipo, índice de DNA, la detección de genes de fusión, en conjunto con las características demográficas clínicas y hematológicas de los pacientes, han facilitado la detección de pacientes de bajo riesgo y contribuirán sin duda al diseño de

nuevas modalidades terapéuticas, con protocolos de quimioterapia “atenuada” de la misma eficacia y potencial curativo similar, pero con mínima toxicidad y morbilidad a mediano y largo plazo.

Referencias

1. **Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B.** Everything under control? En Samples: From the patient to the laboratory Second edition, Ed. GIT VERLAG 2001. p. 84-85.
2. **Brian S, Bull.** Quality Assurance Strategies. En J. Koepke. Practical Laboratory Hematology. Churchill Livingstone Inc. 1991. p. 3-29.
3. **Marti GE, Steler-Stevenson, Bleesing JH, Fleisher TA.** Introduction to flow cytometry. Seminars in Hematology 2001;38:93-99.
4. **Orfao A, Ruiz-Argüelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M.** Flow cytometry: Its applications to hematology. Haematologica 1995;80:69-81.
5. **Pui CH, Crist WM, Look T.** Biology and clinical significance to cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1990;76:1449-1463.
6. **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.
7. **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.
8. **Kearney L,** The impact of the new FISH technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. Br J Haemat 1999;104:648-658.
9. **Andrews NC.** Disorders of iron metabolism. New Engl J Med 1999;341:1986-9.5

I. Certificación y/o acreditación ¿cómo conseguirlas?

José Pérez-Jáuregui*

Tradicionalmente los laboratorios clínicos han utilizado los programas de Control de Calidad Interno y de Evaluación Externa de la Calidad para vigilar y evaluar su desempeño,¹ siendo éstos incluso obligatorios en la actualidad en algunos países, incluido México.²

Estos programas, aunque útiles y ampliamente utilizados, han mostrado ser insuficientes para alcanzar, asegurar y desarrollar la calidad en los laboratorios clínicos, por lo que se han buscado nuevas y diferentes estrategias como son, entre otras, los esquemas de Certificación bajo las normas ISO 9000.³

Los estándares de las series de ISO 9000 fueron originalmente desarrollados, hace ya más de 50 años, para proporcionar a la industria manufacturera internacional la estructura para asegurar que los productos que compraban reunían criterios de calidad.⁴

En la actualidad este concepto se ha extendido a los laboratorios clínicos en donde, el sistema de calidad establece para el cliente (pacientes y/o médicos) que el producto comprado (un resultado de laboratorio) cumple con las normas de calidad establecidas⁴.

El INCMNSZ, órgano descentrado de la Secretaría de Salud cuyos orígenes se remontan al año de 1946, tiene entre sus servicios un Laboratorio Central (LC) y una Unidad de Toma de Muestras (UTM), los cuales iniciaron en mayo de 2000, los trabajos para implementar un sistema de calidad y obtener la certificación del mismo bajo la norma ISO 9002:1994.⁵

A continuación se presenta brevemente el camino y las estrategias utilizadas para lograrlo.

Unas de las primeras acciones emprendidas fue nombrar un Comité de Calidad, conformado por distintos miembros del laboratorio, y un administrador de calidad, que se dedicaría de tiempo completo a la implementación y documentación del Sistema de Calidad.

El director del sistema, en conjunto con el citado comité, elaboraron la “Política de Calidad”, misma que serviría de eje sobre el cual giraría todo el Sistema.

Posteriormente se contrataron los servicios de un consultor externo, experto en los sistemas desarrollados bajo la normatividad de ISO 9000, el cual participaría con nosotros en la capacitación del personal para la comprensión e interpretación de la norma, en la formación de auditores, y en la elaboración de documentos.

Se consiguieron diferentes documentos que servirían de referencia como, diversas normas de ISO, estándares del NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), entre otros.

Aunque el LC y la UTM desde hacía ya unos 5 años utilizaban indicadores de calidad para medir su desempeño, éstos se redefinieron y mejoraron.

Apoyados en diversos proveedores externos, se enviaron a calibrar los instrumentos que lo requerían, como pipetas, termómetros, marcos de pesas, etc.

La Política de Calidad del LC y de la UTM del INCMNSZ quedó definida de la siguiente forma: “Alcanzar o exceder

* Laboratorio Central, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

las expectativas de médicos, pacientes y organizaciones a quienes prestamos servicios de laboratorio". Aunque es necesario y mandatorio que todo el personal de la organización la conozca y entienda, y que sepa de que forma participa individualmente en el logro de la misma, no es eso lo que resulta más complicado.

De acuerdo con nuestra experiencia, consideramos que uno de los más grandes retos al implementar el sistema de calidad es lograr que el personal viva todos los días la Política de Calidad de la Organización. Cuando el personal la hace suya, es cuando se alcanza la maduración plena del sistema de calidad.

Otro de los aspectos medulares para la implantación del sistema de calidad fue la elaboración de toda la documentación. Para ello y siguiendo las guías y recomendaciones de la norma de ISO, se elaboró un Manual de Calidad en el que además de describir en forma general lo que es el laboratorio, se menciona el "qué se hace". Se elaboraron además 17 procedimientos generales, que aplican a toda la organización, y en los cuales de describe el "quién, dónde y cuándo se hace". Finalmente se escribieron 125 instrucciones operativas, unas de ellas administrativas y otras de aspecto técnico. Para elaborar estas últimas nos apegamos, con algunas modificaciones, al estándar GP2-A3 del NCCLS. En estos últimos documentos se describe en forma detallada el "cómo se hace".

La elaboración de todos estos documentos permitió revisar detalladamente los procesos que se llevan a cabo en el laboratorio, y en su caso, modificarlos y mejorarlos.

Todos los documentos están resguardados por el administrador de calidad y él tiene un control sobre la emisión y revisión de los mismos.

Una vez elaborados los documentos, debe capacitarse a todo el personal que hará uso de ellos, en el conocimiento de los mismos. El personal no debe saber de memoria "todo" lo que dicen los procedimientos, pero sí debe saber de su existencia, y cómo y cuándo utilizarlos.

Otro de los aspectos fundamentales para la implantación del sistema radica en la trazabilidad de las mediciones. Para ello es necesario tener bajo control toda la instrumentación que se utiliza en el laboratorio, lo que involucra las calibraciones, mantenimientos, programas de control interno y externo, para conocer la incertidumbre y la exactitud de las mediciones.

Finalmente, aunque no menos importante, vienen el control del proceso y la mejora continua, para lo cual es necesario definir e implementar indicadores que abarquen todas las etapas del proceso: pre y post y analítica. Estos indicadores incluyen la detección y registro de inconformidades, con sus respectivas acciones correctivas y análisis de raíz de la causa; las encuestas de satisfacción a médicos y pacientes, para conocer "la voz" de nuestros clientes y conocer sus expectativas; la medición de los tiempos de entrega de resultados y de tiempos de espera de los pacientes; el análisis de los costos de la operación del laboratorio; etc.

El día 3 de mayo la compañía *Bureau Veritas Quality International* (BVQI), después de dos días de auditoría, emitió la recomendación para que nuestro sistema se certificara bajo la norma ISO 9002:1994, con los avales americano (ANSI-RAB) y europeo (UKAS).

Nuestros resultados demuestran que es posible implantar un sistema de calidad en un laboratorio de una institución del Sector Público. En el año 2000 apareció la norma para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos NOM-166-SSA1-1997 y es imperativo el cumplir con dicha normatividad. Al tener un sistema de calidad como el que obtuvimos, no solo logramos cumplir con dicha norma, sino que la rebasamos considerablemente. Además, hoy en día con la puesta en marcha por la Secretaría de Salud de la Cruzada Nacional por la Calidad, el gobierno de nuestro país ha fijado indicadores y propuesto metas para satisfacer las necesidades de los usuarios de los servicios de salud.

La implementación de sistemas de calidad como éste seguramente ayudarán a mejorar la calidad de la atención a los enfermos en nuestro país.

Referencias

1. **Kailner A.** Quality management in the medical laboratory: a comparison of draft standards. *Clin Chim Acta* 1998;278(2): 111-9
2. NOM-166-SSA1-1997 México: Para la Organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos.
3. **Dybkaer R.** Quality assurance, accreditation, and certification: needs and possibilities. *Clin Chem* 1994;40(7):1416-20.
4. **Lehmann HP** Certification standards transfer: from committee to laboratory. *Clin Chim Acta* 1998;278(2):121-44.
5. NMX-CC-004:1995 IMNC/ISO 9002 1994. México: Sistemas de calidad: modelo para el aseguramiento de la calidad en producción, instalación y servicio.

II. Receptor soluble de la transferrina en la deficiencia de hierro

Josefa Piedras*

El receptor de la transferrina (RTf) es la puerta de entrada del hierro del espacio extracelular al interior de prácticamente todas las células del organismo. El RTf es una glucoproteína transmembranal que contiene dos subunidades idénticas, cada una con una masa molecular de 95 kDa. Este receptor une principalmente transferrina diférrica y el complejo receptor-transferrina se internaliza dentro de un endosoma, desde donde el hierro es transferido al citosol. La apotransferrina permanece unida a su receptor y regresa a la superficie de la célula donde se disocia del receptor, el que queda libre para repetir el proceso.¹ No obstante el papel tan importante del RTf en el metabolismo de la célula, esta proteína tuvo poca o ninguna relevancia clínica hasta que en 1986 un grupo de japoneses (Kohgo y cols)² identificaron en el suero humano (mediante ELISA) pequeñas cantidades del receptor soluble de la transferrina (RsTf). La proteína purificada en el suero es más pequeña (85 kDa) que la porción monomérica del RTf celular.

En estudios clínicos y en animales se ha demostrado que la concentración en suero del RsTf refleja la masa total del receptor tisular. La principal fuente del RsTf la constituye las células eritropoyéticas de la médula ósea y los reticulocitos circulantes, que finalmente pierden su receptor durante la maduración. Así, la concentración del RsTf correlaciona directamente con la actividad eritropoyética, e inversamente con la cantidad de hierro disponible para eritropoyesis, constituyendo una medición cuantitativa del estado funcional de hierro.

La disminución en el aporte de hierro lleva a una sobreregulación en la síntesis del RTf produciendo un aumento en la concentración del RsTf. En los últimos años se ha considerado a la medición en suero del RsTf una poderosa herramienta para identificar a la deficiencia de hierro en adultos, especialmente para distinguir la anemia por deficiencia de hierro (ADH) de la anemia del padecimiento crónico. Varios autores han reportado una buena sensibilidad en el diagnóstico de ADH en pacientes sin otros padecimientos. Sin embargo, se desconoce la utilidad de la medición del RsTf para identificar a los pacientes con deficiencia de hierro sin anemia. Una de las evidencias que apoyan que el RsTf puede también detectar deficiencia de hierro (ferritina sérica y saturación de transferrina disminuidas) sin anemia proviene de un estudio realizado en sujetos voluntarios sanos sometidos a flebotomías semanales de 150 a 250 mL, hasta alcanzar un descenso en la concen-

tración de Hb mayor a 2.0 g/dL. Los cambios en los parámetros de hierro ocurrieron en dos etapas distintas, durante el período de disminución de las reservas de hierro hubo una progresiva caída en la concentración de ferritina sérica, sin cambio en el RsTf. Cuando la ferritina estuvo por abajo de las cifras normales se observó una elevación progresiva en el RsTf. De este trabajo se concluyó que el RsTf refleja el grado de deficiencia tisular de hierro.

Con el objeto de conocer si la concentración del RsTf en suero permite identificar no sólo la anemia por deficiencia de hierro sino también la deficiencia de hierro sin anemia, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S.Z. se seleccionaron los sueros de 109 mujeres (79.6%) y 28 varones (20.4%) con reservas de hierro disminuidas (ferritina sérica <20mg/L) y con concentración de Hb normal (varones \geq 14.5 g/dL, mujeres \geq 13.5 g/dL) o baja. En estos sueros se cuantificó hierro, capacidad total de fijación de la transferrina y RsTf (inmunoensayo R&D). Del total de 137 pacientes 116 provenían de la consulta externa y 21 del servicio de hospitalización. Hubo 106 casos (83 mujeres y 23 varones) con ADH y 17 pacientes (15 mujeres y 2 varones) con deficiencia de hierro sin anemia. El 77.3% y el 47% de los pacientes con ADH y con deficiencia sin anemia, respectivamente tuvieron cifras elevadas de RsTf (\geq 25.8 nmol/L). De acuerdo a estos resultados la medición del RsTf es menos sensible para identificar deficiencia de hierro en ausencia de anemia. Un hallazgo interesante en el grupo de pacientes con ADH fue la correlación inversa significativa ($r = -0.658$, $p < 0.01$) entre Hb y RsTf a concentraciones de Hb inferiores a 10 g/dL. Esta correlación se perdió en los pacientes con ADH pero con Hb superior a 10 g/dL ($r = -0.249$) así como en aquéllos con deficiencia de hierro sin anemia ($r = -0.144$). Estos resultados podrían interpretarse como si la concentración de Hb regulara en cierta forma la síntesis del RTf, y que, como postulan otros autores (Roault y cols.)³ la síntesis de este receptor es inducida por deficiencia de hierro e inhibida por heme.

Referencias

1. Cook JD. The measurement of serum transferrin receptor. Am J Med Sci 1999;318:269-76.
2. Kohgo Y, Nishisato T, Kondo K, et al. Circulating transferrin receptor in human serum. Br J Haematol 1986;64:277-81.
3. Roault T, Rao K, Harford J, Mattia E Klausner RD. Hemin, chelatable iron, and the regulation of transferrin receptor biosynthesis. J Biol Chem 1985;260:14862-6.

*Laboratorio de Hematología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

III. ¿Se puede identificar un grupo de pacientes pediátricos de LAL de “bajo riesgo”?

Lina Teresa Romero-Guzmán*

A principios de la década de 1970 se despertó un profundo interés por la identificación y posterior caracterización de ciertos indicadores de valor pronóstico. Se consideró que las propiedades que estaban asociadas con mayor frecuencia al grupo de pacientes con buena respuesta al tratamiento ejercían una influencia pronóstica favorable y sirvieron como patrón o marco de referencia para caracterizar los rasgos distintivos asociados con el grupo de pacientes con mala respuesta al tratamiento. Los factores de riesgo principales identificados en esta época se encontraban asociados con ciertas características biológicas como la edad, el género y la raza; hematológicas, como el recuento leucocitario, y clínicas determinadas por manifestaciones discretas o evidentes de la enfermedad.¹⁻³ A fines de la década de 1970 Secker-Walker y col. señalaron que la ploidía de los cariotipos de las células leucémicas era un determinante importante de la LAL de la niñez. Los niños con un pronóstico relativamente favorable tenían más de 50 cromosomas en sus cariotipos de células leucémicas y aquellos con una ploidía menor tenía una tasa de recidivas más alta.⁴ Estos resultados fueron confirmados posteriormente por múltiples investigadores. Los pacientes en el grupo hiperdiploide que tienen un pronóstico favorable, se pueden identificar confiablemente de manera automática mediante medición por citometría de flujo (CF) de los blastos leucémicos. Con la CF se analizan los núcleos teñidos con colorantes específicos para DNA a fin de evaluar la cantidad de DNA por célula y los resultados se registran como un histograma de frecuencia. La medición de DNA se expresa como un índice DNA (IDNA) que es la relación del valor modal de las células leucémicas en fase G0/G1 en comparación con la de las células diploides normales. El análisis de los pacientes tratados en el protocolo X de terapia total en St. Jude mostró que los que tuvieron un mejor pronóstico tenían un IDNA ³ 1.16, que correspondía a 53 o más cromosomas por célula leucémica por análisis citogenético.⁵ El análisis de los cariotipos de los blastos leucémicos con más de 50 cromosomas ha demostrado además otras características citogenéticas distintivas como trisomías de cromosomas específicos, X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 y 21 y una frecuencia relativamente baja de translocaciones. Este grupo constituye entre 15 a 25% de leucemia aguda linfoblástica (LAL)

con un promedio estimado de 20% y es un subgrupo que se encuentra con mayor frecuencia en las LAL PCB-CD10⁺ y que se asocia con otras propiedades que se considera ejercen una influencia pronóstica favorable como la edad de presentación entre 2 y 10 años, raza blanca, cuenta baja de leucocitos, DHL baja y ausencia de casos en la edad de la lactancia y en LAL tipo-T, mientras que la pseudodiploidía se observa con mayor frecuencia en las LAL PCB – CD10⁻ y en prácticamente todos los casos de LAL-B. Los pacientes con pseudodiploidía e hipodiploidía tienen un pronóstico relativamente reservado.^{6,7}

En la década de 1980, el grupo danés y alemán BFM confirmaron las observaciones de que el IDNA ³ 1.16 era un indicador independiente de buen pronóstico y se reconoció el impacto en el pronóstico del inmunofenotipo y algunas alteraciones estructurales citogenéticas como translocación t(9:22), t(4:11), t(8:14) y t(1:19) en las células leucémicas y apenas en la década pasada se ha comenzado a reconocer el impacto de la respuesta temprana al tratamiento y de la enfermedad residual mínima. A finales de la década de 1990 se demostró que la t(12:21) -una translocación críptica- no detectada por los métodos citogenéticos convencionales se acompañaba de la fusión del gen TEL en el brazo corto del cromosoma 12 (12p) con el gen AML-1 en el brazo largo del cromosoma 21 (21q) y que dicha alteración solo podía ser identificada por técnicas por hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) y/o la reacción en cadena de la polimerasa PCR. Se ha reportado una frecuencia entre 12 a 36% con un promedio estimado de 25% y es un subgrupo que se presenta con mayor frecuencia en LAL PCB-CD10⁺, con una edad de presentación entre 1 y 10 años, con cuentas bajas de leucocitos y que no forma parte del grupo con hiperdiploidía (> 50 cromosomas). La mayoría de los investigadores correlacionan la presencia del gen de fusión TEL/AML-1 con un pronóstico favorable habiéndose informado una supervivencia libre de evento entre 89 y 100%.

Hasta la fecha se han identificado numerosos factores pronósticos en LAL; sin embargo, en casi todos los análisis hechos con dichos factores de riesgo se ha incluido una sola variable, pero cuando se analizan incluyendo múltiples variables muchos de ellos pierden el impacto como factor pronóstico pues éste dependía

*Jefe del Laboratorio de Hemato-Oncología, Instituto Nacional de Pediatría, DF.

de otros factores asociados más importantes. Los indicadores de valor pronóstico se han clasificado de acuerdo a su origen ya que unos dependen del huésped, otros de la enfermedad y unos del tratamiento instituido aunque existe una estrecha interrelación entre ellos. La identificación de estos factores ha sido el resultado de extraordinarios avances en varias disciplinas afines a la hematología como la inmunología, biología celular, citogenética, genética molecular, farmacología, enfermedades infecciosas, estadística, diseño experimental de protocolos clínicos y de la terapia antileucémica.

El problema más importante a enfrentar cuando se pretende reconocer un grupo de niños de bajo riesgo de recidiva en LAL es aceptar que en general la identificación de estos factores ha surgido empíricamente, a partir de hechos de observación y no de hipótesis postuladas. Algunos factores de riesgo no podrán ser reproducidos en estudios longitudinales provenientes de una sola institución o grupos colaborativos multicéntricos o en estudios contemporáneos multinacionales porque la estratificación de los pacientes y los tratamientos están cambiando cada tres a cinco años. Muchos factores de riesgo utilizados inicialmente se han descartado en la actualidad. En un análisis crítico de factores pronósticos en estudios conducidos entre 1972- 1994, Donadieu y col. encontraron que solo el género, la edad, la cuenta de leucocitos y el cariotipo conservaban su impacto en cuanto al pronóstico en análisis con múltiples variables. Sin embargo, individualmente y colectivamente tenían una muy baja capacidad predictiva: 1.1% para el género, 2% para edad, 3.5% para la cuenta de leucocitos y 1.6% para el cariotipo. Su baja capacidad predictiva refleja la rareza de factores de primera magnitud desfavorables y el número relativamente elevado de pacientes con factores pronósticos favorables que fallecen.⁸ Otro aspecto importante a resaltar es que el tratamiento de los pacientes fue adaptado con arreglo a los diversos grupos de riesgo y los factores pronósticos utilizados en la década de 1970 y principios de 1980 no incluían el cariotipo, IDNA, la presencia del gen de fusión TEL/AML-1, la respuesta temprana al tratamiento, y la enfermedad residual mínima, de ahí la dificultad en identificar de manera precisa a los pacientes de riesgo bajo con la definición de riesgo actual. Por otra parte, la identificación de los factores de riesgo más recientes se llevó a cabo en niños que no estaban recibiendo un tratamiento antileucémico básico como los entonces en boga.

Cuando se cambian las definiciones de riesgo o aun peor, se introducen nuevos métodos de diagnóstico, aparecen los efectos de la migración de riesgos. Si los métodos de clasificación de riesgo se hacen más sensibles o específicos, en ambos casos resultará que un

subgrupo de "mejor pronóstico" sea transferido a un grupo de peor pronóstico; esto dará lugar a una mejoría aparente en los resultados del tratamiento dentro de cada población de determinado riesgo, pero sin efecto en los resultados terapéuticos totales.

La farmacogenética comprende un amplio espectro de genes que determinan la biodisponibilidad de las drogas en un individuo y una población. La tecnología de microensayo, puede exhibir patrones de expresión simultánea de miles de genes, que mediante programas analíticos complejos puede organizar la expresión de información en mapas de factores biológicamente relevantes. Esta tecnología que incluye genes involucrados en el metabolismo de los agentes quimioterapéuticos, susceptibilidad del huésped a padecer cáncer, respuestas inmunes, diferenciación, proliferación y apoptosis, puede generar cientos de variables estadísticamente significativas pero de poca capacidad predictiva.⁹

¿Se puede identificar con precisión actualmente un grupo de niños de riesgo bajo?

Es probable que sí. El paciente para considerarse de bajo riesgo, debe llenar los siguientes requisitos: ser de preferencia del sexo femenino, con una edad entre 1-10 años, con un número inicial de leucocitos $< 10 \times 10^9/L$, sin evidencia de infiltración extramedular, con buen estado nutricional, inmunofenotipo PCB CD10⁺, con un IDNA 3 1.16, o con presencia del gen de fusión TEL/AML-1. La respuesta inicial es esencial y debe haber una citorreducción rápida de la población celular leucémica en sangre periférica (< 1000 blastos/mm³) y menos de 5% de blastos en la médula ósea en el día 14 y detección de enfermedad residual mínima de menos de 10^{-2} al final del tratamiento de inducción. La importancia de identificar un grupo de pacientes con tales características es que tal vez puedan recibir una quimioterapia "atenuada" de la misma eficacia, es decir, sin disminución del potencial curativo, pero con mínima toxicidad, en un intento por disminuir la morbilidad inmediata y retardada de los tratamientos mas enérgicos.

Referencias

1. **Simone JV, Verzoso MS, Rudy JA.** Inicial features and prognosis in children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 1975;36:2099-2108.
2. **Robbison L, Sather H, Coccia P** et al. Assessment of the interrelationship of prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1980;2:3-5
3. **Romero F, Paredes R.** Definición de riesgos en leucemia aguda, de acuerdo a la clasificación. In: Ruiz-Argüelles GJ, San-Miguel J, editors. Actualización en leucemias. 1st ed. Panamericana; 1996. p. 41-49
4. **Secker-Walker LM, Lawley SD, Hardisty RM.** Prognostic implication of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Br Med J* 1978;2:1529.

5. **Look T, Robertson PK, Williams DL, et al.** Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985;65:1079-1086.
6. **Secker-Walker LM, Chessells JM, Stewart EL, et al.** Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1989;72:336-342.
7. **Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, et al.** Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an *in vitro* study. *Blood* 1995;85:751-756.
8. **Donadieu J, Aucleve MF, Baruchel A, et al.** Critical study of prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia: differences in outcome are poorly explained by the most significant prognostic variables. *Br J Haematol* 1998;102:729-739.
9. **Felix CA, Lange BJ, Chessells JM.** Pediatric acute lymphoblastic leukemia: challenges and controversies in 2000. USA: Education Program Book. ASH; 2000. p. 285-302.

IV. Biología molecular y FISH: utilidad en el estudio de las leucemias agudas

Rosa María Arana-Trejo*

Las leucemias agudas (LA) se asocian con alteraciones cromosómicas que son empleadas como marcadores para el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad; estos rearreglos pueden ser detectados en los cromosomas (Citogenética y FISH), en los genes fusionados (*Southern blotting* o PCR), en el RNA quimérico (*Northern blotting* o RT-PCR) y en la estructura de las proteínas [Western blotting].¹ La citogenética es en muchos laboratorios el estándar de oro para el estudio de las alteraciones genéticas en leucemias. Sin embargo tiene varias desventajas: primero el estudio es viable en solo 50-70% de los casos y su sensibilidad de detección es en 1-5%. Además solo 10-15% de los casos de LA presentan alteraciones cromosómicas específicas; el resto cursa con múltiples alteraciones inespecíficas así como delecciones submicroscópicas, trisomías y monosomías. La naturaleza genética de estas alteraciones múltiples y por lo tanto su significado clínico ha sido difícil por el número y calidad de las metafases obtenidas. Para elucidar la naturaleza de estos rearreglos múltiples y complejos, así como la ganancia y pérdida de material cromosómico ha surgido la citogenética molecular.² Esta disciplina se basa en técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación genómica comparativa (CGH) o el cariotípico espectral o multi-FISH (SKY/ M-FISH) que hibridan una secuencia de DNA en una preparación citológica en este caso cromosomas y células en interfase. El FISH permite detectar tanto alteraciones cromosómicas específicas, como monosomías, trisomías, delecciones y rearreglos complejos que involucran tres o más cromosomas. La sensibilidad de la técnica es

alrededor de 0.3 a 1% más alta que las técnicas citogenéticas convencionales; específicamente en los cariotipos de leucemias con el FISH se superan los problemas de bajo índice mitótico, heterogeneidad de la muestra (células normales y anormales) y calidad de los cromosomas. Uno de los avances más característicos es el uso de núcleos en interfase; sin necesidad de tener cromosomas en metafase para el monitoreo de la enfermedad, respuesta al tratamiento y pos-trasplante de médula ósea (TMO).¹⁻⁵ Sin embargo, la desventaja mayor de esta metodología en nuestros centros hospitalarios es el alto costo de las sondas comerciales y el alto número de resultados falsos positivos debidos al ruido de fondo.

En leucemias agudas hay un gran número de alteraciones cromosómicas cuyos genes afectados han sido clonados y constituyen marcadores específicos para los estudios moleculares como la t(9;22), t(15;17), t(8;21), inv(16), t(1;19) y t(12;21). En los casos de leucemias linfoblásticas y linfomas en los que no existen marcadores de clonalidad específicos es válido usar los rearreglos de las secuencias de unión los genes de inmunoglobulinas (Ig) y del receptor de células T (TCR). El espectro de métodos moleculares para realizar la detección de los genes de fusión y/o sus productos es muy amplio y su uso está restringido en nuestro medio a costo, rapidez y sensibilidad.^{1,5,6}

La hibridación tipo *Southern* se realiza con una sonda específica en DNA que puede ser obtenida de sangre periférica, médula ósea, tejido fresco y/o de bloques de parafina. En leucemias y linfomas es usada para establecer el diagnóstico, ya que su sensibilidad es solo del

*Servicio de Genética, Hospital General de México y Facultad de Medicina, UNAM. Dr. Balmis #148, Col. Doctores, México D.F. C.P.06726. Email: aranat@telmex.net.mx

1% y no puede ser aplicada en el estudio de enfermedad residual. La amplificación de secuencias génicas específicas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea cantidades muy pequeñas de DNA y con el uso de la transcriptasa reversa también se aplica en mRNA (RNA mensajero)(RT-PCR). La especificidad y sensibilidad del PCR simple puede ser incrementada con el uso de la reacción anidada (*nested PCR*) que realiza una reamplificación del primer producto de PCR con un segundo par de "primers" y detecta una célula leucémica en 10^5 - 10^6 células normales. Los rearreglos estudiados con estas técnicas son principalmente t(9;22)/BCR-ABL en LMC, LLA y LMA, t(15;17)/PML-RAR? en M3, t(8;21)/AML1/ETO en M2, inv(16q)/CBF?-MYH11 en M4, t(6;9)/DEK-CAN en M2 o M4, t(1;19)/E2A-PBX1, t(12;21)/TEL-AML1, t(4;11)/AF4-MLL en leucemias linfoblásticas de células-B etc.⁵⁻⁷

Uno de los problemas del uso de la PCR en el estudio de las leucemias son las variaciones en los puntos de rompimiento en los genes implicados así como el procesamiento alternativo (splicing) del mRNA que pueden originar falsos negativos por la ausencia de un producto visible de amplificación. Además existen reportes de rearreglos como la t(9;22) y la t(14;18) que son amplificados en individuos sanos que no desarrollan la enfermedad. La amplificación por PCR solo nos indica la presencia y/o ausencia del rearreglo específico que estamos estudiando, no nos informa si existen alteraciones adicionales, o si hay una célula leucémica o un millón. Para la resolución de este problema han surgido las técnicas de PCR cuantitativas que nos indican el número de transcritos químéricos y por lo tanto de células leucémicas presentes. Estas técnicas se aplican principalmente en la evaluación de enfermedad mínima residual pos-TMO.^{1,5-7}

Existen grandes diferencias en cuanto a la metodología molecular y citogenética empleadas en la detección de alteraciones cromosómicas en LA y ninguna de ellas puede excluir a la otra. La citogenética clásica, FISH y PCR pueden complementarse y sus aplicaciones pueden ser intercambiadas cuando se trate del estudio basal seguimiento o detección de enfermedad residual.

Referencias

1. **Wetzler M, Talpaz M, Estrov Z, Kurzrock R.** Clinical uses and limitations of common molecular methodologies: from cloning to Southern, Northern, Western blotting and *in situ* techniques. In: Kurzrock R, Talpaz M, editors. Molecular Biology in Cancer Medicine. Martin Dunitz , 1995. p. 12-26.
2. **Lindual C, Norclenskould M, Porwit A, Bjorkholm M, Blennow E.** Molecular cytogenetic characterization of acute myeloid leukemia and myelodisplastic syndromes with multiple chromosome rearrangements. *Haematologica* 2001;86:1158-1164.
3. **Kearney L.** The impact of the new FISH technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haemat* 1999;104:648-658.
4. **Kolomietz E, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA.** Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood*, 2001; 97:3581-3588.
5. **Provan D, Gribben J.** Molecular hematology. UK: Blackwell Science; 2000.
6. **Boultwood J, Fidler C.** Molecular analysis of cancer. USA: Humana Press; 2002.
7. **Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, et al.** Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901-1928.

