

Gaceta Médica de México

Volumen
Volume **139**

Suplemento
Supplement **2**

Marzo-Abril
March-April **2003**

Artículo:

Temas selectos de laboratorio e
investigación en hematología

Derechos reservados, Copyright © 2003:
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*



Hedigraphic.com

I. Introducción

Lina T. Romero-Guzmán*

La Hematología como otras ramas de la Medicina, se ha visto favorecida con la aplicación del diagnóstico de tipo molecular, el laboratorio ha desempeñado un papel fundamental en este proceso a través de la implementación de técnicas moleculares. Desde que se originó la idea de que el material genético está compuesto de ácidos nucleicos, cuando Griffith en 1928 observó el fenómeno de "la transformación" y los estudios de Avery en 1944 demostraron que el principio transformador aislado correspondía químicamente al DNA, hasta el Proyecto del Genoma Humano en donde se ha logrado determinar el orden de cerca de 3,200 millones de nucleótidos que forman nuestro genoma, ha aumentado la necesidad de desarrollar y aplicar tecnologías nuevas para realizar análisis detallados de esta nueva información. Han sido de gran utilidad los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que facilita el diagnóstico molecular debido a que se realiza a partir de cualquier muestra proveniente del sujeto en estudio y sólo requiere de una pequeña cantidad de DNA. El diagnóstico molecular puede tener dos posibilidades, la primera es caracterizar la mutación o mutaciones en un gen causante de la enfermedad, mediante el secuenciamiento directo de productos de PCR o con la metodología de los microarreglos. Los microarreglos del DNA es una tecnología que responde a la necesidad de analizar simultáneamente patrones de expresión de cientos o miles de genes y ofrece grandes ventajas sobre las técnicas de escrutinio genético. La segunda posibilidad se realiza mediante la identificación de los alelos de un polimorfismo genético situado muy cerca o en el interior (intrón o exón) del gen causante de la enfermedad. Una de las aportaciones importantes, ha sido la identificación de un grupo de genes cuya función es la vigilancia genómica, estos genes detectan los daños que sufre el DNA e inducen a las células a diversos mecanismos como apoptosis, ignorancia del daño e introducción de errores en la síntesis de DNA o reparación, mediante estos procesos se ponen a salvo

las células en todo el organismo. Los genes de vigilancia genómica, se han podido reconocer debido a que su ausencia causa enfermedad, algunos de ellos se han estudiado en cuanto a los procesos moleculares en que están involucrados, las interacciones con otras vías celulares y su asociación con mecanismos celulares normales así como también en los mecanismos patogénicos. Uno de los padecimientos en donde ha sido de especial utilidad el diagnóstico citogenético y molecular es el Síndrome mielodisplásico (SMD) ya que en la mitad de los casos presentan algún tipo de alteración cromosómica, como aneuploidías o rearreglos estructurales. Los subgrupos del SMD en base a la citogenética tienen una gran importancia con respecto al pronóstico de la enfermedad. Asociados a las alteraciones citogenéticas se han identificado alteraciones a nivel molecular como mutaciones en oncogenes, inactivación de proteínas reguladoras de la apoptosis y alteración en genes reguladores del ciclo celular.

Uno de los problemas que debe enfrentar el Laboratorio de Hematología es el disponer de métodos de alta sensibilidad que permitan detectar un número pequeño de células neoplásicas e identificarlas de entre las células normales que las acompañan. A continuación se mencionan tres casos relacionados.

1. Identificación de blastos en líquido cefalorraquídeo (LCR). La detección de infiltración leucémica al sistema nervioso central, se realiza por la identificación de los blastos mediante el estudio citomorfológico del LCR, esto tiene un significado diagnóstico y pronóstico importante. Actualmente en la búsqueda de aumentar la sensibilidad en la detección algunos autores han propuesto adicionar el estudio de LCR mediante citometría de flujo, esperándose que con esta combinación de métodos se logre aumentar la exactitud del diagnóstico.
2. Detección de enfermedad residual mínima. En el caso de la detección de las células tumorales residuales en un individuo a quien se le aplicó un

* Jefe del Laboratorio de Hemato-Oncología. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-c. Col Insurgentes Cuicuilco. Tel. 56060002-Ext. 329, 483. ltrg1027@yahoo.com

- esquema terapéutico antineoplásico, si se tiene un número elevado de células tumorales, la enfermedad residual se observa al microscopio, pero cuando son escasas es necesario recurrir a métodos como la citometría de flujo y además a técnicas genéticas y moleculares que involucran hibridación con sondas fluorescentes (FISH) y retrotranscripción-amplificación (RT-PCR). La combinación de los métodos parece aumentar la sensibilidad y así la probabilidad de detección hasta 10^{-4} a la 10^{-5} células.
3. Trastorno mieloproliferativo transitorio (TMT).- Es una enfermedad que se ha observado al nacimiento y durante las primeras semanas de la vida, en cerca del 10% de los niños con Síndrome de Down (SD). Se caracteriza por la presencia de células anormales (blastos) en la circulación de naturaleza clonal. En estos pacientes se produce remisión espontánea en los primeros tres meses de vida, pero se han reportado casos en los cuales se ha desarrollado meses o años después una forma fatal de la enfermedad (LAM-M7) con una elevada mortalidad, especialmente pacientes que presentaban alteraciones citogenéticas adicionales al nacimiento. Para dar algunas respuestas al fenómeno de regresión del TMT y la progresión potencial a LAM-M7 es importante el monitoreo en pacientes con SD-TMT con técnicas de detección de enfermedad residual mínima, mediante citometría de flujo y detección molecular.

Estudios en genómica, proteómica y bioinformática dirigidos a ensayos de funcionalidad de genes y su

combinación con otros métodos como quimioluminiscencia, citometría de flujo, selección electromagnética de células, etc., son la base del laboratorio de investigación en Hematología.

Debido a la evolución tecnológica actual, no es posible evaluar en su totalidad ni la información de la literatura médica ni la utilidad de las pruebas diagnósticas, es necesario contar con un sistema que permita evaluar de manera crítica y eficiente la información existente. Un sistema mediante el cual se realice la validación (lo más cercano al valor verdadero) de los resultados, se determine la validez global de la prueba diagnóstica y la utilidad de la prueba (seguridad con que se identifica el problema de interés). Sistemas que permitan una buena gestión del laboratorio ayudando a una mejor planificación y aprovechamiento de los recursos.

Así mismo, con los nuevos retos tecnológicos se ha creado la necesidad de que el personal del laboratorio tenga una interrelación constante con el médico Hematólogo, esto exige una especialización en los diferentes ámbitos del conocimiento del Laboratorio Clínico ya que es la única forma no sólo de dialogar, sino de contribuir al diagnóstico, control y tratamiento del paciente. Con el propósito de que el personal del laboratorio se adecue a las necesidades reales es necesario actualizar los programas de enseñanza desde los niveles de licenciatura de las áreas médico-biológicas y establecer programas de educación continua que favorezcan la motivación para interesarse en todo aquello que signifique aumentar su conocimiento, desarrollarse de una mejor forma en la actualidad y formarse una mejor perspectiva del futuro.

II. Vías de modulación de la apoptosis

Angélica C. Monsiváis-Orozco

La muerte celular programada ha recibido varios nombres en los últimos dos siglos. El término finalmente adoptado fue apoptosis, acuñado por Currie y colaboradores en 1972, es una palabra griega que se utiliza para describir la caída de las hojas de los árboles con este término se refiere a los aspectos morfológicos de una muerte fisiológica.

Durante la apoptosis se presentan los siguientes cambios morfológicos: Disminución del tamaño celular, condensación de la cromatina nuclear, formación de

vesículas de membrana, fragmentación en cuerpos apoptóticos, y fagocitosis de la célula por células vecinas o el sistema retículo endotelial. Se trata de un proceso que requiere energía y puede afectar una o varias células. Estos cambios morfológicos difieren de lo encontrado en la necrosis donde observamos edema celular, lisis de la cromatina, ruptura de la membrana citoplasmática con liberación del contenido celular, inflamación prominente con afección de varios grupos celulares, este es un proceso que no requiere energía.

La apoptosis participa en distintas funciones:

1. Durante el desarrollo embrionario en la formación de cavidades, separación de los dedos y eliminación de estructuras vestigiales que tuvieron una función durante la embriogénesis.
2. En la homeostasis celular en el mantenimiento del número celular.
3. En la eliminación de células indeseables, ya sea por envejecimiento, defectos genéticos, células infectadas, linfocitos autorreactivos, células tumorales, o células con lesiones por agentes nocivos.

La apoptosis se caracterizó por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y está regulada por los genes *ced 3* y *ced 4*, cuyos productos participan en la ejecución de la apoptosis y por el gen *ced 9* que participa en la inhibición, en mamíferos el proceso es más complejo pero sigue el mismo patrón con una elevada conservación a través de la evolución animal.

La apoptosis es un proceso complicado, requiere la activación coordinada y ejecución de múltiples subprogramas. Se reciben señales apoptóticas intracelulares (Vía intrínseca) o extracelulares (Vía extrínseca), estas señales son transducidas a proteínas adaptadoras y transmitidas a proteasas de cisteína específicas llamadas caspasas de iniciación. A partir de este momento las células están comisionadas para apoptosis y el siguiente paso es la ejecución a través de las caspasas de ejecución.

Señales de muerte

Las señales de muerte extracelular pueden ser originadas por: 1) eliminación de las señales extracelulares que inhiben la apoptosis 2) recepción de señales positivas de muerte a través de los receptores de muerte. Una de las vías de señal de apoptosis mejor estudiadas es la de receptores de membrana como el del factor de necrosis tumoral α (FNT α), y Fas Ligando. Fas (APO1 o CD95) es un receptor transmembrana tipo I que pertenece a la familia de receptores del FNT. Fas Ligando es una proteína transmembrana de 40 kD que induce apoptosis al unirse a Fas, a pesar de que inicialmente se creía que el Fas L era específico de linfocitos se ha encontrado en tejidos no linfoides incluyendo corazón y páncreas.

Los receptores de muerte como Fas y FNTR1 contienen dominios citoplásmicos de aproximadamente 80 aminoácidos que son esenciales para generar señales de muerte y que se designan como dominios de muerte, estos dominios reclutan proteínas adaptadoras como TRADD (TNFR1-associated death domain protein) en el

caso del R1FNT y FADD (Fas-associated death domain protein) en el caso de Fas. Proteínas adaptadoras como FADD contienen secuencias específicas llamadas dominios efectores de muerte que interactúan con la caspasa 8 iniciando la cascada apoptótica.

La señales de muerte intracelular como la ocasionada por agentes que dañan el DNA como la radiación ionizante originan apoptosis mediada por p53, con un aumento en la transcripción de proteínas proapoptóticas, otros mecanismos de daño celular aumentan la actividad de protein cinasas activadas por stress que inducen apoptosis, aunque se conoce poco sobre estos mecanismos al parecer convergen en programas de muerte que llevan a la activación secuencial de caspasas.

Caspasas

Son proteasas de cisteína, que producen ruptura después de un residuo de ácido aspártico, las caspasas guardan homología entre sí y habitualmente son sintetizadas en forma de precursores inactivos (zimógenos) con cuatro dominios diferentes, estos precursores son activados por proteólisis por otras caspasas en forma de cascada proteolítica. La acción de ejecución de las caspasas es al romper diferentes sustratos que incluyen proteínas citosólicas y nucleares que tienen un papel en la reparación y replicación del DNA, en el splicing del RNA, en la división celular y estructuras del citoesqueleto, estos cambios bioquímicos son los responsables de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis. Las caspasas se dividen en caspasas de iniciación (corriente arriba) y en caspasas efectoras o de ejecución (corriente abajo). Las caspasas de iniciación tienen prodominios largos que contienen motivos estructurales (Ej Dominio efecto de muerte (DED) o el dominio de reclutación de caspasas) que asocian estas caspasas a sus activadores específicos, en contraste las caspasas efectoras tienen prodominios cortos, Se han descrito más de 13 caspasas, no todas participan en la apoptosis, las principales caspasas de iniciación son las caspasas 2, 8, 9 y 10 y las principales caspasas efectoras son las caspasas 3, 6, 7 y 14.

Proteínas adaptadoras y otros reguladores

Apaf-1 (apoptotic portase activating factor-1) es una proteína adaptadora que afecta la activación de la caspasa 9, Apaf-1 se une a la procaspasa 9 en presencia de citocromo c y de ATP y activa esta proteasa, iniciando lo que podríamos llamar, la vía intrínseca de la cascada apoptótica, activándose posteriormente las caspasas efectoras 3, 6 y 7.

Los dominios de muerte de los receptores del FNT y de Fas reclutan ciertas proteínas adaptadoras (TRADD y FADD), las moléculas FADD se asocian con la procaspasa 8 iniciando la vía extrínseca de la cascada apoptótica.

Familia de las proteínas Bcl-2

Es el equivalente a las proteínas CED 9 en *C elegans*, sin embargo, en el nematodo tiene únicamente funciones antiapoptóticas mientras que en los mamíferos puede ser proapoptótica o antiapoptótica. El Bcl-2 fue descubierto como un protooncogen en el punto de ruptura cromosómica da la t (14;18) en el linfoma de células B, de donde deriva su nombre (B, cell Lymphoma). Causa oncogénesis al suprimir la apoptosis más que por estimular la proliferación celular. La familia de proteínas Bcl-2 incluye tanto inhibidores de la apoptosis (Ej Bcl-2, Bcl-kl, Bcl-w, Mcl-1, Nr12 y A1/Bfl-1) y promotores de la apoptosis (Bax, Bak Bok, Diva, Bcl-xs, Bik, Bim, Hrk, Nip3, Nix, Bad, Bid). Los miembros de esta familia guardan homología, tienen 4 áreas conservadas llamadas dominios BH (Bcl Homology): BH1, BH2, BH3, BH4. El dominio BH3 es crítico para la formación de dímeros con otros miembros de esta familia.

Daño mitocondrial por las proteínas Bcl-2 proapoptóticas

Los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 ocasionan la muerte celular al formar poros en la membrana externa y en ocasiones interna de las mitocondrias causando liberación de citocromo c al citoplasma, el cual activa, junto con Apaf-1 a la procaspasa 9 iniciando la vía intrínseca de la cascada apoptótica. La mayoría de los miembros de la familia Bcl-2 poseen en el extremo carboxiterminal dominios de anclaje que les permiten localizarse en la membrana externa de las mitocondrias, los miembros que carecen de estos dominios (Bad, Bid) pueden migrar a las mitocondrias al formar heterodímeros con miembros que poseen estos dominios.

Proteínas Bcl-2 antiapoptóticas

Las principales proteínas son Bcl-2 y Bcl-xL. Bcl-2 es el homólogo a CED 9 en el nematodo, pueden unirse a Apaf-1 evitando la activación de la caspasa 9, tienen también acción mitocondrial, previniendo la permeabilización mitocondrial y la liberación de citocromo c.

Antídotos de la apoptosis y anti-antídotos

Existen proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP). En mamíferos existe un inhibidor de los IAP llamado Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) o DIABLO (Direct IAP-binding protein with low pI), Smac/Diablo se unen a IAP y neutralizan su acción antiapoptótica, son proteínas mitocondriales e inducen la muerte celular.

Aunque se conoce que la apoptosis o su inhibición participa en la patogénesis y la sintomatología de diferentes enfermedades todavía queda un campo amplio de investigación para poder obtener un conocimiento más profundo. Deben desarrollarse técnicas que permitan una medición cuantitativa de la apoptosis. Una mejor comprensión de los activadores de la apoptosis y de las moléculas inhibidoras así como el estudio de las bases moleculares y de las señales de transducción pueden facilitar el desarrollo de agentes terapéuticos como inhibidores de las caspasas para tratar las diversas enfermedades relacionadas con la apoptosis.

Referencias

1. Pothana Saikumar, PhD, Zheng Dong, PhD, Valery Mikhailov, et al. Apoptosis: Definition, mechanisms, and Relevance to Disease. The American Journal of Medicine 1999;107: 489-505
2. Michael O. Hengartner. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000 October 12;407: 770-776
3. Marcel Leist and Masrja Jäättela. Four Deaths and a Funeral: From caspases to alternative mechanisms. Nature Reviews 2001;2:589-598
4. Steven W Hetts. To die or not to die. An Overview of apoptosis and its Role in Disease. JAMA 1998; 279-4: 300-307
5. Donald W. Nicholson. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature 2000; 407: 810-816



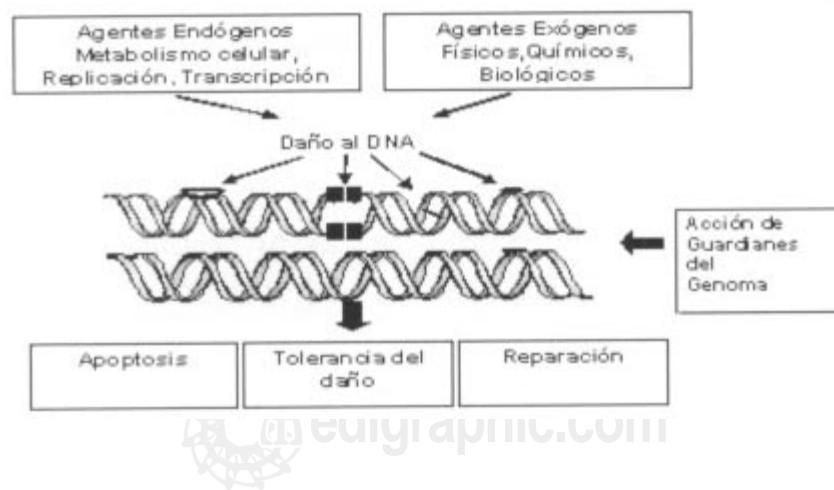
III. Guardianes del Genoma Humano

Sara Frías*

El genoma, representado por el DNA que se encuentra en el núcleo celular y las mitocondrias, es el patrimonio genético de cada individuo. Aunque el DNA es altamente estable como lo requiere la molécula de la herencia, es susceptible de dañarse de manera espontánea, por los procesos normales intrínsecos de la célula como la respiración que puede producir radicales libres, o por las funciones propias del DNA como transcripción, y replicación que por sí mismas pueden introducir errores y daño a los ácidos nucleicos, o bien por exposición a agentes extrínsecos como radiación o agentes químicos, que generan una variedad de lesiones al DNA. Estas lesiones incluyen errores de apareamiento, formación de uniones covalentes entre dos bases adyacentes, como dímeros de pirimidinas, formación de aductos, intercalaciones químicas en la doble hélice o bien rupturas de cadena sencilla o doble. Cualquiera de estas lesiones pueden afectar de manera letal a la célula, por lo que deben ser reparadas para no morir. Sin embargo es posible que el daño no letal pueda tener mayor repercusión en el organismo debido a que en caso de no detectar el daño no letal, o bien el detectar el daño y tolerarlo, puede conducir a una célula hacia el desarrollo de cáncer, lo cual puede en un momento dado ser letal no para la célula sino para el organismo completo. Es por estas razones, que la evolución ha invertido una gran cantidad de genes que están dedicados a mantener la integridad genómica celular.^{1,2}

Existe un grupo de genes dedicados a la vigilancia genómica, que se encargan de detectar el daño al DNA, una vez censado el daño y dependiendo de su tipo y magnitud, estos genes pueden hacer que las células tomen una decisión de entre varias posibilidades: a) Suicidio celular b) Tolerancia del daño c) Reparación del daño. Cada uno de estos procesos se utiliza para poner a salvo a la célula o al organismo completo.

En el primer caso, la célula tiene tal cantidad de daño que no es posible repararlo y entonces opta por la opción de muerte celular programada o apoptosis, con lo cual la célula con daño desaparece. En el caso de que la célula encuentre en su DNA daño que puede ser tolerado, simplemente la maquinaria de replicación ignora el daño y continúa formando las hebras hijas de DNA, pero introduciendo errores que pueden ser mutaciones acumulativas y dañinas de manera mediata. Por último, cuando la célula toma el camino de la reparación del DNA, existen varios mecanismos de reparación que dejan prácticamente normal a la célula: pueden reemplazar una base mal apareada (mecanismo MMR), escindir un segmento de hebra de DNA (mecanismo NER) o una sola base (mecanismo BER), o bien realizar recombinación para reparación. La mayor parte de las veces, la reparación es la respuesta elegida, con lo cual el organismo normal puede defenderse exitosamente de todas las injurias a su DNA, tanto intrínsecas como extrínsecas y esto permite que un humano viva un promedio de 70 años realizando millones de divisiones celulares por día.²



* Instituto Nacional de Pediatría

Cuadro I. Genes del tipo guardianes del genoma estudiados a nivel molecular

Enfermedad	Número probable de genes	Genes identificados	Proceso molecular
Ataxia telangiectasia	1	ATM	Respuesta al daño al DNA
Síndrome de Bloom	1	BLM	Desenrollamiento del DNA (repar/replic/recomb)
Síndrome de Werner	1	WRN	Desenrollamiento del DNA (repar/replic/recomb)
Xeroderma Pigmentosum	7	XPA-XPG	Reparación por excisión del DNA (NER)
Anemia de Fanconi	8	FANCA-FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE-FANCG	?
Cáncer colorrectal hereditario (HNPCC)	5	MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, PMS2	Reparación de bases mal apareadas (MMR)
Cáncer hereditario mama/ovario	2	BRCA1, BRCA2	Respuesta/reparación de daño al DNA

Para realizar cualquiera de estos procesos de reparación se requiere un gran número de genes, muchos de ellos aún desconocidos que pertenecen también a los guardianes del genoma y que se han podido reconocer debido a que su deficiencia causa enfermedad. Existe un grupo de síndromes que se les conoce en conjunto como Síndromes de Inestabilidad Cromosómica o Genómica (SIC), que se caracterizan por presentar una alta frecuencia de alteraciones a nivel de rupturas o rearreglos cromosómicos o mutaciones, así como una elevada predisposición a cáncer que en algunos casos puede ser hasta 1000 veces mayor que la frecuencia de la población normal; los SIC son enfermedades monogénicas que comparten con el cáncer la característica de inestabilidad genómica.^{1,2}

Por otra parte, se han encontrado alrededor de veinte tipos de cáncer que tienen un evidente componente hereditario y en los que el gen alterado confiere predisposición y la enfermedad se manifiesta sólo cuando se han acumulado varias mutaciones diferentes a nivel somático; la adquisición de varias mutaciones somáticas precisas se puede explicar a través de la existencia de Inestabilidad Genética, que se ha reconocido como una característica cardinal de neoplasia y que se atribuye a mutaciones en genes de vigilancia de la integridad genómica, como aquéllos de los SIC o como los del cáncer colorrectal no polipósico (genes MSH, MLH, PMS) y cáncer de mama/ovario (genes BRCA1 y 2), los cuales al estar alterados generan en las células un fenotipo mutador que acumula daño al DNA. Esta inestabilidad genómica precede a la alteración de oncogenes y/o genes supresores de tumor tipo portero ("gatekeeper") que

desencadenan alteraciones en el ciclo celular y/o apoptosis que lleva a la transformación celular y la neoplasia.^{1,4}

Algunos de los genes guardianes del genoma que se han estudiado y los procesos moleculares en los que están involucrados se observan en el cuadro I.¹⁻⁵

La identificación de los genes involucrados en las vías celulares de los SIC, los mecanismos de su actividad y las interacciones con otras vías celulares, actualmente tienen un importante impacto sobre la comprensión de los mecanismos celulares normales y particularmente con aquéllos relacionados con la tumorigénesis.⁵ Adicionalmente, aunque los SIC (homocigotos) tienen una baja incidencia, los heterocigotos en conjunto pueden representar hasta el 10% de la población normal y no se conoce el riesgo de portar uno de estos genes, aunque existen datos que apuntan a que pueden tener elevada susceptibilidad a agentes ambientales y predisposición a cáncer.

Referencias

1. Cahil DP, Lengauer C. Tumor genome instability. En: Scriver B, Ed. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. McGraw Hill, 8a. Ed. N. Y, 2001. pp 611-612
2. Friedberg, E. DNA repair. Nature, 421:436-440, 2003.
3. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. Nat Rev Genet 2:446-457, 2001.
4. Joeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411:366-444, 2001.
5. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nature Rev 3:155-168, 2003.

IV. Estrategias para la investigación de enfermedad residual en leucemia aguda

Alejandro Ruiz-Argüelles*

Se define como enfermedad residual a la masa tumoral detectable en un paciente que ha sido sujeto a un esquema completo de terapia anti-neoplásica. El término enfermedad mínima residual se emplea como un sinónimo, que si bien puede reflejar el optimismo del médico tratante, en muchas ocasiones es muy impreciso en cuanto a la cantidad de masa tumoral restante. En aquellos pacientes en que el tratamiento no reduce importantemente la masa tumoral, la microscopía experta de un extendido de médula ósea es suficiente para detectar la enfermedad residual, y no hay necesidad de emplear métodos más sofisticados y costosos. Sin embargo, en los casos en que la enfermedad residual realmente es mínima, es menester disponer de métodos cuya sensibilidad permita discriminar unas pocas células neoplásicas entre varios miles de células normales.

Una de las interrogantes más controversiales en esta materia es el número de células neoplásicas que debemos poder detectar, pues tampoco es claro cuál es el número de células neoplásicas residuales que permite definir la suspensión o la continuación de la terapia anti-tumoral. Aunque no es un consenso universal, muchos autores coinciden en afirmar que en un paciente con leucemia aguda que tiene 1 o más células malignas por cada 1,000 células hematopoyéticas normales en la médula ósea, la recidiva de la neoplasia es casi segura; cuando la frecuencia de células neoplásicas es aún mayor de 1 en 10,000, la recidiva es todavía probable; pero cuando la cantidad de células malignas es menor a esta última cifra, la probabilidad de recidiva es prácticamente nula. Parece lógico suponer entonces que la sensibilidad deseada de los métodos para la detección de enfermedad residual, debe ser la necesaria y suficiente para poder distinguir a los pacientes en riesgo de recidiva, de aquellos que no tienen este riesgo. En la actualidad, existen diversos métodos que, aislados o en combinación, permiten la discriminación inequívoca de 1 célula neoplásica entre 10,000 células normales. Se enlistan a continuación:

1. Citometría de flujo multiparamétrica (CMF).
2. Detección de traslocaciones.
 - Hibridación con sondas fluorescentes (FISH).
 - Retrotranscripción/Amplificación (RT/PCR).
3. Detección de rearreglos IgH o TcR.
4. Combinaciones de CMF/FISH/PCR.

Inmunofenotipo. La citometría de flujo multiparamétrica se fundamenta en la detección de perfiles antigenicos aberrantes que permitan distinguir células neoplásicas. Es menester enfatizar que la selección de anticuerpos, las mezclas de los mismos, el número y combinaciones de parámetros que se detectan en cada célula, y las estrategias de adquisición de datos, son factores cruciales dado que en las muestras de médula ósea se encuentran normalmente elementos celulares de distintas líneas y en diversas etapas de maduración, que pueden fácilmente confundirse con células malignas. El abordaje más confiable para distinguir a las células neoplásicas de los precursores normales en maduración -hematogonias, como las llama Ricardo E. Duque- es utilizando mezclas de anticuerpos que permitan seguir el patrón de maduración normal en la expresión de antígenos de cada una de las líneas celulares hematopoyéticas. Aun utilizando estos recursos, en ocasiones es muy difícil definir con certeza el origen neoplásico de algunas células, por lo que se hace necesario recurrir a estrategias adicionales para confirmarlo.

Traslocaciones balanceadas. Existen algunas traslocaciones que se encuentran con frecuencia variable asociadas a ciertas neoplasias oncohematológicas. Se enlistan las más frecuentes:

Quimerismo	Padecimiento asociado
IgH/MYC/CEP8	L. Linfoblástica, L. No-Hodgkin, Burkitt
AML1/ETO	L. Mieloide M2
BCR/ABL p190	L. Linfoblástica
BCR/ABL p210	L. Granulocítica crónica
MLL	L. Agudas (10%)
TEL/AML1	L. Linfoblástica en niños
Bcl2/IgH	Linf. Centrofolicular
PML/RAR α	L. Promielocítica
CBFB/MYH11	L. Mielomonocítica

Estas alteraciones pueden detectarse mediante retrotranscripción y amplificación de ADN (RT/PCR) o por hibridación fluorescente *in situ* (FISH). El método de RT/PCR es notablemente más sensible que el de FISH (10^{-5} y 10^{-2} , respectivamente), pero también es más laborioso, más

* Departamento de Inmunología, Laboratorios Clínicos de Puebla, Puebla, México.

costoso y requiere de instalaciones y adiestramiento especiales. Por ello, la técnica de RT/PCR suele preferirse para la detección de enfermedad residual, en tanto que la de FISH encuentra más utilidad para detectar la traslocación en el momento del diagnóstico, cuando la masa tumoral es abundante. Un abordaje muy lógico y altamente recomendable es demostrar la traslocación por FISH antes de iniciar el tratamiento, pues entre otras cosas el método permite la investigación de diversas traslocaciones en un mismo extendido celular, y relegar la técnica de RT/PCR para hacer el seguimiento de cada caso, investigando específicamente aquella traslocación que de inicio se demostró por FISH.

Los rearreglos de los genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgH) o del receptor de las células T (TcR), se presentan primordialmente en las leucemias linfoblásticas. Su detección se realiza por RT/PCR y su sensibilidad es relativamente pobre (10^{-3}).

En nuestro laboratorio, Reyes-Núñez y Garcés-Eisele, diseñaron y desarrollaron un método para aumentar la sensibilidad de la detección de rearreglos de IgH o TcR, consistente en la construcción de una sonda de ADN complementaria al rearreglo de cada paciente, que permite su detección por hibridación en membranas de nitrocelulosa. Este abordaje incrementa la sensibilidad en 1 o 2 logaritmos, amén de que permite cuantificar la enfermedad residual en cada paciente.

La combinación de FISH con CMF es un nuevo abordaje que estamos probando actualmente en nuestro laboratorio. El método implica la demostración de una traslocación al momento del diagnóstico, lo que rutinariamente estamos realizando por el método de FISH, además del establecimiento del inmunofenotipo con diversas combinaciones de anticuerpos. Terminado el esquema de tratamiento, las células neoplásicas se identifican mediante su perfil inmunológico y, cuando su frecuencia es menor de 10^{-4} , éstas son purificadas por selección individual electromagnética directamente en portaobjetos, para investigar la traslocación por el método de FISH. Los resultados preliminares son muy alentadores y cumplen cabalmente el requisito de sensibilidad antes mencionados (10^{-4} a 10^{-5}).

Es del todo insostenible ya la rivalidad entre los métodos inmunológicos y las técnicas moleculares para la detección de enfermedad residual en leucemia. La combinación de ambas categorías de métodos ofrece, sin lugar a dudas, mejores resultados que el empleo aislado de cada una de ellas. Los laboratorios involucrados en el seguimiento de pacientes con leucemia deben aceptar esta realidad y equiparse, tanto técnica como profesionalmente, para ofrecer la información más útil para médicos y pacientes.

Referencias

1. Pine SR, Moy FH, Weimels JL, Gill RK, Levendoglu-Tugal O, Ozkaynak MF, Sandoval C, Javabose S. Real-Time Quantitative PCR: Standardized detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25:103-8.
2. Bjorklund E, Mazur J, Soderhall S, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2003;17:138-48.
3. Munoz L, Nomdedeu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM, Torres JP, Berlanga JJ, Fernandez C, Llorente A, Queipo De Llano MP, Sanchez JM, Brunet S, Sierra J. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia*. 2003;17:76-82.
4. Krampera M, Vitale A, Vincenzi C, Perbellini O, Guarini A, Annino L, Todeschini G, Camera A, Fabbiano F, Fioritoni G, Nobile F, Szydlo R, Mandelli F, Foa R, Pizollo G. Outcome prediction by immunophenotypic minimal residual disease detection in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;120:74-9.
5. Ravindranath Y. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2003;15:23-35.
6. Maloum K, Sutton L, Baudet S, Laurent C, Bonnemye P, Magnac C, Merle-Beral H. Novel flow-cytometric analysis based on BCD5+ subpopulations for the evaluation of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002;119:970-5.
7. 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. *Clinical Chemistry* 1999; 45: 1708-1717.
8. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Ruiz-Argüelles A. Molecular follow-up of patients with promyelocytic leukemia treated with all trans-retinoic acid. *Clin Lab Hematol* 1998; 20: 173-176.
9. Orfao A, Ruiz-Argüelles A. General concepts about cell sorting techniques. *Clinical Biochem* 1996; 29: 5-9.
10. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Perez-Romano B, Ruiz-Argüelles A, Ramirez-Cisneros FJ, Lopez-Martinez B, Lopez-Tapia D, Rivadeneyra-Espinoza L. Assessment of residual disease in acute leukemia by means of polymerase chain reaction. *Rev Invest Clin (Mex)* 2000; 52: 118-124.
11. Ruiz-Argüelles A, Duque RE, Orfao A. Report on the first Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of leukemia. *Cytometry* 1998; 34: 39-42.
12. Ruiz-Argüelles A. La citología moderna en el laboratorio de hematología. *Gac Med Mex* 2002;138:155-159.
13. San Miguel JF, Orfao A, Ruiz-Argüelles A. Identificación y vigilancia de enfermedad residual mínima en leucemia aguda. En Ruiz-Argüelles GJ y San-Miguel JF (Editores). Actualización en Leucemia. Editorial Médica Panamericana. Ciudad de México. 1996. PP. 65-70.

V. Identificación y cinética de blastos en líquido cefalorraquídeo mediante citometría de flujo

Josefa Piedras-Ross

Al diagnóstico, menos del 10% de los pacientes adultos con leucemia aguda linfoblástica (LAL) tienen infiltración leucémica al sistema nervioso central (SNC), y aproximadamente el 30% de los pacientes desarrollarán esta complicación durante el curso de la enfermedad. El diagnóstico de leucemia en el SNC tiene significado pronóstico y se establece por la identificación de blastos en el líquido cefalorraquídeo (LCR).¹ La identificación de los blastos mediante el estudio citomorfológico (CM) del LCR sigue siendo el "estándar de oro" para el diagnóstico de leucemia en el SNC. Recientemente, aprovechando que la citometría de flujo (CF) permite el análisis de un mayor número de células, se ha empleado para aumentar la exactitud del diagnóstico CM.^{2,3,4} Los estudios realizados por Redner et al² y por Subirá et al³ fueron los pioneros en CF. Estos autores encontraron buena concordancia en la identificación de blastos mediante CM y CF, y basados en que la CF constituye un método más sensible y rápido los recomendaron para el estudio del LCR de cualquier paciente leucémico empleando ambos métodos.

En el Departamento de Hematología y Oncología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S. Z. se comparó la eficiencia entre el tradicional análisis CM y la CF para establecer el diagnóstico de leucemia en el SNC, y además se analizó la cinética de los blastos y de las subpoblaciones de células no malignas CD4 y CD8 durante la quimioterapia intratecal (QTIT) en las muestras seriadas de tres pacientes con infiltración leucémica en el SNC.

Se colectaron 75 muestras de LCR de 31 pacientes con LAL; 16 mujeres (53.3%) y 15 hombres (46.7%). Por inmunofenotipo, 25 pacientes se clasificaron como LAL de estirpe B (80.6%), 5 de estirpe T (16.1%) y en un paciente no se realizó inmunofenotipo. La media de edad fue de 30.5±12.43 años (intervalo 16 a 62 años). De cada una de las punciones lumbares se obtuvo una muestra de LCR previo a la aplicación de la QTIT para el estudio CM, citoquímico, CF y la cuantificación de ferritina y de beta 2 microglobulina. El análisis CM (realizado por 3 hematólogos) se clasificó en: positivo (leucocitos en el LCR >5/µL y presencia de blastos en el citocentrífugado); indeterminado (leucocitos <5/µL y presencia de blastos); negativo (ausencia de blastos) y traumático (presencia de eritrocitos).⁵ En ninguna muestra hubo divergencia

entre los 3 observadores, y el resultado definitivo fue aquél en el que coincidieron por lo menos 2 de los 3 observadores. Las muestras clasificadas como indeterminadas por 2 observadores se consideraron positivas en el análisis final, ya que se ha demostrado que la evolución clínica de los pacientes con leucocitos <5/µL en el LCR es similar a aquélla en quienes el diagnóstico de infiltración se establece con los criterios del consenso de Roma.^{6,1} Para la CF se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales: control de isotipo (FITC/PE), CD4FITC/CD8PE, CD10FITC/CD34PE y CD5FITC/CD19PE.

De las 75 muestras iniciales se eliminaron 7: cinco por muestra insuficiente y 2 por punción traumática. De las 68 muestras de LCR hubo concordancia entre los métodos CM y CF en 61 muestras (90%): 55 negativas y 6 positivas; en 4 muestras se obtuvo resultado CM positivo y negativo por CF y en 3 muestras, la CF fue positiva y la CM negativa. Las 13 muestras positivas por ambos o por cualesquiera de los dos métodos provenían de 6 pacientes (Cuadro I), de los cuales el 1, 2, 3 y 4 tuvieron síntomas neurológicos. Los pacientes con resultado CM

Cuadro I. Resultado del análisis citomorfológico (CM) y de citometría de flujo (CF), en el LCR de 6 pacientes con LAL y quimioterapia intratecal (QTIT)

Paciente	días post QTIT	CF	CM	CD 10	CD10 /CD34	CD19	CD4
1	0	+	+	+	+	+	-
	1	+	+	+	+	+	-
	5	+	+	-	+	+	+
2	0	+	+	+	-	+	-
	7	+	+	+	-	+	-
3	0	+	+	+	-	+	-
	4	+	-	+	-	+	+
	7	+	-	+	-	+	+
	21	-	+	-	-	-	+
	28	-	+	-	-	-	+
4	245	-	+	-	-	-	+
	0	+	-	-	+	+	-
5	108	-	+	-	-	-	-

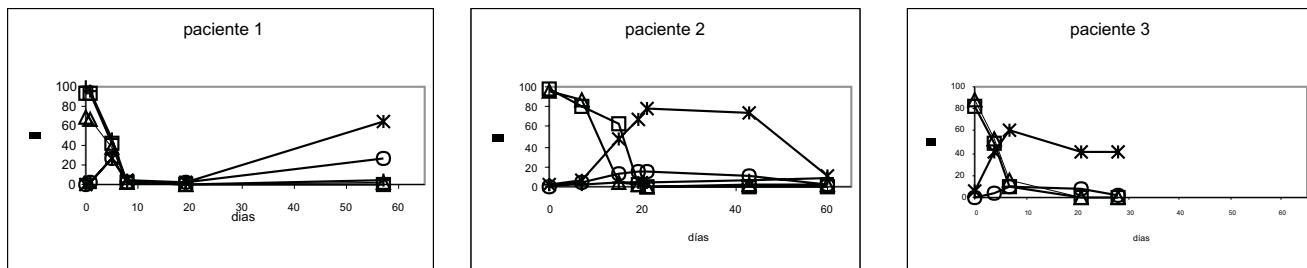


Figura1 . Cinética celular en tres pacientes con leucemia en el SNC. Porcentaje de células positivas para el CD10 (triángulos), CD19 (cuadrados), CD4 (asteriscos) y CD8 (círculos).

positivo se trataron con metotrexate (12.5mg) y arabinósido de citocina (80 mg) administrados intratecalmente 2 vez por semana hasta desaparición de los blastos en el LCR. Posteriormente la QTIT se administró semanalmente durante 2 meses y una vez por mes durante 6 meses. En los pacientes sin infiltración la QTIT se administró en las semanas 0, 1, 4, 5, 7, 9, 11, 25, 28 y 32 post-diagnóstico y posteriormente cada 3 meses durante los primeros 2 años de vigilancia.

Como se muestra en las gráficas de cinética celular (Figura 1), los blastos del paciente 1 (CD10+, CD19+ y CD34+) desaparecieron al día 19 y en los pacientes 2 y 3 las células leucémicas expresando los antígenos CD10 y CD19 ya no fueron detectadas en el día 21. Se observó un incremento de las células CD8+, y particularmente de las CD4+ concomitante con la disminución o desaparición de los blastos. El incremento fue transitorio en el paciente 1, permaneciendo aproximadamente 3 días para reaparecer el día 57; en el paciente 2 el aumento de las células CD4 fue evidente entre los días 15 y 43 disminuyendo al día 63, y en el paciente 3 las células CD4 empezaron a ascender al día 4 permaneciendo altas hasta el siguiente seguimiento al día 28. Analizando las 68 muestras se encontraron 16 (de 7 pacientes) con cifras elevadas de linfocitos-T CD4+ (>15%): cuatro pacientes (con 13 muestras) con resultado CM y/o de CF positivos y 3 pacientes (3 muestras) con resultados negativos de CM y CF.

En varios reportes encaminados al estudio de subpopulaciones de linfocitos en padecimientos que afectan al SNC (enfermedades inflamatorias y no inflamatorias, esclerosis múltiple, meningitis), otros que la leucemia, se ha demostrado que las células predominantes en el LCR son los linfocitos-T con fenotipo CD4.^{7,8} Así, parece que el enriquecimiento del LCR con células CD4 es un fenómeno no específico, presente no sólo en pacientes con enfermedad neurológica no maligna, sino también en aquéllos con leucemia en el SNC recibiendo quimioterapia intratecal. Se requieren más estudios para establecer el papel de los linfocitos-T CD4+ en el SNC de pacientes que sufren de enfermedades neurológicas de diferente etiología.

Con base en lo informado en la literatura y a nuestra experiencia concluimos: a) en las muestras de LCR la CF permite distinguir claramente los blastos de las subpopulaciones de células no malignas CD4 y CD8, b) el esquema de QTIT bisemanal aparentemente elimina a las células leucémicas del LCR en aproximadamente 3 semanas, c) concomitante con la desaparición de los blastos aumentan los linfocitos-T inmunorreguladores, particularmente los CD4+ y d) aun cuando la concordancia entre los métodos CM y de CF es buena, es necesario estudiar un mayor número de muestras positivas.

Referencias

1. Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A et al. Report and recommendations of the Rome Workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: Biologic bases for staging, stratification, and treatment. *Med Pediatr Oncol* 1986;14:191-4.
2. Redner A, Melamed M, Andreef M. Detection of central nervous system relapse in acute leukemia by multiparameter flow cytometry of DNA, RNA, and CALLA. *Ann N Y Acad Sci* 1986;468:241-55.
3. Subirá D, Castañón S, Román A. et al. Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukaemia. *Br J Haematol* 2001;112:381-4.
4. Abellán FP, de la Sen ML, Sánchez B, Rivas C, Calatayud R. Flow cytometry and the study of cerebrospinal fluid in leukaemic patients: additional facts. *Br J Haematol* 2002;116:725.
5. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14:18-24.
6. Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML et al. Low leucocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1993;329:314-9.
7. Oreja-Guevara C, Sindern E, Raulf-Heimsoth M, Malin JP. Analysis of lymphocyte subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood in patients with multiple sclerosis and inflammatory diseases of the nervous system. *Acta Neurol Scand* 1998;98:310-3.
8. Kleine TO, Albrecht J, Zofel P. Flow cytometry of cerebrospinal fluid (CSF) lymphocytes: alterations of blood/CSF ratios of lymphocyte subsets in inflammation disorders of human central nervous system (CNS). *Clin Chem Lab Med* 1999;37:231-41.

VI. Trastorno mieloproliferativo transitorio

Lina T. Romero-Guzmán*

El trastorno mieloproliferativo transitorio (TMT), es una enfermedad con muchas preguntas y pocas respuestas. El TMT (Mielopoyesis anormal transitoria, Leucopoyesis ineficaz, Leucemia transitoria, Reacción leucemoide transitoria), es un padecimiento que se ha observado, al nacimiento y durante las primeras semanas de vida, en aproximadamente 10% de los niños con Síndrome de Down (SD).¹ El cuadro clínico se caracteriza por la presencia de células anormales en la circulación (blastos), de naturaleza clonal,² morfológicamente idénticos a los que se observan en LA (usualmente de estirpe mieloide), lo que lo hace prácticamente indistinguible de una LA neonatal con la única diferencia de que el proceso remite espontáneamente sin tratamiento antileucémico en semanas o meses.³

No obstante que en la mayoría de los pacientes se produce remisión espontánea en los primeros tres meses de la vida lo que sugiere una condición transitoria benigna, también se han reportado casos en los cuales se ha desarrollado una forma severa potencialmente fatal de la enfermedad, caracterizada por hidropesía fetal, (derrame pleural, cardíaco y peritoneal), y fibrosis hepática y/o disfunción hepática, la que se ha asociado con una elevada mortalidad y porque se ha informado además el desarrollo de LAM en el 20 – 30 % de los niños con SD-TMT, meses o años después del periodo neonatal, fundamentalmente en aquellos pacientes que presentaban alteraciones citogenéticas adicionales al nacimiento.⁴

En general los niños con SD tienen un mayor riesgo a desarrollar LA que aquéllos sin esta enfermedad y los neonatos con SD tienen una mayor propensión a presentar TMT. Algunos autores han sugerido que no existe diferencia en la distribución de los tipos de LA en niños con y sin SD, ya que se ha observando que la forma predominante de leucemia en niños con SD antes de los tres años de edad es la LAM, mientras que la LAL predomina en niños mayores (preescolares o escolares). La variedad más frecuente de leucemia en la etapa neonatal en niños con SD es la Leucemia Aguda Megacarioblástica, aunque esta variedad de leucemia también suele observarse en niños sin SD en otras etapas de la vida, en forma similar al TMT que se presenta casi exclusivamente en la etapa neonatal y en donde las células frecuentemente involucradas expresan antígenos de la estirpe megacariocítica. En el cuadro I se pueden

observar los marcadores inmunológicos que han observado algunos autores.^{2,5-7}

Debe hacerse diagnóstico diferencial con otras enfermedades que pueden dar un cuadro hematológico parecido a TMT como síndrome de TORCH (toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus y herpes virus congénito), septicemia neonatal, sífilis congénita, isoinmunización materno fetal, neuroblastoma y leucemia congénita verdadera. Es importante recordar que recién nacidos fenotípicamente normales también han desarrollado TMT; en estos casos los pacientes han tenido ya sea mosaicismo de la trisomía 21 o el cariotipo trisómico ha estado limitado a las células hematopoyéticas de la médula ósea y sangre. Estos pacientes también suelen presentar remisión espontánea , aunque también pueden desarrollar subsecuentemente LA. Hiyashi y col. compararon los rasgos hematológicos, citogenéticos e inmunofenotípicos de pacientes con TMT-SD con los de aquéllos con LAM, los cuales se muestran en el cuadro II. Los rasgos distintivos de los pacientes con TMT fueron: Hemoglobina normal, plaquetas normales o ligeramente disminuidas, hiperleucocitosis y un menor porcentaje de blastos en médula ósea que en sangre periférica. Los pacientes con LAM tuvieron anomalías citogenéticas clonales, mientras que en los de TMT no se observó ninguna. Massey G. y col. describieron la historia natural de 48 niños con TMT-SD, al momento del diagnóstico, 12 (25%) se encontraban asintomáticos, 56% presentaron hepatomegalia y 44% esplenomegalia. Ocho pacientes (17%), presentaron muerte temprana seis de ellos por insuficiencia hepática y nueve (19%) desarrollaron LA; ocho de ellos LAM-M7 y uno LAL-PCB.⁸

Cuadro I. Síndrome de Down Rasgos Inmunofenotípicos

Svaldi, et al (2002)	CD7+	CD56+	CD33+
	CD34+	CD117+	MPOc -
Karandikar, et al (2002)	CD45+	CD38+	CD33+
	CD41+	CD61+	
Girodon, et al (2002)	CD45+	CD117+	CD56+
	CD41+	CD42+	CD61+
	CD13+	CD1a+	CD2+

*Jefe del Laboratorio de Hemato-Oncología. Instituto Nacional de Pediatría. ltrg1027@yahoo.com

Cuadro II**Síndrome de Down Rasgos hematológicos distintivos**

	Leucemia	n=13		TMT	n=15
Hb < 10g/dL	9/13	69%	Hb > 14.5 g/dL	15/15	100%
Plaquetas < 50 x 10 ⁹ /L	13/13	100%	Plaquetas > 95 x 10 ⁹ /L	13/15	87%
Rango 10 - 56 x 10 ⁹ /L			Rango 29 - 853 x 10 ⁹ /L		
Leucocitos < 50 x 10 ⁹ /L	13/13	100%	Leucocitos > 50 x 10 ⁹ /L	11/15	73%
Rango 3.4 - 40.6 x 10 ⁹ /L			Rango 26.8 - 248.6 x 10 ⁹ /L		
Blastos MO > SP	13/13	100%	Blastos MO < SP	15/15	100%

Síndrome de Down Rasgos citogenéticos e inmunofenotípicos distintivos					
	Leucemia			TMT	
SMD	11/13	85%	SMD	0/15	0%
Anormalidad clonal	13/13	100%	Anormalidad clonal	0/15	0%
Pseudodiploidía	7/13	54%	Desarrollo de anormalidad clonal a desarrollar LAM		
Hiperdiploidía	6/13	46%			
Blastos GpIIb/IIIa	9/12	75%	Blastos GpIIb/IIIa	9/11	82%

Hayashi Y, Eguchi M, Sugita K, et al. Blood 72:15-23, 1988.

No se conoce con certeza porqué el TMT está restringido casi exclusivamente a pacientes con SD pero algunas observaciones sugieren un vínculo muy estrecho con la presencia de trisomía 21. Algunas de estas observaciones en particular interesantes han sido la identificación de un subgrupo de pacientes con mosaicismo a SD, en los cuales la clona leucémica afectaba exclusivamente a las células con la trisomía 21 y de un subgrupo de pacientes con fenotipos normales y TMT, en quienes la trisomía 21 se identificaba sólo en las clonas leucémicas. Es importante destacar también el hecho de que la desaparición del TMT se acompañaba con la desaparición de la trisomía 21 en las células afectadas. La interrogante sobre si el riesgo de padecer TMT o la mayor propensión a desarrollar LAM es simplemente el resultado del incremento de la dosis génica (trisomía 21) o es el resultado de una homocigosidad disómica uniparental (herencia de dos genes supresores de tumores mutados) debido a la no disyunción de los cromosomas paternos por un error ya sea en la segunda meiosis o en etapa temprana de la mitosis postcigótica no se conoce, aunque es fuerte la evidencia actual a favor de la transmisión de un gen mutado. En un análisis reciente de 20 pacientes con TMT Niikawa y col. presentaron evidencia de homocigosidad disómica uniparental en 9 casos correspondiendo la duplicación del cromosoma 21, en siete casos a la madre y en dos al padre y postularon en base a estos hallazgos que el gen putativo del TMT se localiza en la región 21q11.2.⁹ Otros autores han propuesto la región 21 q 22.1-22.2 (un área

que se cree involucrada en el fenotipo de SD) en donde se localiza el gen AML-1 involucrado en diversos tipos de LAM fundamentalmente el asociado a translocación t(8;21), pero también en la translocación t(3;21) y la translocación t(16;21), el gen de un trastorno plaquetario funcional familiar parecido al producido por aspirina con propensión a desarrollar LAM, el receptor a / b del interferón, una familia de receptores de citosina y otros genes que regulan la hematopoyesis pero de manera especial la megacariocitopoyesis. No se conoce el tipo de relación existente entre algunos de los rasgos biológicos del TMT/ LAM-M7 (por ejemplo, actividad de telomerasa, fenotipo megacariocítico, mutación de p53, fibrosis hepática vinculada a factor de crecimiento transformante b o factor de crecimiento derivado de plaquetas b , expresión de genes eritroides específicos de la g globina y la d amino levulasa sintetasa) y la lista actual de genes localizados en el cromosoma 21.¹⁰

En años recientes otros hallazgos importantes, útiles en el diagnóstico diferencial de TMT y LAM-M7 han sido, la ausencia de mutación en el gen supresor de tumor p53 en TMT y la adquisición de mutaciones en el gen, durante la transición a LAM-M7 y la ausencia de telomerasa en TMT, la cual se encuentra elevada en más de la mitad de los pacientes con LAM-M7.

Las técnicas de detección de enfermedad residual mínima podrían facilitar el estudio del fenómeno de regresión del TMT y la progresión potencial o "recurrencia" a LAM-M7. Un monitoreo de muestras de sangre periférica o médula ósea de pacientes con TMT-SD por citometría

de flujo si la clona leucémica permanece detectable. Con el advenimiento de nueva tecnología de laboratorio, detección molecular y con los primeros agentes que identifican las proteínas alteradas involucradas en la proliferación incontrolada, la elucidación del mecanismo del TMT podría conocerse mejor en el futuro.¹¹

Referencias

1. Siebel NL, Sommer A, Miser J. Transient neonatal leukemoid reactions in mosaic trisomy 21. *J Pediatr* 1984; 104:251-54.
2. Brissette MD, Duval-Arnould BJ, Gordon BG, Cotelingam JD. Acute megakaryoblastic leukemia following transient myeloproliferative disorder in a patient without Down syndrome. *Am J Hematol* 1994;47:316-19.
3. Kurahashi H, Hara J, Yumura-Yagi Y et al. Monoclonal nature of transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome. *Blood* 1991;77:1161-63.
4. Hayashi Y, Eguchi M, Sugita K, et al. Cytogenetic findings and clinical features in acute leukemia and transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome. *Blood* 1988;72:15-23.
5. Girodon F, Favre B, Couillaud G, Carli PM, Parmeland C, Maynadie M. Immunophenotype of transient myeloproliferative disorder in a newborn with trisomy 21. *Cytometry* 2000; 42:118-22.
6. Svaldi M, Moroder W, Messner H, et al. Transient myeloproliferative disorder with a CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor phenotype in a new born. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:394-6.
7. Karandikar NJ, Aquino DB, McKenna RW, Kroft SH. Transient myeloproliferative disorder and acute myeloid leukemia in Down syndrome. An immunophenotypic analysis. *Am J Clin Pathol* 2001;116:204-10.
8. Masey G, Zipursky , Doyle JJ, et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Blood* 2002;100:87a.
9. Gamis AS, Hilden JM. Transient myeloproliferative disorder, a disorder with too few data and many unanswered questions: Does it contain an important piece of the puzzle to understanding hematopoiesis and acute myelogenous leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:2-5.
10. Niikawa N, Deng HX, Abe K, et al. Possible mapping of the gene for transient myeloproliferative syndrome at 21q11.2 *Human Genetics* 1991;561-66.
11. Taub JW, Ravindranath Y. Down syndrome and transient myeloproliferative disorder: Why is it transient? *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:6-8.

VII. Alteraciones Citogenéticas en Síndromes Mielodisplásicos (SMD)

Rosa María Arana-Trejo*

En aproximadamente 50% de los casos con SMD primario se observan alteraciones cromosómicas que pueden ser aneuploidías con pérdida o ganancia de cromosomas específicos o bien rearreglos estructurales variados como delecciones, translocaciones e isocromosomas.¹ Las alteraciones cromosómicas simples suelen presentarse en SMD primarios, mientras que los secundarios suelen tener cariotipos complejos con múltiples anomalidades². La incidencia de alteraciones cromosómicas observada en la población adulta atendida en nuestro Servicio es de 40% sólo para los SMD de novo³. En el sistema de estratificación pronóstico internacional (IPSS) los subgrupos establecidos por citogenética tienen un alto impacto en la supervivencia y progresión de la enfermedad. De tal forma que la aparición de alteraciones cromosómicas secundarias durante el seguimiento es indicio de evolución del SMD o transformación leucémica.^{2,4}

Las delecciones simples son las alteraciones cromosómicas más frecuentes en SMD primarios generalmente son parciales (intersticiales) y en poca frecuencia o

rara vez pueden ser de brazos completos. La del(5q) es la más frecuente observándose en 10-15% de los SMD de novo y en 50% de los secundarios. Nosotros observamos una incidencia de 14% sólo para la delección, sin embargo hemos observado varios casos con translocaciones de 5q en SMD secundarios a tumores sólidos (datos no reportados). Este marcador se asocia con factores clínico-hematológicos característicos como anemia macrocítica, diseritropoyesis, megacariocitos hipolobulados y cifras normales o aumentadas de plaquetas. La clasificación WHO considera a este síndrome 5q- como una entidad separada del resto de las anemias refractarias por su pronóstico que es relativamente bueno de curso clínico crónico y una muy rara evolución a leucemia aguda.^{1,2,4}

La del(5q) no está limitada al Síndrome 5q-, también se encuentra en la AREB-t y en los SMD secundarios a radioterapia o agentes alquilantes. En estos casos generalmente está acompañada de translocaciones balanceadas o incluso puede haber pérdida completa del

* Genética, Hospital General de México y Facultad de Medicina, UNAM. México D.F. aranat@prodigy.net.mx

cromosoma (monosomía 5). Un 5q- en un cariotipo complejo es asociado con mal pronóstico. Los puntos de ruptura en 5q son altamente variables siendo dos los principales: uno en 5q31-q33 y otro en 5q21 que ha sido reportado en algunos casos de síndrome 5q-. Los genes que se han observado en 5q31 incluyen las interleucinas 3,4,5 y 9, el factor 1 de respuesta al interferón, el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago, el receptor 4 para el factor estimulador de colonias, un gen de respuesta al crecimiento (EGR1) que es un posible factor de transcripción homólogo al gen tumor supresor WT1.^{1,2,4,5}

La delección parcial o completa del cromosoma 7 [7q-/7] está asociada consistentemente con SMD o LAM secundarios a radioterapia y/o quimioterapia por linfoma o tumor sólido. Algunos casos pueden ser translocaciones como la t(1;7)(q10;p10) o inversiones inv(7)(q22q34) observada en SMD secundarios. El significado biológico de la monosomía 7 no está totalmente definido, pero es un marcador de mal pronóstico en adultos y se asocia con severas complicaciones infecciosas al parecer ocasionado por una alteración en la quimiotaxis. Los puntos de ruptura en la delección abarcan una región muy grande de q22 a q33, donde se han mapeado los genes de eritropoyetina y del activador 1 de plasminógeno. Algunos reportes han sugerido que son dos las regiones de ruptura definidas una en 7q22 en un segmento de 2MB (megabases) y la otra más telomérica en 7q32-33.^{2,4,6}

La del(17p) o el isocromosoma (17q) en SMD son frecuentemente asociado con disgranulopoyesis, núcleos hipolobulados con pseudo-Pelger-Huet y pequeñas vacuolas en el citoplasma de los neutrófilos y el pronóstico es generalmente pobre. El evento molecular propuesto es la pérdida del gen p53 en 17p13 como consecuencia del rearreglo cromosómico.^{2,4}

Las alteraciones estructurales del cromosoma 3 son comunes en SMD a menudo anemia refractaria con exceso de blastos y se han reportado inv(3), t(1;3), t(3;21) principalmente. Estos rearreglos tienen diferentes puntos de ruptura en el cromosoma 3 pero el blanco común es el gen EVI en 3q26. La del(20q) es un cambio recurrente en

SMD con una incidencia de 20% y se asocia con buen pronóstico. Generalmente es observada en anemia refractaria, aunque no es exclusivo de SMD se detecta también en policitemia vera.^{1,2,4}

La trisomía 8 es un cambio inespecífico frecuentemente observado en SMD se asocia con un curso clínico variado que puede ir desde una rápida evolución a leucemia aguda o la completa desaparición de la clona anormal. Otras alteraciones menos frecuentes son la del(13q), del(11q), los rearreglos de 1q a menudo translocaciones y cambios numéricos inespecíficos como hipo e hiperdiploidías que generalmente son catalogados como inestabilidad cromosómica. Existen diversas alteraciones a nivel molecular como son las mutaciones en RAS, inactivación de p53 e incluso cambios en la metilación de genes reguladores del ciclo celular que también contribuyen con el fenotipo neoplásico y que algunos pueden ser consecuencia o estar asociados con las alteraciones cromosómicas.^{2,4}

Referencias

1. Shuetz T, Stone R. Myelodysplastic syndromes. En Molecular Haematology. Provan D, Gribben J. Editors. Blackwell Science Ltd. Oxford; 2000. pp75-83.
2. Alessandrino E, Amadori S, Cazzola M, Locatelli F, Mecucci C, Morra E, Saglio G, Visan G, Tura S. Myelodysplastic syndromes: recent advances. Hematologica 2001; 86:1124-1157.
3. Ovilla R, Ignacio G, Rubio ME, Arana RM. Myelodysplastic syndrome (MDS) successfully treated with a combination of danazol and pentoxifylline. (#4868) Blood 96(suppl 1): 263b, 2000 (abstr).
4. Anderson J, Gilliland G, List A, de Witte T. Myelodysplastic syndrome. Hematology, ASH Education Program Book; 2000, 296-312.
5. Washington L, Doherty D, Glassman A, Martins J, Ibrahim S, Lai R. Myeloid disorders with deletion of 5q as the sole karyotypic abnormality: the clinical and pathologic spectrum. Leukemia Lymphoma, 2002; 43:761-765.
6. Pedersen BJ, Christiansen DH, Andersen MK, Skovby F. Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. Leukemia, 2002. 16:2177-2184



VIII. Hemostasia primaria

Guadalupe Montiel-Manzano*

La hemostasia es un sistema complejo que mantiene la sangre en estado líquido bajo condiciones fisiológicas, pero que ante una lesión vascular reacciona rápida, potente y reguladamente formando el coágulo exclusivamente en el sitio afectado, evitando así la hemorragia sin que el coágulo se disemine del lugar donde es necesario.

La formación del coágulo se divide en dos etapas; la hemostasia primaria o vascular-plaquetaria y la hemostasia secundaria o plasmática. El objetivo de la hemostasia primaria es formar un tapón hemostático inicial que está constituido principalmente por plaquetas activadas y agregadas. El objetivo de la hemostasia secundaria es generar suficiente trombina para convertir al fibrinógeno en fibrina para formar el coágulo.¹ Las pruebas de laboratorio que evalúan la hemostasia primaria son el tiempo de hemorragia, cuenta de plaquetas, agregometría plaquetaria, actividad del cofactor de ristocetina, actividad de factor VIII (FVIII), cuantificación del antígeno del factor de von Willebrand (Ag:FvW) y la determinación de los multímeros del factor von Willebrand.

Tiempo de hemorragia. Fue introducida como prueba de la hemostasia primaria en 1910. Esta es la única prueba que mide *in vivo* la relación endotelio/plaqueta y refleja la capacidad hemostática plaquetaria². El tiempo de hemorragia es útil para detectar un defecto cualitativo ó cuantitativo de plaquetas y FvW. Existen varios métodos para medir el tiempo de hemorragia. El método tradicional es el de Ivy que consiste en hacer una pequeña incisión en el antebrazo ejerciendo una presión constante de 40 mmHg, absorbiendo con papel filtro el exceso de sangre cada 30 segundos. El tiempo de hemorragia es el tiempo que transcurre desde la incisión hasta el cese de la hemorragia. El límite normal de la prueba es de 9 minutos. En el método de Duke se incide en el lóbulo de la oreja; su valor normal es de 3 minutos. Otro método es el Template, una modificación del método de Ivy, en donde utiliza una lanceta estandarizada que realiza uno o dos cortes con una longitud y profundidad constante lo que hace más preciso el resultado. Algunos medicamentos pueden también afectar los resultados: antiplaquetarios, anticoagulantes, diuréticos, anti-inflamatorios, etc., de tal manera que es importante suspender estos medicamentos al menos 7 días antes del estudio para obtener un resultado confiable.

Cuenta de plaquetas. Se puede realizar manual o automatizadamente. En la primera se diluyen las plaquetas en oxalato de amonio al 1% y posteriormente se cuentan en la cámara de Neubauer por microscopia de contraste de fase, donde el frotis de sangre periférica es importante para analizar su morfología. La cuantificación automatizada se puede hacer en un contador electrónico de partículas. La cifra normal de plaquetas oscila entre 150-500x10⁹/L. El volumen plaquetario varía en forma inversa con la cuenta plaquetaria; el valor promedio oscila entre 8-12fL.³

Agregometría plaquetaria. La agregación plaquetaria es el proceso por el cual las plaquetas se unen unas con otras ante un estímulo físico ó químico para formar el coágulo. Este fenómeno depende de glicoproteínas de membrana, fibrinógeno, calcio, así como de agentes agregantes. La agregación se realiza en plasma rico en plaquetas (PRP) y sangre total por diversos métodos: 1) óptico, 2) impedancia, 3) luminiscencia y 4) flujo de calcio ionizado.

Método óptico. En 1962, Born diseñó un agregómetro utilizando un espectrofotómetro modificado adaptado a un registrador. La modificación consiste en incubación a 37°C y agitación constante del PRP. Posteriormente, se adiciona el agonista (ADP, colágena, ristocetina, trombina, etc.) y se registra el cambio en transmisión de luz al formarse el agregado de plaquetas, teniendo como referencia un plasma pobre en plaquetas (PPP).

Método de impedancia. En 1980 se describió este método que mide la agregación en sangre total. El principio es el paso de una pequeña corriente eléctrica entre dos electrodos. Al contacto inicial de la sangre con los electrodos se forma una monocapa de plaquetas; al adicionar el agonista se agregan las plaquetas y se incrementa la impedancia.⁴

Método de luminiscencia. Feinman desarrolló el luminagregómetro que mide agregación y liberación de ATP, simultáneamente. Utiliza la enzima luciferin-luciferasa (ATPasa). La luminiscencia es directamente proporcional a la concentración de ATP en los gránulos densos. Es muy útil en el diagnóstico de enfermedades por depósito en gránulos y en el síndrome de la plaqueta gris.⁵

Método de flujo de calcio ionizado. En 1985, Johnson describió este método que consiste en determinar la concentración de calcio intraplaquetario durante la activa-

* Laboratorio de Coagulación Especial. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

ción plaquetaria. Las plaquetas se incuban con dimetil sulfóxido, lo que permite que la enzima bio-luminiscente aequorin penetre a través de la membrana; al adicionar el agonista, las plaquetas emiten una luz que es directamente proporcional a la concentración de calcio intraplaquetario.⁶

Agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA). La ristocetina es un antibiótico que induce *in vitro* la unión del FvW a la glicoproteína Ib-IX (GP Ib/IX). Esta prueba utiliza PRP y ristocetina. La agregación está disminuida en el síndrome Bernard-Soulier (SBS) y en la mayoría de los subtipos de la EvW, excepto en el tipo 2B que se caracteriza por aumento en la respuesta a la ristocetina (hiperagregación), debida a una mayor afinidad del FvW a la GP Ib/IX.^{7,8}

Actividad del cofactor de ristocetina (FvW:RiCof). Refleja la actividad funcional (adhesiva) de la molécula del FvW. Se basa en la interacción del FvW plasmático y el receptor plaquetario GP Ib/IX. Esta prueba es similar a RIPA excepto que se utiliza PPP, una concentración estándar de ristocetina y plaquetas normales. Esta prue-

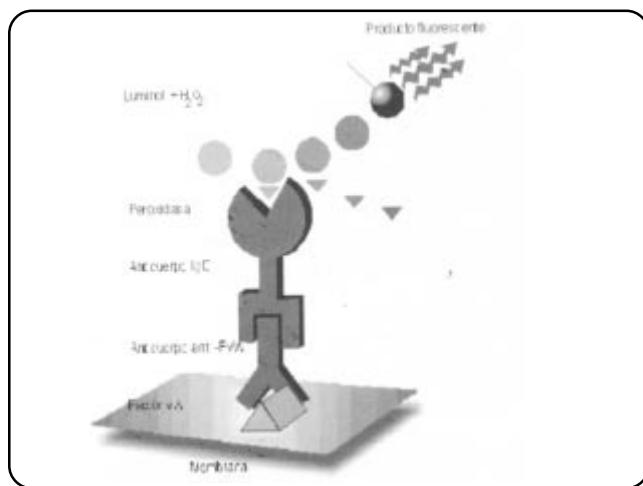


Figura 1.

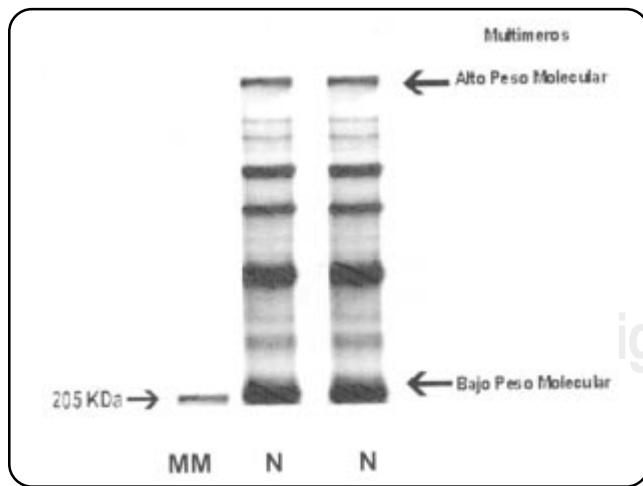


Figura 2.

ba es útil para diferenciar entre el SBS y la EvW por deficiencia de la GP Ib/IX y deficiencia del FvW respectivamente. En el SBS la actividad del cofactor es normal, debido a que el defecto está localizado en la plaqueta y no en el plasma como sucede en la EvW.^{7,8}

Actividad del factor VIII (FVIII:C). El método de una fase se basa en la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), en mezclas 1:1 del plasma deficiente en FVIII y plasma estándar o problema diluido. En estas condiciones el acortamiento del tiempo de coagulación (TTPa) es inversamente proporcional a la actividad del FVIII. El valor de referencia varía entre 50-150 U/dl. La actividad del FVIII está disminuida en pacientes con EvW, hemofilia e inhibir a factor VIII.⁹

Concentración del antígeno del factor von Willebrand (Ag:FvW). Puede ser medido por una variedad de métodos inmunológicos: ELISA, aglutinación en partículas de látex etc., se utiliza el anticuerpo anti-FvW específico para el Ag:FvW. El 80% de los pacientes con EvW tienen disminuido el Ag:FvW. En personas sanas con grupo sanguíneo O puede ser menor de 40 U/dl sin una tendencia hemorrágica. El Ag:FvW no se detecta en la EvW tipo 3.^{7,8}

Análisis de los multímeros del factor von Willebrand por Western Blot. Esta prueba se considera confirmatoria y permite clasificar los tipos de la EvW. El estudio de los multímeros del FvW, evalúa anomalías cualitativas y cuantitativas por inmunoelectroforesis. Sin embargo, es una metodología compleja de realizar. Primero se lleva a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida-agarosa con SDS (SDS-PAGE), posteriormente se procede a transferir los multímeros a la membrana de nitrocelulosa, se bloquea y se lava exhaustivamente. La membrana se incuba con el anticuerpo anti-FvW, después se incuba con el anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa. Finalmente, se revela por el sistema de quimioluminiscencia (Figura 1), analizando las bandas en el equipo STORM 860. La quimioluminiscencia presenta una sensibilidad similar a la radiactividad para detectar precisamente las diversas bandas, así como también nos permite cuantificar por densitometría las mismas. La positividad al FvW en sujetos sanos (N) se determina por la presencia de bandas de bajo y alto peso molecular y su ausencia se manifiesta en los diferentes tipos de la EvW^{7,8,10} (Figura 2).

Referencias

1. **Bithell TC.** The physiology of primary hemostasis. En Wintrobe's Clinical Hematology. 9^a ed. Lee GA, et al. Philadelphia. 1993.
2. **Batlie Fonrodona J, López Fernández MF.** Enfermedad de von Willebrand. Congénita y adquirida. En: Enciclopedia Iberoamericana de hemostasia y trombosis. España, 1992.
3. **Ruiz Argüelles GJ, Ruiz Reyes G.** Interpretación de la citometría hemática. En: Ruiz Argüelles GJ. Fundamentos de Hematología. Editorial Panamericana, 2001.

4. **Carol M.** Ingberman-Wojenski. Simultaneous measurement of platelet aggregation and the release reaction in platelet-rich plasma and in whole blood. *Journal of Medical Technology*. 1984; 1:697-701.
5. **Feinman RD, Lubowsky J, Caro IF, et al.** The lumi-aggregometer: A new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation. *J Lab Clin Med*. 1977;90:125-9.
6. **Peter C. Johnson, J. Anthony Ware, Paul B. Cliveden, Marianne Smith, Ann M. Dvorak, and Edwin W. Salzman.** Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein aequorin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1985;260:2069-76.
7. **Douglas A, Triplett MD.** Laboratory Diagnosis of von Willebrand's disease. *Mayo Clin Proc*. 1991;66:832-40.
8. **Ulrich Budde, Elke Drewke, Kerstin Mainusch, Reinhard Schneppenheim.** Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand's disease. *Semin Thromb Hemost*. 2002;28:173-89.
9. **P.M. Mannucci and A. Tripodi.** Factor VIII clotting activity. En: *Laboratory Techniques in Thrombosis—a Manual* 1999, 107-13.
10. **Budde U, Schneppenheim R, Plendl H, et al.** Luminographic detection of von Willebrand factor multimers in agarose gels and on nitrocellulose membranes. *Thromb Haemost*. 1990;63:312-315.

IX. Utilidad de las pruebas diagnósticas en la práctica clínica

Pedro Gutiérrez-Castrellón*

Generalidades

Las pruebas diagnósticas son un componente importante en la atención médica moderna. Representan aproximadamente el 25% de los gastos anuales realizados en salud ambulatoria en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA)¹ y han transformado el tipo de atención clínica proporcionada en los últimos 20 años.² Así los médicos solicitan las distintas pruebas diagnósticas con la expectativa que ellas les ayuden a esclarecer su pensamiento diagnóstico y seleccionar la mejor terapéutica para el paciente con la finalidad de mejorar el pronóstico global del mismo. Estas prácticas presuponen que los resultados de las pruebas proveen información confiable acerca de la enfermedad en forma individual en cada paciente.

Contrastando con lo anterior, en realidad la atención puesta a la evaluación de la calidad de estructuración de las investigaciones sobre pruebas diagnósticas es relativamente modesta. De hecho muchas pruebas diagnósticas no son evaluadas rigurosamente antes de su aplicación general y la mayoría de los reportes existentes sobre pruebas diagnósticas poseen limitantes metodológicos que limitan su capacidad para proporcionar información confiable sobre el desempeño de la prueba.^{2,3}

Estos factores originan una gran variación en los reportes de las características de las pruebas al mismo tiempo que comprometen su credibilidad.⁴ A menudo el resultado es la amplia utilización de pruebas con eficacia limitada o incierta. Tales prácticas son no sólo costosas

sino que pueden poner a los pacientes en riesgo significativo particularmente cuando las pruebas no son seguras o reproducibles.²

Para evitar un uso inadecuado de las pruebas diagnósticas, los clínicos deben ser capaces de evaluar críticamente las pruebas diagnósticas existentes en la literatura y ser capaces de distinguir entre artículos que contienen información confiable de aquellos que contienen información sesgada y con limitantes. En particular deben reconocer las potenciales fuentes de sesgo y variabilidad y cómo estos factores producen estimados incorrectos de la eficacia de las pruebas.

Escenario clínico

Como clínico se le interconsulta sobre una mujer de 78 años quien después de 10 días de haberse sometido a cirugía abdominal inicia con dificultad respiratoria en las últimas 24 horas acompañado de dolor torácico el cual empeora ocasionalmente durante las respiraciones profundas. A la exploración física presenta algo de dolor en el abdomen y estertores roncantes escasos en ambas bases pulmonares. La radiografía de tórax revela un derrame pleural derecho mínimo (es la única que se ha tomado desde la cirugía). La gasometría arterial presenta PO₂ de 70 mm Hg, con una saturación de 92%. El electrocardiograma demuestra sólo cambios inespecíficos. Se le indica que la paciente se encuentra recibiendo 5000 U de heparina dos veces al día.

* Departamento de Metodología de la Investigación. Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México.

A pesar de lo anterior, usted sospecha que la paciente puede estar cursando con una embolia pulmonar (EP) por lo que se decide solicitar un gammagrama ventilatorio/perfusorio (V/P) el cual reporta "embolia pulmonar probable". A pesar de dicho reporte usted indica anticoagulación completa. A pesar de que usted ha utilizado en diversas ocasiones en el pasado el gammagrama, se admite que mucho del entendimiento está basado sobre la intuición y la práctica local más que en las propiedades de dicha prueba, por lo que en camino a revisar el gammagrama decide pasar primero a consultar la literatura existente sobre la utilidad diagnóstica de la prueba.

La búsqueda

El plan es encontrar un estudio que le diga las propiedades del gammagrama V/Q y cómo aplicarlo a la práctica en general y al caso actual. Al consultar la biblioteca a través de las palabras clave "embolismo pulmonar" se identifican un total de 1,749 artículos de 1989 a 1992 por lo que se decide seleccionar sólo aquellos artículos que tengan como subtítulo "imagen con radionúclidos" y que tengan asociado el título de "estudios comparativos" ya que lo que se desea es identificar información que compare el gammagrama V/P con algún estándar de referencia. La estrategia permite identificar 32 artículos, de los cuales se excluyen 11 que evalúan nuevas técnicas diagnósticas, 9 que se relacionan al diagnóstico y tratamiento de trombosis venosa profunda y uno que examina la historia natural de la embolia pulmonar. De los 11 restantes uno es una editorial y cuatro están limitados en su alcance (evaluación únicamente de gammagramas perfusorios). De los seis restantes el estudio sobre la investigación prospectiva del diagnóstico de embolismo pulmonar (PIOPED),⁵ le llama inmediatamente su atención tanto porque está escrito en una revista médica ampliamente conocida y debido a que lo ha visto referido en muchos de los artículos que fue descartando.

Al revisar el resumen se identifica la siguiente información: entre personas con resultados del gammagrama de probable EP, el 33% tuvieron realmente EP. Con la información anterior, ¿Cuál sería su conclusión sobre la decisión tomada con la paciente?

Introducción

La mayoría de los clínicos regularmente confrontan múltiples interrogantes cuando solicitan e interpretan pruebas diagnósticas. La continua proliferación de tecnología médica sobrepasa la capacidad del clínico para evaluar aún los artículos más importantes sobre utilidad de las pruebas diagnósticas. Por lo anterior resulta importante considerar

una sistema lo suficiente práctico que permita evaluar de una manera eficiente la información existente y permita de esta manera establecer conclusiones que soporten el peso de la evidencia. Este sistema en términos globales se basa primordialmente en tres preguntas principales.⁶⁻⁸

¿Son los resultados del estudio válidos?

El grado en el cual se aceptan los resultados de un estudio, depende en cierta medida de los métodos utilizados para llevar a cabo la investigación. El decir que los resultados son válidos implica que la certeza de los resultados de la prueba diagnóstica, como se reportan, son suficientemente cercanos a la realidad. De esta manera se recomienda antes que nada determinar si se puede creer en los resultados del estudio al considerar la manera en la cual los autores organizaron a los pacientes y cómo se les aplicó la prueba bajo estudio y el referente apropiado o "estándar de oro".

¿Cuáles son los resultados del estudio?

Si se decide que los resultados del estudio son válidos, el siguiente paso es determinar la validez global de la prueba diagnóstica a través de analizar o calcular la razón de verosimilitud de la prueba (a menudo referida como las propiedades de la prueba).

¿Los resultados obtenidos me ayudarán en la atención de mis pacientes?

El tercer paso es decidir cómo utilizar la prueba, tanto para los pacientes en forma individual como para la práctica en general. ¿Son los resultados del estudio generalizables?, ¿Pueden aplicarse a un grupo particular de pacientes, incluyendo a los pacientes que se ven más a menudo?, ¿Qué tan probable es que los resultados de la prueba proporcionen información realmente de utilidad?, ¿Los resultados de la prueba proporcionan información adicional más allá de la historia y la exploración física?, ¿Es menos cara o está más fácilmente disponible que otras pruebas diagnósticas?, y finalmente ¿Se beneficiarán los pacientes si se les aplica la prueba?

Utilizaremos el estudio PIOPED para ilustrar la forma en la que se sugiere deben de ser contestadas las preguntas anteriores.

En dicho estudio, 731 pacientes con sospecha de EP fueron sometidos a gammagrama V/P y angiografía pulmonar, la cual fue considerada en el momento del estudio la mejor forma de diagnosticar si un paciente realmente tenía EP (estándar de referencia o estándar de oro). Cada

angiograma fue interpretado con tres posibles resultados: EP presente, EP dudoso o EP ausente. La utilidad del gammagrama se comparó con el angiograma y los resultados del gammagrama se reportaron en cuatro categorías: EP altamente probable, EP con probabilidad intermedia, EP con baja probabilidad y gammagrama normal o casi normal.

¿Son los resultados del estudio válidos?

Lineamientos primarios

¿Se efectuó una comparación independiente y cegada con un estándar de referencia?

La validez de una prueba diagnóstica es determinada al compararla con lo más cercano a la verdad. Por lo anterior es necesario asegurarse que se ha aplicado un estándar de referencia adecuado en cada paciente (biopsia, cirugía, autopsia, seguimiento a largo plazo) de manera concomitante a la prueba bajo investigación.⁹ En el estudio PIOPED se utilizó el angiograma pulmonar como el estándar de referencia.

Si se acepta el estándar de referencia la siguiente pregunta es identificar si la aplicación de la prueba bajo estudio y dicho estándar se aplicaron de manera independiente (Administración por intérpretes que desconocían los resultados de la otra prueba). Esto es muy importante con la finalidad de evitarse sesgos de interpretación. Ya que por ejemplo una vez que se ha demostrado un nódulo pulmonar en una tomografía si al mismo tiempo observamos nosotros mismos las radiografías de tórax seríamos capaces de identificar lesiones que desconociendo los resultados de la tomografía no identificaríamos. Lo más probable es que la interpretación de una nueva prueba podría verse influenciada por el conocimiento de los resultados sobre el estándar de referencia.

Incluyó la muestra bajo estudio un espectro adecuado de pacientes en quienes la prueba diagnóstica se aplicaría en la práctica clínica? Una prueba diagnóstica es realmente útil sólo en el grado en el que distingue entre enfermedades o estados que podrían en otras condiciones confundirse. Casi cualquier prueba puede distinguir el sano del gravemente afectado (diferenciar de entre un conjunto de colores, el blanco del negro), pero esto no señala la utilidad clínica de la prueba. El valor verdadero se establece sólo en estudios que se asemejan lo más cercano a la práctica clínica. Un vívido ejemplo de cómo las esperanzas cifradas en la introducción de algunas pruebas diagnósticas puede disminuirse por las investigaciones subsecuentes se observó en la evaluación del antígeno carcinoembrionario (ACE) en pacientes con cáncer colorrectal. Cuando el ACE fue medido en 36 pacientes conocidos con cáncer avanzado del colon o recto, estuvo elevado en 35 de ellos.

Al mismo tiempo niveles mucho más bajos se identificaron en personas sin cáncer y en una variedad de otras condiciones.¹⁰ Los resultados sugirieron que la medición de los niveles de ACE podría ser de utilidad para diagnóstico de cáncer colorrectal o inclusive para el tamizaje de esta patología. En estudios subsecuentes de pacientes con estadios menos avanzados de dicha neoplasia y en pacientes con otros problemas gastrointestinales la validez de dichas mediciones se disminuyó considerablemente y su uso para diagnóstico de cáncer se abandonó, quedando limitada su utilidad como un elemento adicional en el seguimiento de pacientes con cáncer colorrectal.¹¹

Lineamientos secundarios

Una vez que se han identificado los elementos descritos previamente es necesario considerar los siguientes apartados.

¿Los resultados de la prueba bajo evaluación influyeron la decisión para administrar el estándar de referencia?

Las propiedades de una prueba diagnóstica se distorsionarán si sus resultados influencian si los pacientes se someten a confirmación por la prueba diagnóstica. Esta situación, denominada sesgo de verificación^{12,13} o sesgo de escrutinio,^{14,15} aplicará por ejemplo cuando los pacientes con la sospecha de enfermedad coronaria y prueba de esfuerzo positiva tuvieron más probabilidad de someterse a angiografía coronaria (estándar de referencia) que aquéllos con prueba de esfuerzo negativa.

El sesgo de verificación fue un problema en el estudio PIOPED, es decir que los pacientes cuyo gammagrama V/Q se interpretó como normal o casi normal o con baja probabilidad tuvieron menos probabilidad de someterse a angiografía pulmonar(69%) que aquéllos con gammagramas más positivos (92%) (Cuadro I).

Fueron los métodos para realizar la prueba, descritos en suficiente detalle para permitir su reproducción ?

Si los autores concluyen que debes utilizar una determinada prueba diagnóstica, deben señalarte de manera completa cómo utilizarla. Esta descripción debe cubrir todos los aspectos que son importantes en la preparación del paciente (dieta, medicamentos a evitar, precauciones después de la prueba), la realización de la misma (técnica, posibilidad de daño) y la forma de análisis e interpretación de los resultados

¿Cuáles son los resultados?

Se presentan las razones de verosimilitud o los datos necesarios para calcularlas?

Probabilidad pre-prueba

Cuadro I. Propiedades del gammagrama V/P

Resultados del gammagrama V/P	Embolismo No.	Presente Proporción	Embolismo No.	Ausente Proporción	Presentes /Ausentes	Razón de Verosimilitud
Alta prob.	102	102/251	14	14/630	.406/.022	18.3
Mediana prob.	105	105/251	217	217/630	.418/.344	1.2
Baja prob.	39	39/251	273	273/630	.155/.433	.36
Normal/Casi nl	5	5/251	126	126/230	.020/.200	.10

El punto inicial de cualquier proceso diagnóstico es el paciente, el cual se presenta con una constelación de signos y síntomas. Considere el caso de dos pacientes, el primero de ellos la mujer ya conocida de 78 años 10 días de cirugía y el segundo un hombre ansioso de 28 años, quien ha estado conduciendo su automóvil sin descansar durante 10 horas, ambos con dificultad respiratoria y dolor torácico inespecífico. Cuando pensamos en la probabilidad de que cada uno presente EP y la basamos en los antecedentes y nuestra experiencia clínica, pensamos en las probabilidades preprueba, las cuales como es lógico son muy diferentes entre los dos individuos (En la mujer de 78 años es alta y en el hombre de 28 años es baja). Por lo tanto a pesar de que ambos pudieran tener resultados con probabilidad intermedia en el gammagrama V/Q el manejo subsecuente es muy probable que sea distinto. Así pues dos conclusiones emergen de esta línea de razonamiento. La primera es que cualquiera que sean los resultados del gammagrama, éste no nos dice cuándo una EP está presente. Lo que sus resultados generan es modificar las probabilidades preprueba de EP, generando una nueva probabilidad posprueba. La dirección y magnitud de este cambio de probabilidad preprueba a posprueba está determinada por las propiedades de la prueba, entre las cuales se encuentra la razón de verosimilitud (LR o likelihood ratio). La segunda conclusión es que las probabilidades preprueba presentan una mayor influencia sobre el proceso diagnóstico. Cada pregunta de la historia y del examen físico es una prueba diagnóstica que incrementa o reduce la probabilidad de un problema en cuestión. Así considere al paciente de 28 años. El hecho de que él se presente con dificultad respiratoria aumenta la probabilidad de EP. El hecho de que ha estado inmóvil por 10 horas aumenta también dicha probabilidad, pero su edad, la ausencia de antecedentes patológicos, la exploración física normal y los resultados de su gasometría arterial disminuyen la probabilidad. Por lo tanto si conocemos las propiedades de cada una de estas piezas de información, nos podemos mover secuencialmente a través de ellas, incorpo-

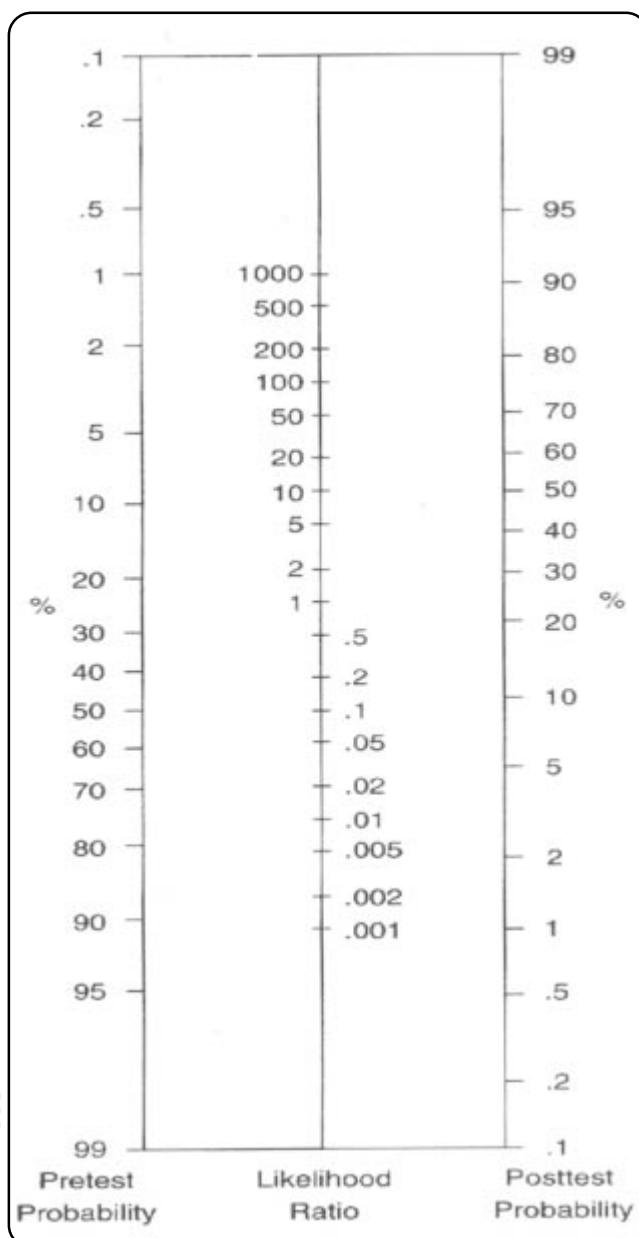


Figura 1. Nomograma de Fagan.

rando cada pieza de información y recalcando de manera continua la probabilidad de determinada enfermedad. Los clínicos frecuentemente realizan estas acciones, sólo que como las propiedades de los puntos individuales de la historia y la exploración física generalmente no están disponibles, terminan basándose únicamente en la experiencia y en la intuición para arribar a las probabilidades pre-prueba que preceden a la solicitud de pruebas diagnósticas lo que en ocasiones proporciona resultados considerablemente distintos.¹⁶⁻²¹

La utilidad clínica de una prueba diagnóstica está determinada en gran medida por la seguridad con la que se identifica al trastorno de interés y la seguridad de las mediciones nos enfocará en su LR. Si analizamos los resultados del cuadro I observamos que hubo 251 pacientes en quienes se comprobó EP por angiografía y 630 en quienes el angiograma o el seguimiento lo descartó. En seguida observamos que 102 del total de pacientes con EP presente presentaron un gammagrama altamente probable (0.406), mientras que sólo 14 de los 630 pacientes sin EP presentaron este mismo resultado en el gammagrama (.022). La razón de estas dos probabilidades se denomina LR y para el caso de gammagrama con alta probabilidad es de .406/.022 o sea de 18.3 (Cuadro I). Dicho en otras palabras un gammagrama con alta probabilidad es 18.3 veces más probable que ocurra en sujetos con EP que en sujetos sin EP.

Un LR de 1 significa que la probabilidad posprueba es exactamente la misma que la probabilidad pre-prueba

LR mayores a uno incrementan la probabilidad de que la enfermedad bajo estudio esté presente

LR menores de uno disminuyen la probabilidad de presencia de enfermedad

Como regla general se acepta que LR mayores de 10 o menores de 0.1 producen cambios grandes y a menudo concluyentes de las probabilidades pre-prueba a posprueba, LR de 5 a 10 y de 0.5 a 0.2 generan cambios pequeños, pero aun importantes en la probabilidad, mientras que cambios de 1 a 2 y de 0.5 a 1 alteran la probabilidad en grados muy pequeños y raramente importantes.

Habiendo determinado la magnitud y significancia de los LR, necesitamos combinarlos directamente convirtiendo las probabilidades pre-prueba a razones, multiplicando el resultado por el LR y convirtiendo la subsecuente razón posprueba en probabilidad posprueba, lo cual puede ser tedioso en la práctica clínica. Afortunadamente el nomograma propuesto por Fagan (22) realiza automáticamente las conversiones. En esta herramienta la primera columna representa la probabilidad pre-prueba, la segunda el LR y la tercera la probabilidad posprueba. De esta manera se selecciona el punto que representa la probabilidad pre-prueba y el punto del LR y se dibuja una línea que interseca con la tercera columna para obtener la probabilidad posprueba.

Por ejemplo nuestro paciente de 78 años con probabilidad pre-prueba de 70% y con un gammagrama con alta probabilidad el cual tiene asociado un LR de 18.3 al reunir estos datos en una línea y continuarla a la tercera columna se obtiene una probabilidad posprueba de 97%.

Los resultados del estudio me ayudarán a la atención de mis pacientes?

Será la reproducibilidad de los resultados del estudio y su interpretación satisfactorios en nuestro medio?

Los valores de cualquier prueba dependen de su capacidad para producir los mismos resultados cuando se aplican a pacientes estables. La pobre reproducibilidad puede resultar de problemas con la prueba misma (variaciones en los reactivos) o de la necesidad de interpretación. Si la reproducibilidad de la prueba se encuentra reducida y la concordancia entre observadores se encuentra reducida y aún así la prueba discrimina adecuadamente indica que se trata de una muy buena prueba y que podría ser de utilidad. Si la reproducibilidad es muy alta y la concordancia significativa la prueba es muy sencilla, no ambigua o fácil de interpretar.

¿Son los resultados aplicables a mis pacientes?

El punto aquí es a qué grado la prueba proporcionará los mismos resultados entre los pacientes de mi medio en relación con lo reportado en el artículo. Hay que recordar que las propiedades de la prueba pueden cambiar cuando la frecuencia y gravedad de la enfermedad varía. Es decir que cuando predominan pacientes con estadios avanzados de la enfermedad el LR se moverá más allá de la unidad, mientras que si predominan pacientes con estadios tempranos el LR se acercará al 1 o a valores inferiores. Si se da la condición que los pacientes que usted atiende son similares en los criterios de inclusión y exclusión de los reportados en el estudio bajo análisis, los resultados son completamente aplicables.²³⁻²⁵

¿Los pacientes se beneficiaran de los resultados de la prueba?

El último criterio a considerar es en relación con la magnitud de beneficio terapéutico que los pacientes experimentarán posterior al resultado de las pruebas a considerar. El valor de una prueba segura no se discute cuando la enfermedad de interés si se deja sin diagnosticar es peligrosa, la prueba si tiene riesgos éstos son aceptables y existe un tratamiento efectivo. En otras situaciones clínicas la prueba puede ser segura y el manejo puede cambiar como resultado de su aplicación, pero el impacto sobre el desenlace de los pacientes puede ser incierto.²⁶⁻²⁸