

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen
Volume **49**

Número
Number **3**

Julio-Septiembre
July-September **2002**

Artículo:

Sección del Médico Residente

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

SECCIÓN DEL MÉDICO RESIDENTE

Traducción, resumen y comentario por el Dr. Gamaliel Benítez A.*

Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: retrospective case-control study

Jaroslav Flegr, ** Jan Havlicek, *** Petr Kodym, **** Marek Maly, ***** Zbynek Smahel ***** BMC Infectious Diseases 2002.

- * Residente de 1er año. Patología Clínica. Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional Siglo XXI. Av. Cuauhtémoc 330 colonia Doctores. Código Postal 06720. Fax 57614867.
E-mail:patclinresidentesXXI@correo.unam.mx
- ** Departamento de parasitología, Facultad de Ciencias, Charles University, Praga, Rep. Checa.
- *** Centro de estudios de la personalidad y estudios étnicos, Facultad de Humanidades, Charles University, Praga, Rep. Checa.
- **** Laboratorio Nacional de Referencia para toxoplasmosis, Instituto Nacional de Salud Pública, Praga, Rep. Checa
- ***** Departamento de bioestadística, Instituto Nacional de Salud Pública, Praga, Rep. Checa.
- ***** Departamento de antropología y genética humana, Facultad de Ciencias, Charles University, Rep. Checa.

165

Introducción: el protozoo *Toxoplasma gondii* perteneciente al phylum *apicomplexa* es parásito de diversos vertebrados de sangre caliente, incluyendo de 30 a 60% de los humanos en la mayoría de los continentes. Después de una corta fase aguda de infección le sigue una fase de latencia donde se forman quistes del parásito los cuales sobreviven el resto de la vida del hospedero, principalmente alojados en las fibras musculares y el sistema nervioso central. Se conoce que el toxoplasma induce cambios de comportamiento en roedores infectados, se ha observado disminución en el desempeño motor y el tiempo de reacción, considerándose una adaptación evolutiva del parásito para facilitar la transmisión al hospedero definitivo por depredación (el gato).

Los cambios motores no podrían afectar al humano moderno y aumentar el riesgo de depredación, de cualquier manera la prolongación del tiem-

po de reacción podría incrementar el riesgo de accidentes como los de tráfico. Si esto es verdad, la prevalencia de toxoplasmosis en partícipes de accidentes automovilísticos debe ser más alta que en el resto de la población de la misma área.

Métodos: la población estudiada sólo consistió en residentes de los distritos centrales de Praga con resultados negativos para alcohol y que participaron en un accidente de tráfico. Las muestras para el estudio se obtuvieron de muestras tomadas para otro fin (B. hemática, química sanguínea etc.) durante el periodo de 1997 a 2000. El grupo control consistió en 456 voluntarios residentes de los distritos centrales de Praga, a los cuales se les realizó un estudio serológico múltiple unos años antes (1990 a 1996).

Pruebas serológicas: todos los sueros obtenidos fueron enviados al Laboratorio Nacional de Referencia para Toxoplasmosis en el Instituto Na-

cional de Salud Pública, donde fueron examinados por medio de fijación de complemento, (SEVAC, Praga), ELISA IgG (SEVAC Praga) y por ELISA IgM (TESTLINE, Brno). Se consideró como toxoplasmosis latente a una prueba positiva a fijación de complemento (título mayor a ocho) junto con un ELISA IgM negativo.

Resultados: se observó una seroprevalencia más alta en los individuos con accidentes de tránsito que en la población general.

El valor de odds ratio sugiere que los individuos con toxoplasmosis latente tienen un riesgo 2.65 veces más alto de un accidente de tránsito que aquellos toxoplasmosis negativo. El riesgo aumenta a la par con los niveles de antitoxoplasma.

Discusión: el riesgo para sufrir un accidente de tránsito es más alto en sujetos con infección reciente de toxoplasma o con infecciones masivas y disminuye conforme disminuye la respuesta inmune. Se ha intentado dar explicación a esta relación y parece lógico que los individuos infectados con toxoplasma disminuyen su desempeño motor, esto ha sido observado en otras investigaciones donde se sugiere que la toxoplasmosis latente disminuye el tiempo de reacción en los humanos. Se ha ob-

servado que el desempeño en los primeros tres minutos de las pruebas realizadas a individuos con toxoplasmosis latente ha sido razonablemente buena pero pierden la concentración más rápidamente que los controles. La disminución del tiempo de reacción y otros cambios en el comportamiento durante la infección por toxoplasmosis tal vez sea mediada por la producción de algún neurotransmisor, probablemente dopamina. La relación entre los niveles de anticuerpo y la posibilidad de sufrir un accidente reflejan en este artículo la posible relación entre la severidad de la infección y la afectación del comportamiento.

Conclusión: los sujetos con toxoplasmosis latente tienen un riesgo significativamente más alto de sufrir un accidente de tráfico que los no infectados.

Comentario: a pesar de haber considerado durante algún tiempo al toxoplasma el parásito casi perfecto debido a su comportamiento, recientemente se ha descubierto que participa en diferentes identidades patológicas no sólo en el embarazo y en individuos inmunodeprimidos sino también en individuos inmunocompetentes. Este artículo es un ejemplo de lo que falta por conocer de cómo afecta en nuestra vida diaria este tipo de parásitos.

166

Traducción, resumen y comentario por el Dr. Gamaliel Benítez A.*

Moléculas de adhesión circulantes en fibrosis quística

Virginia De Rose, ** Alessandro Oliva, ** Barbara Messore, ** Bianca Grosso, ** Cinzia Mollar, ** Ernesto Pozzi**
American journal of respiratory and critical care. Vol. 157. No 4. April 1998, 1234-1239

* Residente de 1er año. Patología Clínica. Hospital de Cardiología. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Av. Cuauhtémoc 330 colonia Doctores. Código Postal 06720. Fax 57614867.

E-mail:patclinresidentesXXI@correo.unam.mx

** Departamento de ciencias clínicas y biológicas, división de enfermedades respiratorias, universidad de Turín Italia.

Introducción: se ha evidenciado que la reacción inflamatoria sostenida en la vía aérea de los pacientes con fibrosis quística (FQ), aún clínicamente

estables, está condicionada por el flujo de polimorfonucleares los cuales liberan enzimas que contribuyen a la lesión pulmonar y a la perpetuación de

infecciones. Las moléculas de adhesión leucocitaria juegan un papel crucial en el reclutamiento y migración de células inflamatorias desde los vasos a la vía aérea así como su activación. Dentro de éstas están la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1), molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y la E-selectina, las cuales se han relacionado con la inflamación de la vía aérea. Estas son activadas por diferentes citocinas y en el caso de la E-selectina por el lipopolisacárido bacteriano. Estas moléculas se pueden aislar de la sangre periférica y otros fluidos en enfermedades inflamatorias.

Se han informado concentraciones elevadas de ICAM-1 en tuberculosis miliar, sepsis y asma. La VCAM-1 en sepsis, asma y ambas en enfermedades pulmonares intersticiales junto con la E-Selectin. El objetivo del estudio fue determinar si los niveles de ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectin en pacientes con fibrosis quística en condiciones clínicas estables se relacionan con la severidad de la enfermedad.

Métodos: 29 pacientes de 18 a 50 años de edad con promedio de 25 ± 1.5 años diagnosticados con base en una prueba de sudor positiva con niveles de cloro elevados > 70 mEq/L. Todos tenían evidencia de enfermedad pulmonar, con hallazgos clínicos y radiológicos. Se realizó análisis microbiológico de esputo mensualmente. De los 29 pacientes, 19 tenían infección crónica de vía aérea con *Pseudomona aeruginosa* y ocho con *Staphylococcus aureus*, la cronicidad se definió como crecimiento persistente en seis o más muestras; dos pacientes se mantuvieron con estudios negativos. Ninguno de los pacientes estaba recibiendo tratamiento con antibióticos, aines o esteroides dos meses antes de iniciar el estudio, los que tenían patologías asociadas fueron excluidos. Se realizaron espirometrías, análisis hematológicos y microbiológicos durante el estudio. Se utilizaron 25 voluntarios sanos de 24 a 40 años con promedio de 27.6 ± 1.5 años, sin historial de enfermedad pulmonar, exploración física normal, esputo estéril y no fumadores. Fueron obtenidos

diez mililitros de sangre venosa de cada sujeto, las muestras se centrifugaron para obtener el suero que se congeló a -80°C para análisis posterior.

Los niveles de ICAM-1, E-Selectin y VCAM-1 en suero fueron determinados por ELISA de la casa comercial Bender med systems, Viena, Austria para ICAM-1 y E-Selectin, para VCAM con R&D systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. U.K., todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Métodos estadísticos: se utilizó la prueba de Mann Whitney U para comparar los niveles séricos de las moléculas de adhesión en los pacientes con fibrosis quística estables y los controles. Se usó la prueba de Wilcoxon para comparar los niveles séricos entre los pacientes clínicamente y en exacerbaciones pulmonares, antes y después del tratamiento. La correlación fue determinada por la prueba de Sparkman, la significancia estadística se estimó con $p < 0.05$.

Resultados: los niveles séricos de ICAM fueron significativamente más altos en pacientes con fibrosis quística en condiciones estables en comparación con el grupo control ($594.4 \text{ ng} \pm 20.4 \text{ ng/mL}$ vs $322 \text{ ng} \pm 15.02 \text{ ng/mL}$) con $p < 0.001$. Resultados similares se obtuvieron con E-Selectin ($40 \text{ ng} \pm 2.7 \text{ vs } 24 \text{ ng} \pm 1.4 \text{ mL}$) con $p < 0.001$. En contraste no hubo diferencias significativas entre ambos grupos con los niveles séricos de VCAM-1. Tampoco hubo diferencias en los niveles séricos de moléculas de adhesión entre los pacientes con infección crónica de *Pseudomona* o *Staphylococo* ni comparados con los pacientes clínicamente estables.

Las ICAM-1 y E-selectina fueron significativamente más elevadas en las exacerbaciones comparadas con los niveles séricos en condiciones clínicamente estables, la antibioticoterapia induce una importante disminución en las moléculas de adhesión.

No se observaron diferencias entre los niveles de VCAM-1 en los diferentes grupos.

Discusión: se ha informado de incrementos en las citocinas en la vía aérea y en la circulación en pa-

cientes con fibrosis quística. En particular incremento en los niveles de IL-1, alfa-FNT e IL-8 en el lavado broncoalveolar de estos pacientes, aun en condiciones estables. Debido a que la mayoría de los pacientes estaban infectados con alguna bacteria esto podría explicar el aumento en la ICAM-1 y E-selectina.

El tratamiento con antibiótico en las exacerbaciones pulmonares disminuye de manera significativa los niveles de ICAM-1 y E-selectina, por lo que podrían ser utilizadas para el seguimiento del mismo.

Es conocido que la inflamación de la vía aérea juega un papel crucial en el desarrollo del daño pulmonar, por lo que marcadores no invasivos de la inflamación de la vía aérea serían de gran utilidad en esta entidad.

Comentario: entre más se entiendan los mecanismos que intervienen en la inflamación se podrán realizar mejores pruebas para dar seguimiento a los pacientes de manera más estrecha y así poder planear estrategias terapéuticas más oportunas.

Traducción, resumen y comentario por el Dr. Rodolfo Walter Quintero Schwantes*
In memoriam. Descanse en paz. (19 de octubre 1975, 23 de junio de 2002)

Gene Therapy in Hemophilia: Clinical Trials Update

Gilbert C. White, II** *Thrombosis and Haemostasis*, 2001; 86: 172-177.

Palabras clave: Hemofilia, terapia génica, retrovirus, virus adeno-asociado, adenovirus.

Key words: Hemophilia, gene therapy, retrovirus, adeno-associated virus, adenovirus.

* Residente de 1er año. Patología Clínica. Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Av. Cuauhtémoc 330 colonia Doctores. Código Postal 06720. Fax 57614867.
E-mail:patclinresidentesXXI@correo.unam.mx

** División de Oncohematología y Centro de Trombosis y Hemostasia, Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, EUA.

168

Resumen

Los desórdenes causados por errores genéticos han sido una meta primaria de la terapéutica por transferencia génica. Las hemofilias A y B son objetivos especialmente importantes porque los genes para los factores VIII y IX están bien caracterizados y no precisan de regulación compleja, pequeños incrementos en el nivel del factor tendrían beneficios clínicos significativos, existen pruebas clínicas y de laboratorio eficaces y se tienen excelentes modelos animales. Actualmente, se encuentran en desarrollo o han sido completados cuatro ensayos clínicos sobre terapia génica en hemofilia, dos en hemofilia A y dos en hemofilia B y dos ensayos clínicos más han sido aprobados. Los resultados preliminares globales de estos estudios indican que las aproximaciones y dosis actuales son seguras y que se detectan bajos niveles de expresión. Estos estudios apoyan el constante desarrollo de la transferencia génica como una potencial opción terapéutica para la hemofilia.

Summary

Disorders caused by inborn genetic errors have been a primary target for treatment by gene transfer. Hemophilia A and B have been considered especially important targets because the genes for factor VIII and IX are well characterized, levels of factor VIII and IX do not require complex regulation, small increases in factor level would have significant clinical benefits, good clinical and laboratory tests of efficacy exist, and excellent animal models of hemophilia are available. Four clinical trials of gene transfer in hemophilia, two in hemophilia A and two in hemophilia B, are currently underway or have been completed and two other trials have been approved. The collective interim results from these trials indicate that the current approaches and doses are safe and that low levels of expression are detected. These studies support the continued development of gene transfer as a potential treatment option for hemophilia.

Introducción

Revisiones recientes subrayan los enormes avances que han situado la hemofilia a la cabeza de las enfermedades candidatas a terapia génica. Actualmente se encuentran en desarrollo o han sido completados cuatro ensayos clínicos y dos estudios adicionales han recibido su aprobación final por parte de las agencias reguladoras. El propósito de esta revisión es examinar los resultados obtenidos hasta la fecha en estos ensayos clínicos y presentar avances actuales en el área.

Ensayos clínicos de hemofilia A y B

Estudio chino de hemofilia B. El primer ensayo clínico con hemofílicos fue iniciando en 1991 por la Universidad de Fudan y el Hospital Shanghai en Shanghai, China. Éste fue un ensayo de fase I usando transferencia génica *ex vivo* mediada por retrovirus en fibroblastos dérmicos autólogos. Se emplearon dos vectores virales: XL-IX, un vector basado en el virus de la leucemia murina de Moloney, en que la expresión del factor IX estuvo bajo control de la repetición terminal larga (LTR) del virus y N2CMV-IX, en que la expresión del factor IX se encontró bajo control del promotor de CMV. La producción de factor IX por los fibroblastos infectados con cualquiera de estos vectores promedió 3,420 ng de factor IX por 10^6 células por día.

Los sujetos del estudio fueron dos hermanos, de 9 y 13 años, quienes tenían hemofilia B moderada negativa a "material de reacción cruzada" (MRC) con actividad de factor IX limítrofe y niveles de antígeno de 2%. Se obtuvieron fibroblastos transducidos con XL-IX o N2CMV-IX (HBSF-IX) que secretaron factor IX humano en altas cantidades *in vitro*. Las células HBSF-IX fueron preparadas para su inyección SC a intervalos mensuales totalizando $6.6-11 \times 10^8$ células a ser inyectadas. No se observaron efectos secundarios pero sí incremento en el factor IX que ocurrió de 15 a 20 días después de la primera serie de inyecciones. Al término

de las tres series de inyecciones el factor IX plasmático y la actividad en ambos pacientes se incrementaron al doble y persistieron por más de 420 días reduciendo la tendencia hemorrágica. Uno de los sujetos recibió una serie adicional de inyecciones a los 16 meses de haber disminuido los niveles de factor IX y se demostró un nuevo incremento de los mismos en respuesta a las inyecciones.

Ensayo de hemofilia A de Transkaryotic Therapy, inc. (TKT). Se trata del primer ensayo clínico dentro de EUA, comenzado en 1998. Fue diseñado como un estudio abierto de búsqueda de dosis de fase I. Mientras la aproximación general es similar a la del estudio chino, el estudio de TKT empleó la transfección con un vector plásmido no viral para insertar factor VIII en el genoma celular, en vez de un vector viral. El plásmido contenía el ADNc para la forma sin dominio B del factor VIII humano bajo control del promotor CMV.

Fueron estudiados seis sujetos con edades entre 20 y 72 años. De ellos, cuatro fueron seropositivos para VIH pero sin SIDA y todos fueron seropositivos para los virus de la hepatitis B o C, con función hepática estable. Se obtuvieron fibroblastos que fueron infectados con el plásmido que contenía el ADNc. Los fibroblastos que expresaron el gen del factor VIII fueron reproducidos por clonación y posteriormente administrados por inyección peritoneal laparoscópica bajo anestesia general; de 100 a 400 millones de células fueron inyectadas a cada sujeto. El seguimiento de los seis pacientes varió de 12 a 18 meses sin reportes de efectos secundarios serios ni inhibidores del factor VIII. Tres de los seis sujetos demostraron niveles de factor VIII por abajo del umbral y aumentaron a 1 ó 2% del normal, con un máximo de 4%. Se observaron bajos niveles de expresión del factor VIII tras 18 meses, aunque la relación de los niveles de factor VIII con el tratamiento exógeno no fue definida. Los resultados iniciales de este estudio indicaron que la transferencia génica no viral *ex vivo* es segura.

Estudio de Chiron de hemofilia A. Aprobado por la FDA en 1999 fue diseñado como un estudio abierto

de búsqueda de dosis, con dosis única individual, multicéntrico y de fase I, en voluntarios con hemofilia A severa; se utilizó un vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) para transferir DNAc portador de factor VIII humano sin dominio B (hFVIIIv). El vector es resistente al complemento y emplea un sistema de empaquetamiento en líneas celulares humanas con homología reducida entre el vector retroviral y los componentes de "envoltura". Esto permite la producción de altos títulos virales sin generación de retrovirus capaces de replicación. En cultivos tisulares la producción de factor VIII usando este sistema ($1 \mu\text{g}/10^6$ células/24 hrs) resultó más eficiente que los adenovirus específicos de tejido. Estudios preclínicos demostraron la persistencia de niveles antigenéticos de factor VIII hasta por 65 semanas.

170

Basándose en los resultados de los ensayos preclínicos se realizó un estudio abierto de fase I y búsqueda de dosis para hFVIIIv en sujetos mayores de 18 años con hemofilia A severa y sin inhibidor. Los sujetos podían ser VIH positivos o negativos, pero se requirió que tuvieran cuentas de CD4 estables por arriba de $400/\text{mm}^3$ y fueron excluidos en caso de consumir inhibidores de la transcriptasa inversa debido al efecto de éstos sobre la transcripción inversa de hFVIIIv. Fueron administradas cinco dosis: 2.2×10^7 , 9.2×10^7 , 2.2×10^8 , 4.4×10^8 y 8.8×10^8 en unidades de transducción/kg en forma fraccionada por vía endovenosa. Se incluyeron 13 sujetos, tres en cada una de las primeras cuatro dosis y uno con la dosis máxima. La edad promedio fue de 37.5 años (rango de 18 a 55 años). El tiempo promedio en el estudio fue de 36 semanas (rango una a 54 semanas). La infusión de hFVIIIv fue bien tolerada, sin efectos secundarios serios, sin cambios en las pruebas funcionales hepáticas ni en las citometrías hemáticas, además de no haberse hallado virus capaces de replicación. No se encontró actividad del inhibidor de factor VIII. Mientras que ningún sujeto mantuvo niveles sostenidos mayores de 1%, seis pacientes presentaron $\text{FVIII} > 1\%$ en al menos dos ocasiones cinco

o más días después de la infusión de FVIII exógeno. Los niveles elevados de factor VIII fueron detectados ocho días después del tratamiento. Las células sanguíneas mononucleares periféricas demostraron la presencia de secuencias génicas del vector por pruebas de PCR a seis meses en los 10 sujetos estudiados y a un año en tres de cuatro sujetos estudiados, a pesar de que estos últimos recibieron la dosis más baja. El factor VIII exógeno mostró un incremento de la vida media ($T_{1/2}$) y área bajo la curva (ABC) estadísticamente significativos comparados con valores previos al estudio. La frecuencia de hemorragia se redujo en seis sujetos comparada con los antecedentes.

Los vectores retrovirales como el hFVIIIv son vectores que se integran aleatoriamente, lo que promueve la expresión a largo plazo del gen transducido; sin embargo, existen efectos indeseables potenciales de la integración aleatoria. Una preocupación teórica es la posibilidad de mutagénesis insercional, cuando la integración ocurre en un gen preexistente, lo que ocasiona su disruptión. Cuando esto ocurre en un protooncogen el resultado es la expresión nula del promotor tumoral en la célula y quizás un potencial neoplásico reducido y cuando ocurre en un antioncogen el resultado podría ser el opuesto. La habilidad de integrarse al genoma humano hace pensar también que el ADN pudiera alcanzar tejido gonadal e insertarse, posibilitando la transmisión a generaciones subsecuentes. Durante el estudio de Chiron se examinaron por PCR muestras de semen para evaluar esta posibilidad. Se halló sólo una señal débil positiva transitoria en una muestra de semen en la semana nueve; todas las pruebas previas y cuatro rastreos posteriores en el mismo sujeto resultaron negativos. No hubo suficiente muestra para repetir el resultado anormal, de modo que no queda claro si se trató o no de una falsa positiva. Kazazian ha estimado que la tasa natural de mutagénesis insercional endógena en el ser humano es de cerca de uno en 10 a 100; se trata de un número mucho mayor que la tasa calculada para la terapia génica.

En resumen, los resultados preliminares de este estudio de fase I empleando un vector retroviral demostraron que el hFVIIIv: 1) es seguro en las dosis y vía de administración utilizados; 2) persiste en las células mononucleares periféricas hasta por un año; 3) se asocia a niveles de factor VIII en algunos individuos; 4) se asocia con factor VIII plasmático disponible aumentado ($T_{1/2}$ y ABC aumentados) tras la infusión de FVIII exógeno.

Estudio Avigen para hemofilia B. El estudio Avigen fue aprobado por la FDA en 1999, siendo diseñado como un estudio de fase I prospectivo, multicéntrico, de dosis única y búsqueda de dosis escalada, para evaluar la seguridad de un vector viral asociado a adenovirus (VAA), para proveer de factor IX humano a sujetos con hemofilia B severa. La coagulina-B, el VAA recombinante producido por Avigen que se usó en el estudio, fue producido por un método de triple transfección usando tres plásmidos y la producción del vector se realizó en células HEK-293.

El ensayo clínico con VAA fue apoyado por los más extensos estudios preclínicos de cualquiera de los ensayos en curso y fue el único en que se examinó la transferencia génica específica de especie (sic). Estudios en ratones inmunodeficientes Rag-1 mostraron la expresión sistémica de elevados niveles de factor IX humano por al menos seis meses y de menores niveles de por vida en los ratones. Estos resultados fueron reforzados por posteriores éxitos en modelo canino. El reporte inicial de este estudio demostró la seguridad del enfoque del vector VAA en humanos. Los tres sujetos, uno con hemofilia B severa positiva a MRC y dos con hemofilia B severa negativa a MRC, recibieron 2×10^{11} vg/kg. El vector fue administrado bajo anestesia general mediante 10 a 72 inyecciones con guía ultrasónica en el músculo vasto lateral de la pierna. Las biopsias musculares realizadas de 8 a 12 semanas tras la administración del vector mostraron evidencia inmunohistoquímica de factor IX en el espacio extracelular en un patrón similar al observado en estudios preclínicos. A pe-

sar de la administración intramuscular directa, se tuvo evidencia de diseminación viral transitoria. Las secuencias del vector fueron detectadas en suero en los tres sujetos a las 24 y 48 horas, en saliva en los tres sujetos a las 24 horas y en orina en un sujeto a 24 horas tras la inyección. No hubo secuencias del vector detectables en semen en ningún momento. Uno de los tres sujetos mostró niveles plasmáticos elevados de factor IX en múltiples ocasiones comenzando aproximadamente ocho semanas tras la administración del vector. El más alto nivel fue de 1.6% a la semana 10 y los niveles altos siguieron siendo detectables por 22 semanas. En el último reporte preliminar de diciembre de 2000, un total de ocho sujetos fueron incluidos en el ensayo, tres con dosis 2×10^{11} , tres con 5×10^{11} y dos con 2×10^{12} . No se han observado anticuerpos contra factor IX. Un sujeto con antecedentes de trombocitopenia volvió a desarrollarla tras la administración del vector. No se observó otra forma de toxicidad.

Los resultados en este estudio en curso indican que el complejo VAA-CMV-factor IX dirigido al músculo es seguro, sin evidencia de formación de inhibidor ni de transmisión germinal. En algunos sujetos fueron detectados niveles bajos de factor IX circulante.

Estudio Genstar en hemofilia A. El estudio Genstar fue aprobado por la FDA en el 2000. Éste es un estudio de fase I sobre hemofilia tipo A usando MiniAdFVIII, un vector adenoviral "denudado" derivado del adenovirus tipo 5 (Ad5). La producción del vector se logra a través de un sistema de empaquetamiento de tres fases. Hay varias características novedosas que el vector aporta a este estudio. Es el primer ensayo clínico que utiliza un adenovirus "denudado", lo que reduce el desarrollo de inflamación debida a las proteínas virales. Éste es también el primer estudio clínico dirigido a tejido específico (hígado). Otra ventaja del vector "denudado" es el tamaño mayor del paquete de expresión, lo que permite la incorporación de secuencias como la altamente específica promotora hepática de albúmina. La restricción de la expresión al híg-

do debería aumentar la eficiencia de la expresión al tiempo que reduce la expresión en células presentadoras de antígeno, reduciendo aún más la respuesta inmune.

El MiniAdFVIII ha sido examinado en varios modelos, como el murino. Curiosamente, aunque los vectores adenovirales no son integrantes, la expresión del factor VIII se observó por cerca de un año a partir de una única infusión intravenosa. En ratones no se halló elevación de enzimas hepáticas tras la administración del vector. En modelo primate a altas dosis se observaron trombocitopenia y una mínima elevación de transaminasas hepáticas. No se detectaron efectos adversos significativos en los dos grupos de menor dosis que resultaron en la expresión de niveles terapéuticos de hFVIII.

Ensayo Avigen específico para hígado en hemofilia B. Un estudio propuesto de fase I, dosis única, con búsqueda de dosis por escalada, dirigido al hígado en hemofilia B ha sido aprobado por la FDA. El vector VAA es similar al usado en el estudio en curso, dirigido al músculo, pero contiene la región del locus de control hepático promotora de $\alpha 1$ -antitripsina y potenciadora de apolipoproteína E para inducir la expresión del factor IX. El vector será inyectado directamente en el hígado mediante un abordaje a través de la arteria hepática. En estudios preclínicos en ratas, los niveles de transducción de rVAA en el hígado y la expresión de factor IX humano se incrementaron al doble o hasta cinco veces tras inyección portal o a través de arteria hepática comparados con inyección a través de vena periférica de cola.

Estos estudios iniciales demuestran que la transferencia génica en hemofilia A y B es segura y bien tolerada en los abordajes y dosis usadas. No se ha demostrado ninguna evidencia de formación de inhibidor a pesar de resultados sugestivos de ello en animales. Aparte del único resultado positivo por PCR de una muestra de semen en el estudio Chiron, no se tuvieron eventos adversos atribuibles al tratamiento. Es importante que los cuatro estudios clínicos también demostraron algún grado de

eficacia clínica. Los niveles elevados de factor de la coagulación, definido como factor detectable al menos durante cinco días sin tratamiento con factor exógeno, se observaron en algunos sujetos (*cuadro I*) con niveles de expresión de factor VIII o IX bajos y variables. En estos individuos, y aún en algunos en quienes no había incremento detectable en la expresión del factor, hubo también una reducción en el requerimiento de tratamiento con factor exógeno. Basándose en los resultados a la fecha, la meta ahora es aumentar la expresión sin aumentar el riesgo de toxicidad.

Una tendencia es aumentar la dosis de los agentes disponibles. En los estudios preclínicos de Avigen hubo una clara relación dosis-respuesta entre 1.3×10^{11} y 8.5×10^{12} vp/kg en perros hemofílicos. Esto sugiere que conforme este estudio se desplaza a dosis en el rango de 2×10^{12} vp/kg y mayores podrían anticiparse niveles de expresión aumentados. Curiosamente, no hubo una relación dosis-respuesta clara en el estudio de Chiron. Por arriba de una dosis del vector de uno y medio logaritmos, de 2.2×10^7 a 8.8×10^8 TU/kg no hubo claro incremento en la expresión transgénica. No obstante, la falta de una relación dosis-respuesta predecible podría indicar únicamente que los estudios actuales se encuentran en una dosis umbral. Mientras que el perfil de seguridad en los estudios en marcha apoya un incremento de la dosis, la experiencia de Gelsinger advierte en contra de estos incrementos sin una clara definición de la ventana terapéutica en animales.

Los avances en el desarrollo de vectores continúan y prometen mejorar la eficiencia y seguridad de la transferencia génica. Una de las limitantes con respecto a los retrovirus ha sido su imposibilidad de infectar células en interfase, lo que podría explicar la falta de relación dosis-respuesta del estudio de Chiron. Actualmente se están llevando a cabo estudios en varios laboratorios para evaluar el empleo de factores hepáticos de crecimiento para aumentar el número de células hepáticas en división y por ende aumentar la integración de

retrovirus. La otra área de investigación intensiva en el campo de los retrovirus es el empleo de otros retrovirus de la familia *Lentiviridae*, incluyendo: VIH, virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y virus espumoso humano. Estos vectores conservan algunas de las características atractivas de los vectores virales basados en el Moloney, tales como la integración estable al cromosoma del anfitrión y la integración celular dirigida a través de proteínas de envoltura. Son capaces de infectar células tanto en división

como en interfase, aunque la eficiencia de esto ha sido recientemente cuestionada.

Ha habido muchos otros hallazgos en relación a la terapia génica. Primero, el serotipo de VAA ha mostrado una influencia dramática en los niveles de expresión transgénica. Segundo, los diferentes tipos de miofibrillas (lentas vs rápidas) tienen diferente receptividad para el VAA. Así, el VAA muestra una preferencia por las fibras lentas que correlaciona con la expresión de receptores proteoglucanos para heparán sulfato. Tercero, los

173

Cuadro I.

	Sujeto	Edad	Dosis	Inhibidor	Factor pico*
Estudio Chino – hemofilia B Transducción ex vivo	1	9	11×10^8 células	No	5.92%
	2	13	6.6×10^8 células	No	4.13%
Estudio TKT – hemofilia A Transfección ex vivo	1	N/D	$1-4 \times 10^8$ células	No	N/D
	2	N/D	$1-4 \times 10^8$ células	No	N/D
	3	N/D	$1-4 \times 10^8$ células	No	N/D
	4	N/D	$1-4 \times 10^8$ células	No	N/D
	5	N/D	$1-4 \times 10^8$ células	No	N/D
	6	N/D	$1-4 \times 10^8$ células	No	N/D
Estudio Chiron – hemofilia A Retrovirus	2-1	50	2.8×10^7 TU/Kg	No	1.8%
	5-1	33	2.8×10^7 TU/kg	No	<0.1%
	5-2	30	2.8×10^7 TU/kg	No	3.0%
	3-1	51	9.2×10^7 TU/kg	No	<0.1%
	3-2	55	9.2×10^7 TU/kg	No	1.3%
	5-3	50	9.2×10^7 TU/kg	No	6.2%
	2-2	20	2.2×10^8 TU/kg	No	<0.1%
	3-3	43	2.2×10^8 TU/kg	No	<0.1%
	5-4	18	2.2×10^8 TU/kg	No	4.3%
	1-1	52	4.4×10^8 TU/kg	No	<0.1%
	5-5	48	4.4×10^8 TU/kg	No	1.4%
	5-6	18	4.4×10^8 TU/kg	No	<0.1%
	5-7	20	8.8×10^8 TU/kg	No	N/D
Estudio Avigen – hemofilia B VAA	1	38	2×10^{11} vg/Kg	No	3.7%
	2	23	2×10^{11} vg/kg	No	0.8%
	3	67	2×10^{11} vg/kg	No	<0.3%
	4	29	5×10^{11} vg/kg	No	<0.1%
	5	44	5×10^{11} vg/kg	No	<0.1%
	6	43	5×10^{11} vg/kg	No	1%
	7	38	2×10^{12} vg/kg	No	N/D
	8	30	2×10^{12} vg/kg	No	N/D

*El factor pico se define como el nivel más alto observado en aquellos individuos que demostraron niveles mayores a 1% en al menos dos ocasiones, cinco o más días después de la infusión del factor exógeno. Los individuos que no tuvieron niveles mayores a 1% en al menos dos ocasiones, cinco o más días tras la infusión del factor exógeno presentan niveles basales.

VAA, vector asociado al adenovirus; TU, unidades de transducción; vg, genomas del vector; N/D, no disponible.

Situación Actual y Tendencias en Terapia Génica

estudios continúan evaluando el mecanismo de la integración específica de sitio del VAA. Una mejor comprensión del mecanismo de integración podría conducir a métodos generales de integración dirigida, que reducirían el riesgo de mutagénesis insercional. Cuarto, el VAA parece ser menos inmunogénico que otros vectores, especialmente en comparación con los adenovirus.

En general, los vectores adenovirales han generado los niveles más altos de expresión transgénica y se han asociado con la toxicidad más severa, principalmente en el hígado. Los estudios para modificar tal inmunogenicidad han conducido al desarrollo de vectores adenovirales denudados, a los que se les han removido todas las secuencias de codificación adenoviral. Estos vectores denudados tienen varias ventajas potenciales como no tener proteínas virales a ser expresadas, reduciendo la respuesta inmune celular. Por otra parte, al remover secuencias virales, se pueden acomodar inserciones más extensas, incluyendo promotores tisulares específicos y potenciadores que pueden aumentar aún más la eficiencia y especificidad de la expresión transgénica.

174

Comentario personal

El desarrollo del tratamiento de la hemofilia en sus dos formas principales, A y B, ha venido experimentando un acelerado desarrollo en los últimos años; primero vinieron los productos purificados, para estandarizar y brindar mayor seguridad a es-

tos pacientes, respecto a los aloderivados que hasta entonces representaban todo el arsenal terapéutico. Posteriormente, la tecnología del ADN recombinante nos permitió disponer de mejores y más seguros medios para el control de la hemofilia. Pero todo ello empequeñece frente a las perspectivas futuras que nos plantea la terapia génica. Hasta hace poco ficción, la manipulación del genoma de un organismo hoy se nos ofrece como una alternativa válida en el desarrollo de nuevas armas para combatir la hemofilia. Esto adquiere mayor relevancia si consideramos la inherente mejoría en la calidad de vida del hemofílico, que hasta el día de hoy depende de centros hospitalarios (en el mejor de los casos bajo régimen ambulatorio) y la constante infusión de productos, en muchos casos biológicamente riesgosos. La sola idea de contar con una alternativa terapéutica que logre no paliar ni controlar, sino efectivamente reemplazar la función del gen dañado o disfuncional es prometedora. Sin embargo, la ingeniería genética se encuentra aún dando sus primeros pasos, y pasarán años antes de obtener manejos eficaces que además conjunten un costo bajo y, lo más importante, que sean plenamente seguros para el paciente. Hasta el momento se enfrenta el problema de que los agentes de transferencia más eficientes siguen siendo también los más tóxicos y muchos aspectos de farmacocinética aún no han sido definidos, pero el desarrollo acelerado del área la mantiene como una esperanza para lograr mejor calidad de vida para el hemofílico a mediano plazo.

Traducción, resumen y comentario por: Azucena Z. Ruiz Petatán*

Flow Cytometric Reticulocite Counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: An NCCLS-ICSH Approach.

Buttarello M**, Bulian O**, Farina G**, et al Am J Clin Pathol 2001 Jan; 115(1): 100-111.

* Residente del tercer año de Patología Clínica del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Avenida Cuauhtémoc número 330, col. Doctores, delegación Cuauhtémoc, México, D.F.

** Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Geriátrico de Padua, Italia.

Introducción: el conteo automatizado de reticulocitos se hizo posible desde hace algunos años gracias a los citómetros de flujo. La automatización redujo la imprecisión y la producción de parámetros útiles clínicamente, como la fracción de reticulocitos inmaduros y el índice de reticulocitos. Continúan existiendo problemas que provienen de las diferentes sensibilidades de las muestras usadas para tinción de RNA de reticulocitos, en la tecnología utilizada para identificar células positivas (absorvancia, fluorescencia) y el software que es más o menos capaz de separar reticulocitos de eritrocitos, eritrocitos nucleados y plaquetas. El uso de sangre fresca como un calibrador tiene algunas limitaciones como la pobre estabilidad en tiempo para el conteo de reticulocitos, los cuales tienen maduración progresiva, la falta de universalidad aceptada como método de referencia para medir la concentración de eritrocitos, y la exacta calibración que depende de una manufactura estricta y que no puede ser modificada fácilmente por el usuario. Se han publicado dos estándar: 1) H44-A preparado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), que propone los lineamientos para la evaluación de métodos automatizados del conteo de reticulocitos, y 2) la International Council for Standardization in Haematology (ICSH), que propone el método microscópico como referencia para el conteo de reticulocitos.

Objetivo: el propósito de este estudio fue evaluar cinco analizadores para el conteo de reticulocitos con los lineamientos antes mencionados. Se prestó atención especial a las muestras con muy baja concentración de reticulocitos.

Material y métodos: fueron evaluados en seis semanas cinco analizadores hematológicos con opción de conteo de reticulocitos en automatización completa: CELL DYN (CD) 4000 (software versión 7.5, Abbott, Santa Clara, CA); VEGA RETIC (actualmente denominado PENTRA 120; software versión 3.16, ABX, Montpellier, France); ADVIA 120 (software versión 1.16, Bayer Diagnostic Division, Tarrytown, NY); GEN-S (software versión 1D, Coulter-Beckman, Hialeah, FL); y SE 9500 RET (anteriormente llamado SE-AVANTE; software versión B00-04, Sysmex, Kobe, Japan). Estos analizadores midieron muestras con tinción selectiva de RNA de reticulocitos y sin tinción (eritrocitos). En total, 225 sujetos sanos, de acuerdo con los criterios de NCCLS H44-A, fueron seleccionados para calcular el intervalo de referencia de los analizadores a prueba. Los sujetos fueron hombres y mujeres de 3 a 50 años de edad. De éstos, sólo 126 muestras fueron usadas para el método manual microscópico de referencia. Se analizaron muestras de 115 pacientes con varias afecciones hematológicas; ninguno de estos pacientes recibió transfusiones durante cinco días antes de la recolección de la muestra, la cual se llevó a cabo con venopunción de 5 mL de sangre.

con EDTA. Todas las muestras fueron procesadas en las primeras cuatro horas de recolectada usando los analizadores.

Para el procedimiento microscópico se utilizó azul de metileno (Sigma Diagnostics, St Louis, MO), y los reticulocitos fueron contados de acuerdo a las especificaciones del ICSH. Cada muestra fue analizada por duplicado. Fue comparado el valor obtenido por cada método, en total 256 muestras, para sujetos sanos y pacientes. La comparación con el método manual de referencia fue para todas las muestras y separadamente para el grupo de reticulocitopenia y fue presentada gráficamente con intervalo de confianza de 95%. La utilidad clínica (capaz de distinguir entre condiciones normales y anormales) fue evaluada en muestras de 115 pacientes usando los criterios de NCCLS H20-A y por el ICSH. El conteo absoluto fue clasificado como normal, anormal alto y anormal bajo.

Resultados: los intervalos de referencia en porcentaje y valores absolutos fueron dados en los cinco métodos probados y el método de referencia en donde fue posible distinguir dos grupos: uno consistió en el método microscópico de referencia, SE 9500 RET y GEN-S con una media de 34 y $46 \times 10^3/\mu\text{L}$, y el otro consistió en ADVIA 120, el CD 4000 y el VEGA RETIC con una media entre 57 y $60 \times 10^3/\mu\text{L}$. El comportamiento también fue evidente para las muestras con reticulocitopenia con $4.1 \times 10^3/\mu\text{L}$ para SE 9500 RET, $6.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ para CD 4000, $6.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ para ADVIA 120, $10.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ para GEN-S y $11.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ para VEGA RETIC. La imprecisión de todos los métodos disminuyó conforme la concentración de reticulocitos aumentó y no hubo diferencia significativa en resultados obtenidos en estudios similares. Hubo menor imprecisión en todos los métodos automatizados que en el método microscópico. Los re-

176

sultados indican que la menor imprecisión fue para SE 9500 RET y CD 4000, seguido de GEN-S y luego de VEGA RETIC y ADVIA 120.

Discusión: la popularidad de los equipos automatizados depende de la posibilidad de reemplazar el método manual. Las ventajas que derivan de la precisión y conteo objetivo son, sobre todo en valores bajos, necesarias para el diagnóstico de anemias hipoplásicas o para el monitoreo oportuno de regeneración eritropoyética de la médula ósea. Una ventaja de los métodos automatizados, no considerada en este estudio, es la identificación de otros parámetros como la fracción de reticulocitos inmaduros o el índice de reticulocitos, el volumen de reticulocitos o su contenido de hemoglobina, el cual es útil en varias condiciones clínicas. Para propósitos de diagnóstico, en concentraciones elevadas, la sensibilidad clínica fue excelente, lo cual no fue cierto para bajas concentraciones en donde varios sistemas redujeron su sensibilidad a condiciones no óptimas. La imprecisión de los métodos automatizados fue notablemente menor que el método manual en muestras con concentraciones bajas.

Comentario: la necesidad del procesamiento de mayor número de muestras en menor tiempo, con adecuado control de calidad y mayor exactitud ha llevado a crear métodos, con el empleo de equipos automatizados, que superan los métodos tradicionales o manuales, los cuales son imprecisos. Sin embargo, de acuerdo a este estudio tal objetivo no se ha logrado del todo para concentraciones bajas de reticulocitos. Esto crea la necesidad de integrar equipos automatizados en nuestros laboratorios, aunados con el empleo del método manual para afecciones hematológicas especiales. Es importante no desechar todavía el método manual ya que sigue siendo método de referencia para el conteo de reticulocitos.