

## Requerimientos metodológicos para el óptimo aprovechamiento del análisis de imagen automatizado y el futuro de esta técnica\*

A. TOLEDANO.

Instituto Cajal. CSIC. Madrid.

Cada vez con mayor frecuencia se llenan los laboratorios de equipos automatizados cuya misión es facilitar las tareas repetitivas, bien porque existen muchos casos diferentes a analizar o bien porque en un único caso son muchísimas las preparaciones que deberían ser estudiadas para llegar a conclusiones estadísticamente fiables. Estos métodos automatizados, y los equipos técnicos que realizan los trabajos, son objeto de una controversia tanto nacional (1,2) como mundial (3,4) que ya ha adquirido caracteres de cronicidad. En España, tanto en Centros de Investigación como en laboratorios de Anatomía Patológica, existen grupos que emplean equipos de análisis de imagen con resultados muy sobresalientes desde hace muchos años, mientras que en otros existen todavía muchos recelos, especialmente en los casos en que ha de emitirse un diagnóstico o un pronóstico clínico.

A los efectos médicos de diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento, el análisis del ADN celular en diversos tipos de muestras (biopsias, extendidos citológicos, células de fluidos) está adquiriendo cada vez mayor importancia y el interés hace que sea tema de discusión en revistas y congresos internacionales. Con el ánimo de colaborar en la clarificación de la polémica y de lograr resultados con alta significación estadística, reproducibilidad y fiabilidad, expongo las siguientes consideraciones fruto de la experiencia investigadora en histoquímica, tanto en el plano experimental como en la aplicación en patología humana:

A) Se deben cumplir siempre unos requisitos metodológicos generales para la obtención de los resultados perseguidos. Aunque en el lenguaje más coloquial muchos autores se refieren a ellos con el apelativo de "mínimos" (3), se debe considerar/sustituir el calificativo por "indispensables". Entre ellos destacaría: 1) buena calidad de las muestras; 2) buena calidad y reproducibilidad de las técnicas de tinción del ADN; 3) equipos técnicos contrastados y personal debidamente entrenado; 4) empleo rutinario de muestras control para detectar inmediatamente variaciones en los resultados; 5) realización programada de métodos comparativos para asegurar la reproducibilidad; 6) medida del número suficiente de células para que los resultados del estudio sean estadísticamente significativos para poder llegar a una conclusión diagnóstica de certeza.

B) En cada caso en concreto, existirán unas indicaciones precisas para la realización de este tipo de análisis. En la actualidad se tienen datos concluyentes de la utilidad y fiabilidad del método en determinadas patologías y en determinadas fases/aspectos de las mismas (p.e. mieloma múltiple (5); lesiones melanocíticas (6); carcinoma de mama (2,4,7); cáncer laríngeo (8), de hígado (9), de próstata (3), de ovario (10), etc. Sin embargo, se puede señalar que, de manera general, las aplicaciones rutinarias del método tienen (y tendrán) su mayor utilidad en: 1) lesiones mal definidas citológicamente si la actitud del clínico va a depender del diagnóstico (p.e. las lesiones "borderline", muchas displasias, los tumores de evolución muy variable o imprevisible); y 2) la gradación de la malignidad tumoral, si precisa el clínico de ella para adoptar diferentes tipos de tratamientos.

C) El análisis de imagen del ADN no debe entenderse como una técnica con metodología propia y que está aislada del contexto de otras investigaciones o la aplicación de otras técnicas. 1) En primer lugar, el análisis de imagen de células teñidas para evidenciar su ADN puede facilitar información básica sobre dos hechos (conjunta o separadamente): a) la existencia de un mayor o menor contenido de ADN (aneuploidía, poliploidía, etc) y/o b) la forma y tamaño de las masas de cromatina que pueden ser más o menos aberrantes desde que se presentan los cambios morfometabólicos iniciales hasta que llega la necrosis o apoptosis celular. 2) En segundo lugar, la cuantificación del ADN puede hacerse de diferente manera según el tipo de tejido o muestra biológica, o según el tipo de ADN que queramos analizar. La citología de flujo es útil para analizar los tumores de la sangre o las células tumorales aisladas (bien primariamente libres como las del líquido ascítico,

Correspondencia: A. Toledano. Instituto Cajal, CSIC. Avda. Dr. Arce 37. 28002 Madrid.

\* Extracto de la conferencia pronunciada en el XIII International Congress of Citology (Madrid. Mayo 1995).

o bien las obtenidas de tejidos mediante aislamiento celular). El análisis de imagen tiene su mayor utilidad en el análisis de núcleos (en células o aislados) obtenidos por cualquier método. Los estudios cromosómicos (citogenéticos) explican más pormenorizadamente las causas de los cambios en el ADN. Finalmente, el análisis genético produce y producirá el mayor avance en el estudio y manejo de tumores y el análisis de imagen evolucionará hacia el estudio específico de genes y secuencias especiales de ADN mediante técnicas de "hibridación in situ" y distintas adaptaciones de la PCR ("reacción en cadena de la polimerasa") que podrán amplificar hasta hacer detectables en los núcleos la existencia de esos ADN claves para la medicina, como ya se hace ahora en geles en los que se separan nucleótidos o secuencias de ADN.

D) Por último, hay que tener en consideración que el análisis de imagen no sólo está dedicado, como hasta ahora hemos mencionado, al estudio del ADN, sino que se aplica a todos los métodos histoquímicos en general (citoquímicos convencionales, enzimológicos, inmunocitoquímicos, autorradiográficos, genéticos, etc.) con resultados muy sobresalientes en muchos terrenos de la biomedicina. Sin embargo en la práctica médica, el avance de estos métodos que pueden dar cuenta de cambios en componentes, enzimas, receptores, segundos mensajeros, proteínas, genes, etc, sólo puede ser considerado de gran altura en estudios de investigación y en la diferenciación de algunos tipos concretos de tumores.

## CONCLUSION

El análisis de imagen automatizado, llevado a cabo con el cumplimiento estricto de unos requisitos metodológicos indispensables está produciendo resultados muy útiles para el diagnóstico y seguimiento de muchos tipos de tumores. Su principal aplicación actual es la cuantificación y, a veces, cualificación del ADN. Sin embargo, en un futuro se aumentarán las aplicaciones analizando cambios en componentes y funciones nucleares y citoplasmáticos. Cada vez son más los "marcadores" útiles que pueden definir un proceso patológico o una fase del mismo.

## AGRADECIMIENTO

A la Lda. M.I. Alvarez que colaboró en la redacción del escrito.

## BIBLIOGRAFIA

1. Toledado A, Bentura ML, Barca MA, Díaz MG. Cuantificación de reacciones histoquímicas a nivel de la microscopía óptica y reconstrucción tridimensional celular. *Citología* 1985; 7: 5-22.
2. Azúa J, Romeo P, Serrano M. Estudio comparativo

- entre el área nuclear y cuantificación de ADN en el cancer de mama. *Patología* 1995; 28: 141-145.
3. Kalkmer UG. Methodologic sources of errors in image and flow cytometric DNA assessments of the malignancy potential of prostatic carcinoma. *Human Pathol* 1992; 23: 360-367.
4. Seigneurin D, Louis J, Villoud MC. The value of DNA image cytometry for the cytological diagnosis of well-differentiated breast carcinomas and benign lesions. *Anal Cell Pathol* 1994; 7: 115-125.
5. Kropff M, Leo E, Steinfurt G, Esselborn H, Adler CP, Bocking A. DNA-image cytometry and clinical staging systems in multiple myeloma. *Anticancer Res* 1994; 14: 2183-2188.
6. Schmidt B, Weinberg DS, Hollister K, Barnhill RL. Analysis of melanocytic lesions by DNA image cytometry. *Cancer* 1994; 73: 2971-2977.
7. Sperb R, Arnold W, Bahr GF, Loning T, Gebbers JO. Comparative DNA image cytometry in imprint-cytospin - and tissue section preparations of breast carcinoma. *Anal Cell Pathol* 1993; 5: 265-275.
8. Munck-Wikland E, Edstrom S, Jungmark E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G. Nuclear DNA content, proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) and p53 immunostaining in predicting progression of laryngeal cancer in situ lesions. *Int J Cancer* 1994; 56: 95-99.
9. Orsatti G, Arnold MM, Paronetto F. DNA image cytometric analysis of primary clear cell carcinoma of the liver. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 1226-1229.
10. Wagner TM, Adler A, Sevela P, Assmann I, Knepfle CF, Czerwenka K, Heinzl H, Ploem-Zaaijer JJ. Prognostic significance of cell DNA content in early-stage ovarian cancer (FIGO stages I and II/A) by means of automatic image cytometry. *Int J Cancer* 1994; 56: 167-172.