CUADERNOS DEL HOSPITAL DE CLINICAS • Volumen 47 Número 2

VALIDACION DEL METODO MISPHO PARA EL DIAGNOSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS

MISPHOS´S DIAGNOSTIC METHOD VALIDATION FOR ACUTE LEUKEMIA

PREMIO A LA MEJOR TESIS, FACULTAD DE BIOQUIMICA 2000

Vasquez A. *
Amaru R. **
Navia P. **
Arias A. **
Peñaloza R. **
*Cuevas H.***

Correspondencia a:
Lic. Aneth Vasquez Michel
Email: AVM latinmail.com

RESUMEN

Pregunta de investigación:
¿Cuales son los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las pruebas morfológicas, citoquímicas e inmunofenotipo desarrolladas en el método MISPHO para el diagnóstico de Leucemias Agudas en sujetos de ambos sexos en todo grupo etáreo?

Objetivos:
* Determinar los valores de sensibilidad especificidad y valores predictivos de las pruebas morfológicas, citoquímicas e inmunofenotipo desarrolladas en el método MISPHO para el diagnóstico de Leucemias Agudas en sujetos de ambos sexos en todo grupo etáreo.
* Conocer a través de estadística descriptiva el comportamiento de otras variables en estudio

Diseño :
Test diagnóstico

Lugar:
Unidad de Biología Molecular, Instituto de Genética, Fac. Medicina UMSA

Población:
44 casos y 20 controles por cálculo muestral en ambos sexos y de grupo etáreo diverso y que realizaron sus exámenes hematológicos en la Unidad mencionada.

Métodos:
Se recolectó médula ósea para realizar las pruebas morfológica, citoquímica, inmunofenotipo y determinación de daños moleculares, se llenó una hoja de registro con datos personales, antecedentes generales y parámetros hematológicos.
Se utilizó estadística descriptiva, test de significancia , t-test, chi2, tablas de contingencia de 2 x 2 .

Resultados:
Se observó que no existe asociación sexo- enfermedad con P de 0,279. No existe diferencia entre los promedios de edad de los pacientes con la enfermedad con P de 0,652.
La sensibilidad del método para el diagnóstico de leucemia linfoblástica es de 100 %, especificidad 100 %, valores predictivos positivos y negativos 100 %.
La sensibilidad del método para el diagnóstico de leucemia mieloide es de 83 %, especificidad 100 %, valor predictivo positivo 100 % y valor predictivo negativo 90 %.
La sensibilidad, especificidad y valores predictivos tanto negativo como positivo del método MISPHO global son del 100 %.

Conclusiones:
Los métodos utilizados son altamente sensibles y específicos, así mismo los valores predictivos comprueban que el método MISPHO es válido y aplicable para el diagnóstico de Leucemias Agudas con la aplicación de recursos mínimos.

PALABRAS CLAVES: Leucemia Aguda; Leucemia Linfoblástica, Leucemia Mieloide, Morfología; Citoquímica; Inmunofenotipo; Daño Molecular

SUMMARY

Research question:
Which are the sensitivity, specificity, and predictive values of the morphology, cytochemistry and inmunophenotype tests, developed by the MISPHO method for Acute Leukemia diagnosis in individuals of both sexes and within an age group of patients?

Objectives:
* To determine the sensitivity, specificity, and predictive values of the Morphology, Cytochemistry and Inmunophenotype tests developed by the MISPHO method for Acute Leukemia diagnosis, in individuals of both sexes and within an age group of patients .
* To known by descriptive statistics the behavior of other research variables.

Design:
Diagnostic Test

Place of work:
Paolo Belli´s Molecular Biology Unit , Genetic Institute, Medicine School. U.M.S.A

Population:
44 cases and 20 controls within an age group, all of whom attended the affore mentioned laboratory for us to take and process haematology tests.

Methods:
We harvested bone marrow and peripheral blood to fullfill the Morphology, Cytochemistry , Inmunophenotype and Molecular tests , besides the patients filled a registration document with personal details, general record and haematology parameters.
We used descriptive statistics, significance test, t-test,chi2 and contingency boxes 2x2.

Results:
There is no association between sex and sickness P 0,279. There is no difference between the average age and patients with the sickness P 0,652.
The method's sensitivity for Acute Linphoblastic Leukemia is 100 %, especificity is 100%, positive and negative predictive values are 100 %
The method´s sensitivity for Acute Mieloid Leukemia is 83 %, especificity is 100 %, positive predictive value of 100 % and negative predictive values are 90 %
The MISPHOS method's sensitivity , especificity , positive and negative predictive value are 100 %

Conclusions:
The methods used are highly sensitive and specific, so the predictive values prove that the MISPHOS method is valid and applicable for Acute Leukemia diagnosis, with a minimal investments of resources.

KEY WORDS: Acute Leukemia, Linphoblastic Leukemia, Mieloid leukemia, Morphology, Cytochemistry; inbmunophenotype, Molecular Damage

* Facultad de Bioquimica
** Fac de Medicina UMSA, Instituto de Genética - Unidad de Biología Molecular

INTRODUCCION

Las leucemias son enfermedades de origen no bien conocido, caracterizadas por fallas en la diferenciación y proliferación de una clona de células inmaduras de la hematopoyesis (blastos) que invaden la médula ósea y la sangre periférica (1).

Los últimos avances en el diagnóstico Oncohematológico han contribuido notablemente a la clasificación de las Leucemias según riesgo y pronóstico para su mejor tratamiento. Estos avances se basan sobre todo en las técnicas de Inmunofenotipo y Biología Molecular, técnicas altamente sensibles que permiten el diagnostico de Leucemias y la determinación de la enfermedad residual mínima(1). Sin embargo la aplicación apropiada de estos métodos no es posible tanto en nuestro país sino en la mayoría de los países subdesarrollados debido al alto costo que implican.

Es en este sentido que la escuela Monza's International School of Pediatric Hematology Oncology (MISPHO) considerando estas limitaciones a agrupado a la mayoría de los países Iberoamericanos con el fin de cooperar en el campo de la Oncohematología siendo la principal recomendación desarrollar y validar un método de diagnóstico completo que contemple estudios: Morfológico (que tiene por objeto el de determinar las características de las células como forma, núcleo, cantidad de citoplasma, etc.), Citoquímicos (basados en la actividad enzimática y estructura bioquímica diferentes de acuerdo al tipo de línea celular y estado de maduración), Inmunofenotipo (cuyo objetivo no es el de detectar la Leucemia, sino el de asignar el linaje a la proliferación blástica ya establecida) y Biología Molecular (que permite la caracterización de las alteraciones moleculares presentes en estos pacientes) modificaciones que hagan a este método factible, fiable, reproducible y de bajo costo de acuerdo a la realidad de estos países.

Este trabajo pretende determinar los valores de sensibilidad especificidad y valores predictivos de las pruebas desarrolladas en el método MISPHO para el diagnóstico de Leucemias Agudas en sujetos de ambos sexos en todo grupo etáreo, además de conocer a través de estadística descriptiva, el comportamiento de otras variables en estudio.

MATERIAL Y METODOS

Diseño de investigación.

Para la validación del método se asumió el diseño de Test Diagnóstico

Población

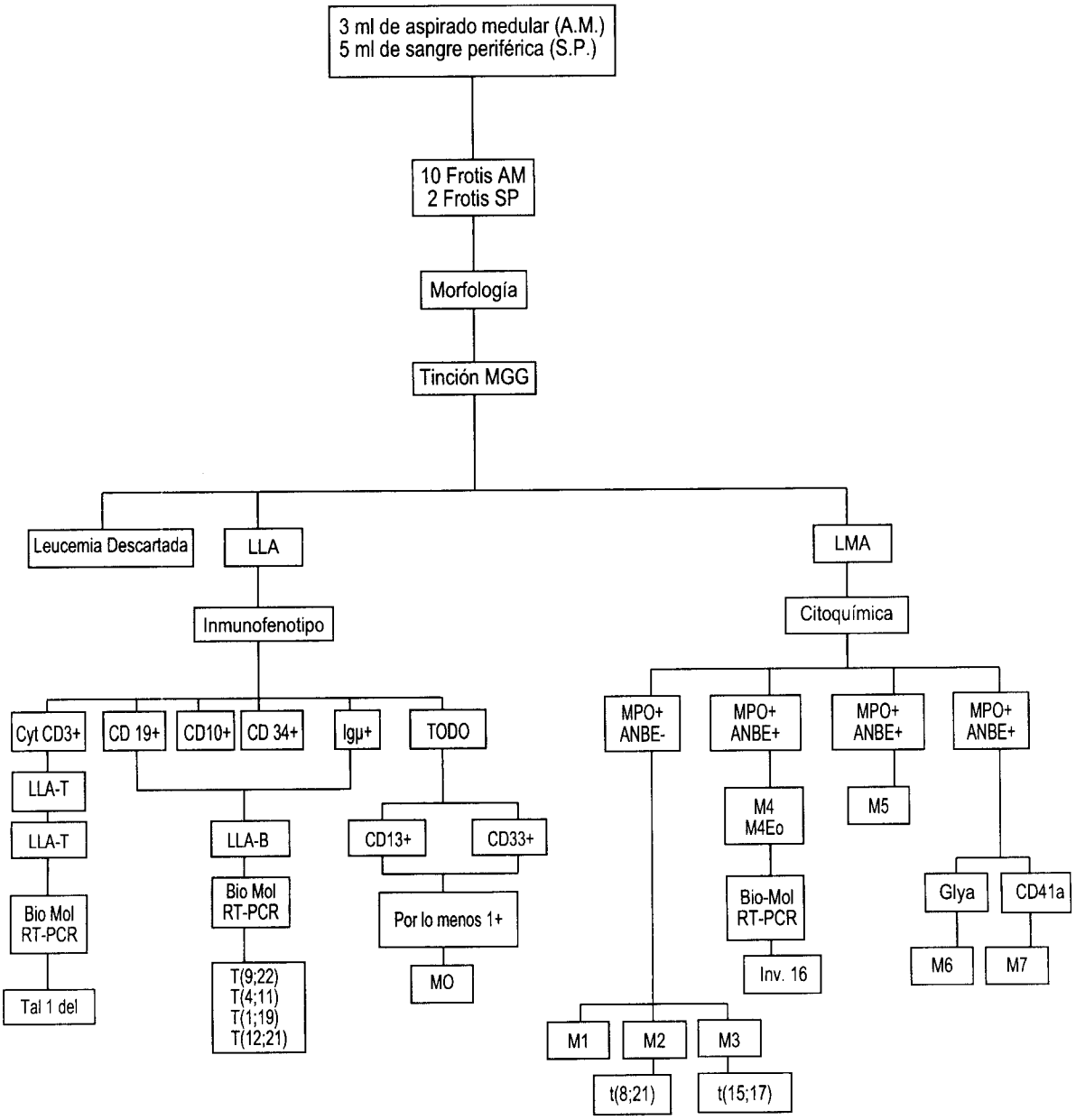
La obtención del tamaño de muestra se realizó en la base de datos EPI-INFO versión 6.0 para un intervalo de confianza estimado del 95 %, una potencia estimada de la prueba del 80 %, determinándose un tamaño muestral de 64 individuos con una relación de 44 pacientes enfermos y 20 controles

Muestras de estudio

A todos los pacientes referidos a la Unidad de Diagnóstico Molecular Paolo Belli, se les anotó datos generales de acuerdo a la ficha de registro con datos personales, edad, sexo, ocupación, antecedentes de tratamiento previo y diagnóstico clínico. Se procedió a la toma de muestra de 5ml de sangre periférica y 3ml de aspirado medular. El transporte de muestras se realizó en tubos Vacutainer (MSB) con EDTA-K3. Las muestras enviadas del interior del país llegaron en no menos de 36 horas.

Procedimiento de las muestras

Procedimiento de las muestras



Pruebas morfológicas:
Para el estudio de las características morfológicas de las células tanto mieloide como linfoide se siguieron los criterios propuestos por el grupo cooperativo Franco Americano - Británico (FAB). Se utilizó la tinción de May Grunwald - Giemsa , que originalmente utiliza agua tamponada [2], en este estudio se reemplazo la misma por agua destilada ya que no se observaron diferencias en la calidad de la tinción.

Pruebas citoquímicas
Se utilizaron las técnicas de:
Alfa Naftil Butirato Esterasa (ANBE) preparando una mezcla con 0,5 ml de $NaNO_2$ + 0,5 ml de pararosanilina + 100 ml de tampón fosfato + 7ml de solución sustrato, un precipitado de color naranja marron brillante en las células permitirá la diferenciación entre células de la serie monocítica donde la reacción es positiva y la serie neutrofílica donde la reacción es negativa. Mieloperoxidasasa (MPO) utilizando un reactivo con 10 ml de Tris HCl 0,5 M a pH 7, 5 mg de Diaminobencidina,0.1 ml de H_2O_2 al 1% cuyo precipitado pardo negruzco permite la observación de la serie granulocítica. Estas técnicas no fueron modificadas [2].

Pruebas de inmunofenotipo:
Para esta prueba se utilizó la técnica de Anti-fosfatasa Alcalina Anti-Fosfatasa (APAAP). En la técnicas convencionalmente utilizadas se aplican dos fijadores : acetona y tampon formol - acetona (BFA) [2]. En este estudio solo se utilizó acetona como fijador ya que no exístia variación en los resultados.

Los anticuerpo monoclonales utilizados fueron CD3cyt, CD19, CD10 para LLA, CD13, CD33, Gly A, CD61 para LMA.

Biología molecular
Los estudios para detección de daños moleculares se realizaron utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con protocolos diseñados por la European BIOMED-1 Concerted Action [3], para cuyo procedimiento se aislaron células mononucleares en medio LSM, posteriormente se realizó la extracción de Acido Ribonucleico (RNA) mediante el método Fenol - Cloroformo [4].

Debido a que la PCR no se aplica al RNA, es necesario convertir este en cDNA, para ello se utilizá la técnica de RT-PCR donde se utiliza RNA total; extraído de células mononucleares, con cebadores al azar (BOEHRINGER), se somete a desnaturalización, posteriormente se añade tampón para transcripción reversa (RT); Ditiotreitol (DTT); dNTP, inhibidor de RNasa y finalmente 50 U del enzima Reversa Transcriptasa (GIBCO BRL). La transcripción reversa se realizó en un termociclador HYBAID (EUROCLON).

Para la amplificación de cDNA por PCR se utiliza cDNA, en un volumen final que contenga tampón de PCR ; dNTP; oligonucleótidos 5´-3´ diseñados por la European BIOMED-1 Concerted Action [3] para las alteraciones cromosomicas : t (9;22) con el gen de fusión BCR-ABL p210 ,p190 ; t (1;19) con el gen de fusión E2A-PBX1 ; t (12;21) con el gen de fusión TEL-AML-1 ; (4;11) con el gen de fusión MLL-AF4 ; para LLA-B y LMC; t (15;17) con el gen de fusión PML-RAR(para leucemia Promielocítica o LMA-M3; t (8;21) con el gen de fusión AML1-ETO para LMA-M2; Inv 16 con el gen de fusión CBF(-MYH11 para LMA-M4 y la microdeleción cromosomal en 1p32 con el gen de fusión SIL-TAL1 para LLA-T y finalmente Taq DNA polimerasa (BOEHRINGER). La amplificación se realizó en un termociclador HYBAID (EUROCLON).

Se utilizaron como controles positivos a pacientes previamente diagnosticados con el daño molecular de interés y como control negativo se utilizó agua bidestilada. La detección de los fragmentos amplificados, se realizó en gel de agarosa al 1 % en tampón TBE 1X, a 80 voltios por 30 minutos ; visualizándose los productos con Bromuro de Etidio a luz UV. La comparación de los fragmentos obtenidos se realizó con el marcador de peso molecular VIII (1114-19 pb) (BOEHRINGER).

Análisis estadístico de los resultados:
Para los cálculos de estadística descriptiva, se utilizó el paquete estadístico STATA 6.0. en el cual se obtuvieron promedio, desviación estándar, mediana. Los valores reportados como porcentajes o variables continuas (porcentajes de tipos y subtipos de Leucemia, edad) fueron sujetos de las pruebas "t"-student obteniéndose el "p" de significancia. Para la variable dicotómica sexo se

empleó el chi2 para obtener el coeficiente "p" de significancia. Se utilizó el programa EPI-DATA para los cálculos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos , los mismos que corresponden al análisis de test diagnóstico.

RESULTADOS

Fueron estudiados 62 sujetos de los cuales en 42 se confirmó el diagnóstico de Leucemia, los restantes 20 pacientes presentaron otro tipo de alteraciones hematológicas. Las características de estos pacientes se describen en (tabla 1).

TABLA 1. Descripción de edad en el grupo de estudio

EDAD	X	SD	EDAD MIN	EDAD MAX	MEDIANA	INTERVALO DE CONFIANZA 95%	SEXO
Grupo Total	24,5	20,6	3	79	19	-	-
Varones	23,7	21,9	3	79	18	15,87-31,46	53 %
Mujeres	25,5	19,2	4	76	20	18,14-32,76	47 %

TABLA 2. Asociadon del sexo y edad con la enfermedad

PRUEBA	P	INTERPRETACION
Chi2	0,279	No significativo, no existe asociación sexo enfermedad
t-test	0,6519	No significativo, no existe diferencia entre los dos promedios de edad entr pacientes varones y mujeres con Leucemia

Se demuestra que no existe asociación significativa entre sexo y edad, presentándose el mismo rango de edad en ambos sexos (tabla 2).

En cuanto a la relación sexo con tipo de Leucemia tanto varones como mujeres siguen las mismas tendencias presentándose un mayor porcentaje de LLA que de LMA (tabla 3).

Los porcentajes de los diferentes tipos y subtipos de Leucemia se detallan en (tabla 4)

TABLA 3. Relación sexo con tipo de leucemia

TIPO DE LEUCEMIA	VARONES	MUJERES
Leucemia Linfoblástica Aguda	63,64%	78,26%
Leucemia Mieloide Aguda	36,36%	21,74%

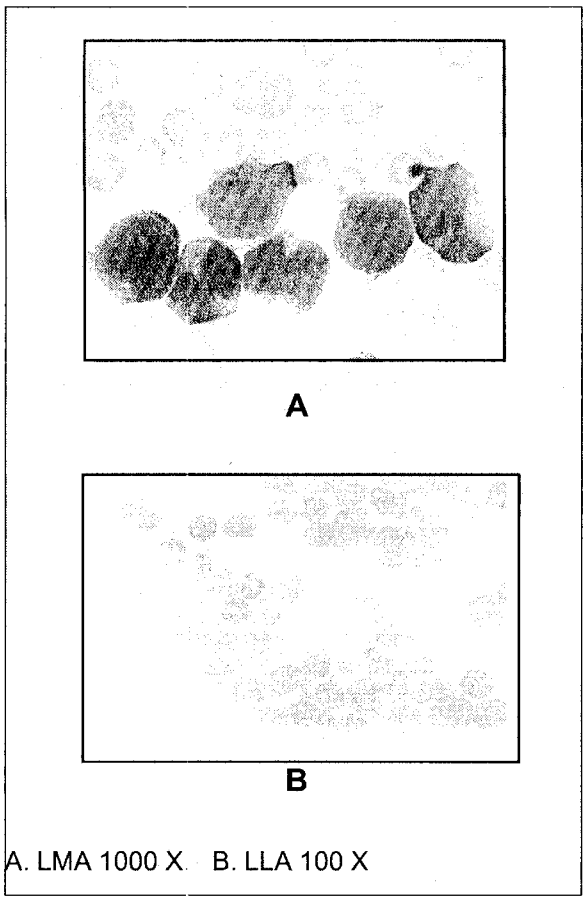
TABLA 4. Descripción del grupo de casos y controles

LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA			LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA								SANOS
50 %			19 %								31%
TIPO	LLA-B	LLA-T	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	
TOTAL SUBTIPO	28	4	2	1	1	5	3	0	0	0	20
PORCENTAJE SUBTIPO	87 %	13 %	17%	8%	8%	42%	25%	0	0	0	

Estandarización y modificación de las técnicas

El examen morfológico se realizó con la tinción May Grunwald -Giemsa (fig1).

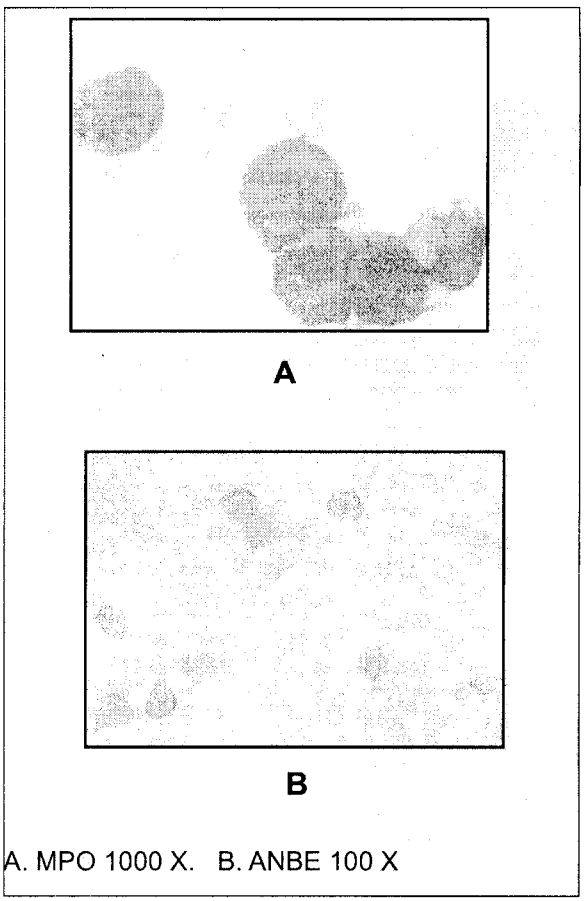
FIG. 1. Frotis de Medula osea, de Leucemia Aguda. Tinción May Grunwald Giemsa



A. LMA 1000 X. B. LLA 100 X

Las pruebas escogidas para el estudio citoquímico fueron: la mieloperoxidasa y alfa naftil butirato esterasa (fig2). Para el estudio de inmunofenotipo se aplicó la técnica inmunoenzimática Fosfatasa Alcalina Antifosfatasa, en el proceso de estandarización se procedió a la modificación de algunos pasos de la técnica, sin embargo la principal diferencia con otros estudios es el reducido panel de AcMo empleados (ver descripción en metodología). Los resultados obtenidos luego de la aplicación de este estudio modificado fueron los mismos que con protocolos originales. Además se confirmaron los resultados por comparación con datos obtenidos por citometría de flujo. Dicha comparación fue realizada con la colaboración del Instituto de Investigaciones M.Tettamanti de Monza-Italia (datos no publicados por la Unidad de Biología Molecular Paolo Belli Instituto de Genética).

FIG. 2. Reacciones citoquímicas positivas en frotis de Médula Osea de pacientes con LM

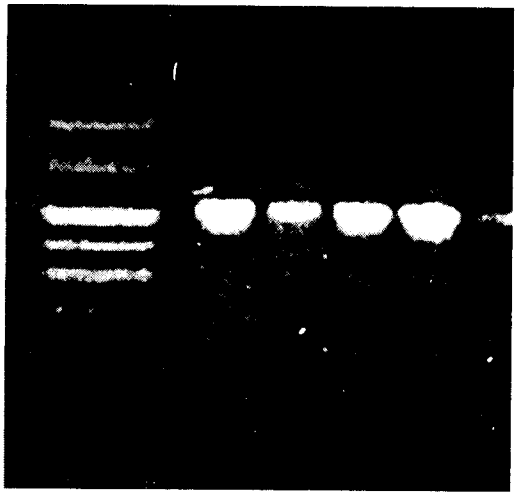


A. MPO 1000 X. B. ANBE 100 X

La última etapa de estandarización correspondió al estudio molecular, concretamente a técnicas de extracción de RNA, por el método Fenol-Cloroformo, RT-PCR y PCR. La estandarización inicial de las técnicas se realizó en el Instituto M.Tettamanti en Monza-Italia con controles positivos y negativos de pacientes confirmados. Posteriormente estos mismos controles positivos fueron aplicados para la estandarización de las técnicas en nuestro laboratorio. Con el objeto de aminorar costos en la técnica de transcripción reversa , se procedió a la estandarización del RT-PCR realizando variaciones en la concentración de la enzima Reversa Transcriptasa , se probaron diferentes concentraciones, la original es de 200 UI, se utilizaron 150 UI, 100 UI , 50 UI , 10 UI y 5

UI , resultando 50 UI la concentración más baja a la cual se obtuvieron productos, a concentraciones de 10 UI y 5 UI no se obtuvieron buenos resultados (fig 3).

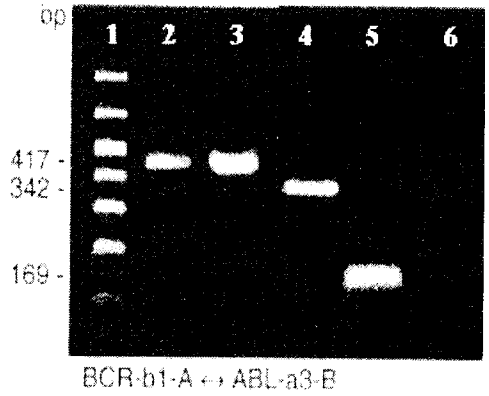
FIG. 3. Electroforesis en Agarosa de los productos de PCR obtenidos a diferentes concentraciones de enzima transcriptasa reversa.(Rtasa)



(1) Marcador de peso molecular, (2). 200UI Rtasa, (3) 150 UI Rtasa
(4) 100 UI Rtasa, (5) 50M UI Rtasa, (6) 10 UI Rtasa, (7) 5 UI Rtasa

Los resultados del análisis de daños moleculares en los pacientes estudiados fueron los siguientes: de los 28 pacientes con LLA-B solo en un paciente se identificó la presencia de t (9;22) p210 (fig4)en los restantes no se identificó ninguna de las alteraciones moleculares descritas. En los 4 pacientes con LLA-T tampoco se identificó el daño testado. Por otro lado se evidenció la presencia de t (15;17) en todos los casos de LMA-M3, tanto para la variable hipergranular (transcrito BCR1) como para la variable microgranular (transcrito BCR3). En el resto de los casos no se evidenció la presencia de daños moleculares (fig 5).

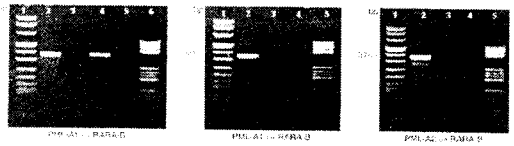
Fig. 4. Electroforesis en Agarosa de los productos de PCR translocación
9:22, P 210



(1) Marcador de peso molecular, (2). paciente, (3) Control positivo transcrito b3 a2 (4) Control positivo transcrito b2 a2 (5) Control positivo transcrito b2 a3

NOTA: Los controles positivo corresponden a pacientes que dieron positivos al examen de la traslocación

FIG. 2. Reacciones citoquímicas positivas en frotis de Médula Osea de pacientes con LM



A. BCR1 (1) Marcador de peso molecular,
(2) Paciente positivo,
(3) Paciente negativo, (4) Control positivo,
(5) Control negativo,
(6) Marcador de peso molecular.

B. BCR2 (1)Marcador de peso molecular,
(2) Paciente positivo,
(3) Paciente negativo, (4) Control negativo,
(5) Marcador de peso molecular.

C. BCR3 (1) Marcador de peso molecular,
(2) control positivo,
(3) Paciente negativo.

Análisis de test diagnóstico

En cuanto al análisis estadístico del test diagnóstico desarrollado por el MISPHO, se procedió al cálculo de la sensibilidad y especificidad que nos permiten la descripción de la "precisión" de las pruebas de diagnóstico; además del cálculo de otras dos medidas que orientan de manera directa a la estimación de la probabilidad de la enfermedad, siendo estos los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos.

El análisis estadístico del test para LLA se basa tanto en la morfología como en el inmunofenotipo, dicho análisis muestra los siguientes resultados: 32 pacientes fueron positivos por ambas pruebas, no se tuvo ningún falso positivo ni falso negativo, 20 pacientes tuvieron resultados negativos, estos últimos corresponden al grupo de pacientes control, es decir con otro tipo de enfermedades hematológicas. Por tanto la sensibilidad del método es de 100 %, la especificidad 100 %, el valor predictivo positivo 100 % y el valor predictivo negativo 100 %. Lo que demuestra que el método MISPHO aplicado al diagnóstico de LLA es altamente sensible y específico (tabla 5).

TABLA 5. Tabla de contingencia para leucemia linfoblastica aguda

Morfología Citoquímica Inmunofenotipo	**ENFERMEDAD**	**SIN ENFERMEDAD**	
+	32	0	32
-	0	20	20
	32	20	42

Sensibilidad = 100 %
Inmunofenotipo = 100 %
VP+ = 100%
VP- = 100%

TABLA 6. Tabla de contingencia para leucemia mieloide aguda

Morfología Citoquímica Inmunofenotipo	**ENFERMEDAD**	**SIN ENFERMEDAD**	
+	10	0	10
-	2	20	22
	12	20	32

Sensibilidad = 83 %
Especificidad = 100 %
VP+ = 100%
VP- = 90%

El análisis estadístico del test para LMA que aplica los estudios morfológicos, citoquímico y de inmunofenotipo presenta los siguientes resultados: de un total de 12 pacientes con LMA, 10 fueron diagnosticados como positivos por morfología, en 2 pacientes el resultado por morfología dio falsos negativos, sin embargo, la aplicación de las otras dos pruebas nos reveló que estos dos pacientes realmente pertenecían a casos de LMA, no se registró ningún caso de falso positivo y el grupo de pacientes con resultado negativo fue de 20 los mismos constituyen el grupo control. Basados en los datos anteriores el método MISPHO para el diagnóstico de LMA presenta una sensibilidad de 83 %, especificidad de 100 %, valor predictivo positivo de 100 % y valor predictivo negativo de 90 %. Por tanto la sensibilidad y especificidad del método son altas (tabla 6).

Realizando un análisis general del método MISPHO, observamos que 44 individuos con la patología de interés dieron positivos como resultado de las pruebas; 20 individuos sin la enfermedad de interés resultaron por las pruebas verdaderamente negativos, no existieron resultados falsos positivos y falsos negativos en el número total de pacientes. Es así que la sensibilidad del método MISPHO es de 100 %, la especificidad es 100 %, los valores predictivos positivos es de 100 % y los valores predictivos negativos son del 100 %. Por tanto se considera al método MISPHO como válido y aplicable al diagnóstico de las leucemias agudas (tabla 7).

TABLA 7. Tabla de contingencia para el método MISPHO

Morfología Citoquímica Inmunofetipo	**ENFERMEDAD**	**SIN ENFERMEDAD**	
+	44	0	44
-	0	20	20
	44	20	64

Sensibilidad = 100 %
Inmunofenotipo = 100 %
VP+ = 100%
VP- = 100%

DISCUSION

El análisis descriptivo nos permitió conocer ciertas características del grupo de estudio, tales como la asociación sexo y edad de los pacientes con la enfermedad, las mismas que no tuvieron una asociación significativa; indicativo, primero, de que la enfermedad no se encuentra con preferencia en ciertos grupos etáreos y segundo, la ausencia de factores de predisposición o exposición a ciertas edades. Datos corroborados por reportes bibliográficos [5].

Para el diagnostico de LLA se seleccionaron como pruebas útiles, a los estudios morfológicos y de inmunofenotipo, este último muy importante no solo en cuanto a las modificaciones en la técnica sino también en lo referente al reducido número de AcMo que se utilizan en este método ya que reportes bibliográficos[6,7,8] proponen la utilización de un panel bastante numeroso de AcMo que va de 15 a 20. Sin embargo el método MISPHO solamente con la utilización de 5 AcMo (CD3 línea T; CD19, CD10, CD34, clg(línea B), puede determinar no solo la línea celular comprometida sino también el grado de maduración y por ende el subtipo de leucemia . Además es importante resaltar este hecho ya que para este mismo estudio diagnostico en otros institutos de hematología utilizan un amplio panel de AcMo que muchas veces sobrepasa los 30 AcMo [6]. Así mismo para el diagnostico de Leucemias Mieloides Agudas se seleccionaron como pruebas diagnósticas a los estudios morfológicos, dos pruebas citoquímicas (MPO.ANBE) y en algunos casos la inmunofenotipificaciòn. De hecho la utilidad del inmunofenotipo en las LMA se centra en las LMA-M6 (Gly A), LMA-M7 (CD 61) (9) y LMA- M0 (CD13 y/o CD33) en este último caso es particularmente importante el análisis de inmunofenotipo. En el presente trabajo se observaron dos de estos casos (tabla 4). En las otras variantes de LMA prácticamente el único papel de la inmunotipificaciòn es confirmar el diagnostico morfo-citoquìmico.

Además de los estudios ya descritos se realizó también un estudio molecular, aplicando la técnica de PCR, que si bien no la consideramos como prueba diagnóstica, es muy importante, ya que nos permite la caracterización de alteraciones moleculares presentes en ciertos tipos de leucemia, ofreciendo al médico el pronóstico de la enfermedad, lo que permite la medición de la respuesta terapéutica, el seguimiento y la vigilancia del paciente durante y después de su tratamiento, por tanto, la determinación de la enfermedad residual mínima.

Por otro lado si bien en los pacientes con LLA se evidenció solo en un caso la t(9;22), esta traslocación fue determinada en un 100 % de los casos de leucemia mieloide crónica, pero que al tratarse de una leucemia de tipo crónica carece de interés en este trabajo. La no-identificación de daños moleculares en los restantes casos de LLA, podría estar relacionado con el hecho de que este es el primer estudio sobre alteraciones genéticas en leucemias en la población boliviana y estos pacientes bien pudieron presentar otros daños, ya que las alteraciones que tomamos en cuenta para este estudio si bien son las más frecuentes y las de mayor importancia clínica, no son las únicas[1].

En el caso de identificación de daños moleculares en LMA, los resultados demostraron ser más alentadores, verificándose la positividad de un tipo de daño en el 100% de los casos de LMA M3, que dicho sea de paso este hecho resulta de crucial importancia ya que este tipo de leucemia puede tener un pronóstico muy bueno dependiendo del tipo de alteración genética que lo haya desencadenado, es así, que el hallazgo de la t (15;17) es de muy buen pronóstico, a diferencia de otras alteraciones que se presentan en el mismo tipo de leucemia y que si bien el porcentaje es muy bajo su evolución es desfavorable debido que la terapia a seguir es distinta y con resultados poco alentadores. [10,11].

El análisis estadístico para la validación del método MISPHO, estuvo dirigido tanto a las LLA como a las LMA, como se muestra en los resultados en el caso de las LLA, que aplica las pruebas tanto morfológicas como de inmunofenotipo, presenta valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos bastante altos, ya que utilizando estas dos pruebas no se presentaron casos de falsos positivos ni falsos negativos, que pudiesen disminuir la sensibilidad y especificidad del test.

En el caso de las LLA, los resultados muestran que el método es altamente sensible y especifico, pese a que se obtuvo una sensibilidad de 83 %

que desde ya es alto, se registraron dos casos falsos positivos, diagnosticados parcialmente por morfología, que aparentemente eran LLA, sin embargo, posteriormente realizando estudios de inmunotipificaciòn se llegó a la conclusión de que estos dos casos eran LMA de tipo M0. Por tanto aquel 17 % de falsos positivos por morfología lo recuperamos con el análisis de inmunotipificación llegando así a obtener un 100 % de especificidad del método.

Finalmente, si bien este método estadísticamente mostró valores máximos de validez, es importante señalar que algunos tipos de leucemia como ser LMA-M5, LMA-M6, y LMA-7 no se presentaron ya que su porcentaje es muy bajo [62]. Por lo tanto los resultados citados son válidos para todas las leucemias mieloides y linfoides excepto LMA M5, M6 y M7, debido a que no se presentaron.

CONCLUSIONES

El estudio apoya los hallazgos bibliográficos y nos permite ratificar que no existe asociación sexo enfermedad ni tampoco existe una diferencia entre los promedios de edad de los pacientes con enfermedad.

Para el diagnóstico de Leucemia Linfloblástica Aguda por el método MISPHO, son suficientes la aplicación de estudios morfológicos y de inmunofenotipo, los mismos que estadísticamente demuestran sensibilidad, especificidad y valores predictivos altos.

Para el diagnostico de leucemia mieloide aguda por el método MISPHO, se aplican los estudios morfológico, citoquímico y de inmunofenotipo los mismos que por análisis estadísticos son altamente sensibles y específicos, asimismo demuestran valores predictivos altos.

La determinación de alteraciones moleculares en leucemias agudas, demuestra gran importancia tanto en el pronóstico como en el tratamiento de los pacientes.

El hecho de que no existan las alteraciones moleculares descritas en una parte de los pacientes, abre la posibilidad de que existan otro tipo de alteraciones en la población en estudio.

No obstante la modificación de los métodos originales con el fin de aminorar costos de inversión el método propuesto por el MISPHO es totalmente válido y aplicable para el diagnostico de leucemias agudas.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue posible gracias a la cooperación de la asociación Paolo Belli de Bérgamo Italia y al soporte logístico de los profesores Alessandro Rambaldi y Andrea Biondi de Italia. A todo el personal del laboratorio de Biología Molecular Paolo Belli de Bérgamo Italia y del Instituto M. Tettamanti de Monza Italia

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Leavell B.,Thorup O. Fundamentals of Clinical Hematology. 2da.Ed. Philadelphia. Edit.Copyright. 1990. 597p.

2. Vives J., Aguilar J. Manual de tècnicas de laboratorio en hematologia. Barcelona. Edit.Salvat. 1989. 474p.

3. Van Dongen JJM, Macintyre E.A., Gabert J.A., et al. Standardized RT- PCR analysis of fusion genes transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease . Leukemia 211 : 99 B, 1999.

4. Chomazynsky P., Sacchi N., Single step method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate - Phenol- Cloroformo extraction analytical biochemistry 1987, 162, 156-159.

5. Beutler E., Lichtman M., Coller B., Kipps T. Williams Hematology. 5.Ed. New York. Edit Mc Graw Hill. 1995.1668p.

6. Del Vecchio L., Di Noto R., Lo Pardo C., Schavone E., et al . Inmunological classification of acute leukemias. Comments on the EGIL proposals1996. Leukemia 10: 1832-1833.

7. Bene MC., Castoldi G., Knapp W., et al. Proposals for the inmunological

classification of acute leukemias. Leukemia 1995; 9 : 1783- 1786.

8 . Rothe G., Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric malignancies. Leukemia 1996;10:877-895.

9. Bennet JM., Catovsky D., Daniel MT., et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megacaryocyte lineage (M7). Ann Intern Med 1985;103 : 460.

10. Grignani F., Fagioli M., Alcalay M.. et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. Blood 1994; 83: 10-25.

11. Lo coco F., Diverio D., Biondi A. Gnetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. Blood 1999; 94:12-22.

CUADERNOS DEL HOSPITAL DE CLINICAS • Volumen 47 Número 2