

22
2oj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

EVALUACION DE LA RELACION DE LA B₂-MICROGLOBULINA
SERICA CON LA MASA TUMORAL DE LOS LINFOMAS
Y LA ENFERMEDAD DE HODGKIN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ALMA EDNA INZUNZA MONTIEL

Director de Tesis:
Dr. José González Llaven

FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 1989





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E.

CAPITULO I.....	1
INTRODUCCION.	
CAPITULO II.....	3
GENERALIDADES.	
CAPITULO III.....	15
OBJETIVOS.	
CAPITULO IV.....	18
MATERIAL Y METODOS.	
CAPITULO V.....	25
RESULTADOS	
CAPITULO VI.....	39
DISCUSION	
CAPITULO VII.....	42
CONCLUSIONES	
CAPITULO VIII.....	44
BIBLIOGRAFIA	

INTRODUCCION

Los informes actuales sobre las mediciones de los tumores asociados a antígenos, son escépticos ya que muchos de estos análisis fracasaron como posibles marcadores de cáncer. Sin embargo, los estudios sobre serología y marcadores de las enfermedades neoplásicas continúan realizándose como métodos que permitan una segura y temprana identificación de los tumores malignos.

Más recientemente se conoció que el nivel de β 2-microglobulina sérica se incrementa frecuentemente en pacientes con enfermedades malignas especialmente en desórdenes linfoproliferativos de células B, dentro de los cuales están los Linfomas Malignos.

De este modo parece ser que en los Linfomas y Enfermedad de Hodgkin la β 2-microglobulina se correlaciona con la masa tumoral. Por lo tanto la determinación de los niveles de β 2-microglobulina en suero, se considera un método útil para evaluar el tamaño de la masa tumoral de dichos padecimientos.

Las variaciones en la concentración sérica de la β 2-microglobulina relacionada con la masa tumoral, se pueden aplicar en los pacientes con enfermedades linfoproliferativas relacionándola con la actividad, remisión y recaída de los mismos.

GENERALIDADES

PROPIEDADES DE LA β 2-MICROGLOBULINA.

La β 2-microglobulina (β 2-m) es una proteína que fue aislada y caracterizada por primera vez por Berggard y Bearn en 1968 a partir de la orina de pacientes con enfermedades renales (1).

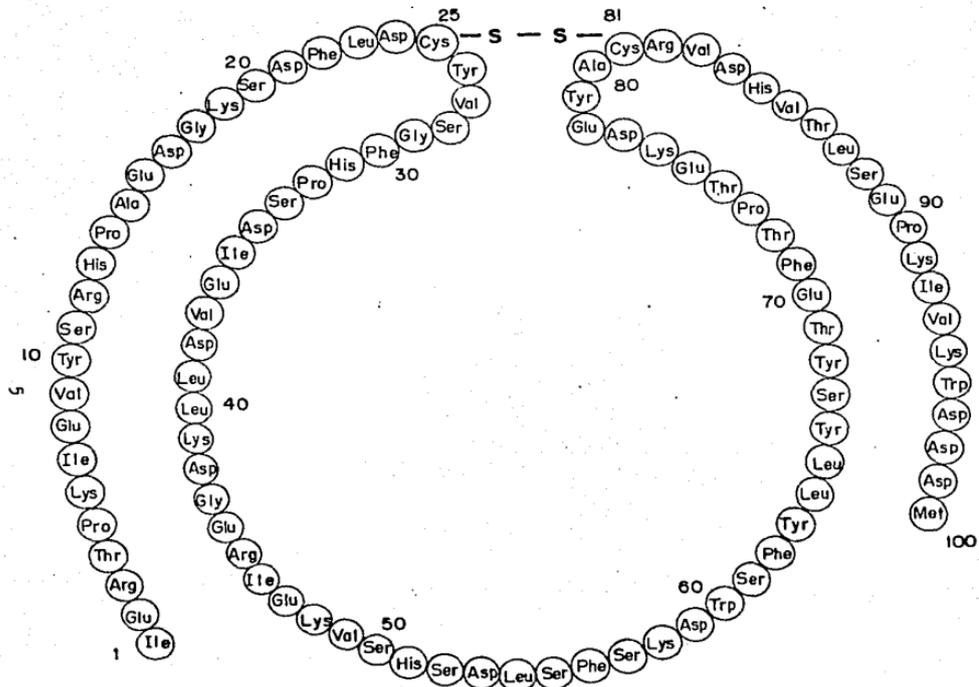
Es una proteína de bajo peso molecular (11,800 daltons), - compuesta de 100 aminoácidos que por su movilidad electroforética pertenece al grupo de las gammaglobulinas. Es de estructura globular ya que presenta un puente de disulfuro en la posición 25 y 81, careciendo tanto de polimorfismo como de carbohidratos (1, 2).

PROPIEDADES DE LA β 2-M (2)

Peso molecular	11,800 daltons
Punto Isoeléctrico a 5°C	5.4-5.7
Coefficiente de Sed. S°	1.6S
Velocidad de fricción	1.16
Número de aminoácidos	100
Carbohidratos presentes	0

TABLA I

Smithes y Poulik determinaron la secuencia parcial de aminoácidos de esta globulina y encontraron que 24 de los primeros 46 fueron homólogos a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de las IgG. Pero a pesar de esta relación estructural se ha probado que un antisuero específico contra todas las cadenas de las Inmunoglobulinas (incluyendo pieza secretoria y cadena J) no reaccionan con la cadena de la β 2-m. Posteriormente Peterson estableció la secuencia completa de aminoácidos y encontró que 28 aminoácidos eran homólogos con el dominio CH3 de la IgG (3).



SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA β 2-M

HE-CMR

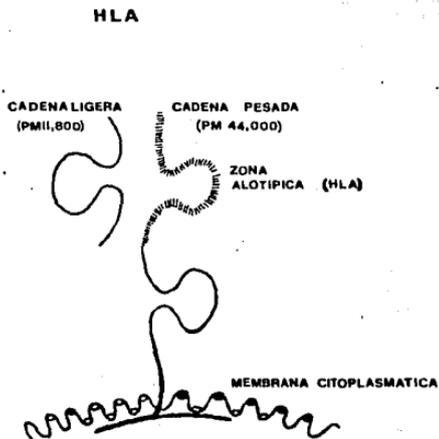
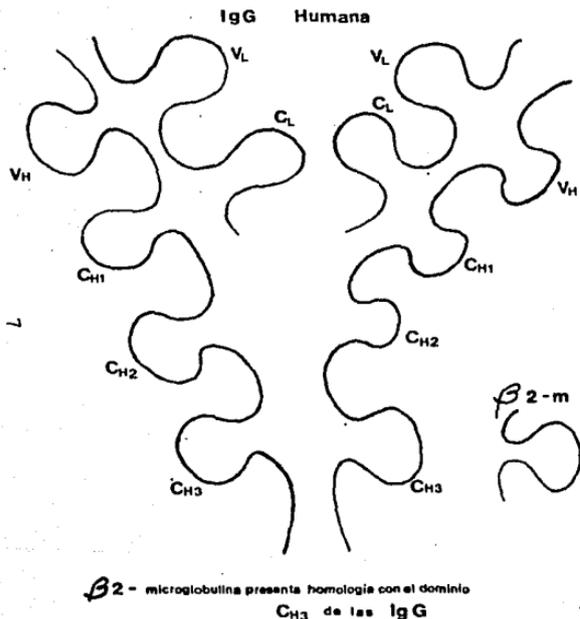
La posibilidad de que la β_2 -m sea una subunidad de una gran proteína citoplasmática se exploró a través de experimentos con el uso de la técnica de difusión en gel de Ouchterlony, se encontró que la β_2 -m no reacciona con antisuero contra proteínas de plasma total, las tres principales inmunoglobulinas G, A y M, transferrina, fibrinógeno, ceruloplasmina o α_2 -macroglobulina. Por tanto sólo un antisuero específico fue el que reaccionó con la β_2 -m. Así pues parece ser improbable que la β_2 -m sea una subunidad de otra proteína plasmática (1, 3).

LA β_2 -MICROGLOBULINA Y SU RELACION CON HLA.

Las células en su superficie expresan un gran número de -- moléculas diferentes, que cuando se realiza un trasplante de te jido, son extrañas para diferentes organismos (aún siendo de la misma especie) provocando el rechazo. Un pequeño grupo de gluco proteínas capaz de desencadenar este fenómeno se denomina Antígeno Principal de Histocompatibilidad (HLA) formado por dos cadenas: una ligera-constante y la otra pesada-variable (4).

Poulik y Motwani mostraron que la β_2 -m se encuentra presen te en la membrana de los linfocitos y que es idéntica a la cade na ligera de los antígenos HLA clase I (HLA-A, B y C) tratán- - dose de la región constante de estas proteínas, pero que a pesar de esta relación estructural, son producidas por dos cromosomas diferentes, donde el gen de β_2 -m está en el cromosoma 15 y el gen de HLA está en el cromosoma 6 (5).

HOMOLOGIA ESTRUCTURAL ENTRE IgG, β 2-m Y HLA



Molécula de HLA-clase I está compuesta de una cadena ligera la cual es β 2-m y una cadena pesada

FIGURA No 2

SINTESIS DE LA β 2-MICROGLOBULINA.

Esta proteína es sintetizada en todas las células nucleadas principalmente por linfocitos T y B que son capaces de producir grandes cantidades de esta proteína; también se ha encontrado en la superficie de los macrófagos, de las células endoteliales y de las epiteliales, los trombocitos, los mononucleares y los polimorfonucleares así como el epitelio celular citoplasmático del túbulo renal y ocasionalmente en la membrana tubular al igual que en células tumorales de tipo mesenquimatoso y hematopoyético (6, 7, 8). Se dice que está asociada a antígenos tumorales específicos (TSA) que son una modificación de los antígenos (HLA) (9).

Bernier y Funger reportaron que incubando linfocitos en cultivo hay una síntesis y secreción de la β 2-m y que esta síntesis se incrementa cuando los linfocitos son estimulados con fitohemaglutinina (PHA) o concanavalina A (Con. A) (2, 10).

La producción diaria de la β 2-m en un individuo normal es de 150 a 200mg. Estos resultados indican que las personas normales sintetizan de 0.11 a 0.18 mg/h/kg y está libre en plasma en una concentración aproximada de 2mg/l (11).

La β 2-m se ha encontrado en diversos fluidos biológicos: suero, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, líquido seminal y calostro.

β 2-MICROGLOBULINA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS (2, 6)

Suero	2mg/l
Orina	0.3mg/l
LCF	1.7mg/l
Saliva	0.001mg/l
L. amniótico	0.00115mg/l
L. seminal	0.0005mg/l
Calostro	0.0197mg/l

TABLA II

FUNCIONAMIENTO RENAL RESPECTO A LA β 2-MICROGLOBULINA.

Por pertenecer la β 2-microglobulina a un grupo de proteínas de bajo peso molecular difunde fácilmente entre fluidos extra e intravasculares. No penetra en el espacio intracelular a excepción de las células del túbulo proximal.

No más del 0.1% (370mg/día como máximo) del filtrado que es capa a la reabsorción en el riñón normal es excretado por la orina. Un riñón normal es capaz de reabsorber cerca del 99.9% del filtrado de β 2-m dando como resultado la presencia de mínimas cantidades de ésta en la orina. Prácticamente es filtrada en su totalidad por el glomérulo renal como lo es la creatinina y subsecuentemente, a diferencia de esta última, es casi completamente reabsorbida y catabolizada por células del túbulo proximal -- (12).

Como resultado del metabolismo y fragmentación del antígeno HLA Clase I, la β 2-m se disocia de la cadena pesada y aparece en forma libre en el fluido extracelular. Aproximadamente un 95% de la β 2-m en plasma u orina está presente como monómero libre y sólo una pequeña cantidad está asociada con otras moléculas incluyendo HLA (13, 14).

OTROS ESTUDIOS.

Se ha observado que la β_2 -m promueve la formación de rose-tas entre macrófagos y glóbulos rojos de borrego, fija comple-mento y además presenta propiedades citofílicas, actividad qui-miotáctica, no se une a receptores Fc. También se ha visto que impide la polimerización de la fibrina cuando está en grandes-cantidades, siendo capaz de prolongar el tiempo de trombina pe-ro no daña la actividad de trombina estearasa. La incubación -con anti β_2 -m inhibe marcadamente esta actividad anticoagulan-te. Por otro lado se ha demostrado que los anticuerpos anti - β_2 -m son capaces de agregar plaquetas (1, 2, 15).

β_2 -MICROGLOBULINA EN MÉDICA CLÍNICA.

Hasta hoy no se sabe cual es la función de la β_2 -m, pero--se ha encontrado elevada en el suero, líquido cefalorraquídeo-y orina, lo cual se debe posiblemente a dos procesos:

- 1) A la velocidad de desaparición de la protefna.
- 2) A la velocidad de síntesis y secreción aumentada por la célula (16).

Parte de la β_2 -m es vertida dentro de la circulación como resultado de un recambio de membrana o muerte celular, lo cual hace que sea fácilmente cuantificada en fluidos biológicos (17).

En los individuos normales existe un pequeño límite de va-riación en la concentración de la β_2 -m sérica. Respecto al sexo no hay diferencia pero con la edad existe una relación directa (18). También se encuantra elevada en sujetos con funciones re-nales alteradas, diversos procesos tumorales incluyendo neoplá-sias hematológicas como son los Linfomas (LNH) y la Enfermedad-de Hodgkin (EH) (19, 22).

Los niveles séricos de β_2 -m son estrechamente dependientes de la filtración glomerular, mientras que los niveles urinarios son influenciados por la función tubular. Por lo que al hacer - un estudio de la β_2 -m en relación a procesos tumorales, hay que descartar alteraciones a nivel renal controlando los niveles séricos de creatinina (20).

LINFOMAS NO HODGKIN Y ENFERMEDAD DE HODGKIN.

Los linfomas malignos son proliferaciones neoplásicas de - origen linforreticular, se presentan como tumores localizados y queda limitado a uno o más nódulos linfáticos en una región anatómica particular o un solo sitio extranodal. Existe la posibilidad de que un linfoma maligno desemboque en una leucemia, - - excepto en el granuloma de Hodgkin. También se ha observado con versión de un Linfoma a otro. Los pacientes afectados de estas enfermedades presentan casi siempre un aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos y en algunos casos esplenomegalia.

La etiología de los Linfomas es desconocida. Se ha postulado un pico doble de frecuencia en la EH, basado en la hipótesis de que la enfermedad es el resultado de dos procesos etiológicos: un agente biológico de baja infectividad que causa la enfermedad en adultos jóvenes y un mecanismo similar a otros linfomas en grupos de edad avanzada; y una posible variación en la respuesta del huésped a un estímulo.

DIAGNOSTICO DE LOS LINFOMAS.

El estadio clínico será determinado por la historia, examen físico, exploraciones radiológicas, gammagrafías, pruebas - de laboratorio de orina, de sangre y resultados biopsicos ini--

ciales.

Muchos de los pacientes son asintomáticos, aunque un 20% con LNH y un 40% con EH pueden llegar a presentar una combinación de fiebre, sudoraciones nocturnas, pérdida de peso, etc.

El diagnóstico es generalmente hecho por biopsias, ocasionalmente se requieren biopsias múltiples para un diagnóstico de certeza. Mientras que un aspirado por punción de nódulos -- linfáticos no es adecuado para el diagnóstico inicial ya que es poco confiable el hacer una subclasificación de la enfermedad con pequeñas cantidades de aspirado.

La clasificación de los linfomas malignos utilizada en el presente trabajo fue desarrollada por Peters y posteriormente se modificó en la Conferencia de Ann Arbor (1970). Esta clasificación está dada en base a la extensión de la enfermedad (21).

CLASIFICACION CLINICA DE EXTENSION DE LA ENFERMEDAD-
DE HODGKIN Y LOS LINFOMAS NO HODGKIN EN BASE A PETER
SON Y MODIFICADA EN LA CONFERENCIA DE ANN-ARBOR.

Estadio I	Enfermedad de una región nodular linfática o un solo órgano extralinfático.
Estadio II	Enfermedad de dos o más regiones nodulares linfáticas sobre el mismo lado del diafragma.
Estadio III	Enfermedad de regiones nodulares linfáticas en ambos sitios del diafragma o un órgano extralinfático o bazo o ambos.
Estadio IV	Enfermedad diseminada a uno o más órganos extralinfáticos con o sin asociación a nódulos linfáticos. Siendo identificados los órganos involucrados.
A o B	Todos los estadios son clasificados en A o B para indicar la ausencia o presencia respectivamente de síntomas relevantes como: fiebre, sudoraciones nocturnas y prurito.

TABLA III

TRATAMIENTO DE LOS LINFOMAS MALIGNOS (21)

		Enfermedad	Estadio	Tratamiento
E N F E R M E D A D	L O C A L I Z A D A	EH	IA	Radioterapia.
		EH	IB, IIA, IIB	Radioterapia y como ady <u>u</u> vante quimioterapia con MOPP.
		LNH	I y II	Radioterapia y como ady <u>u</u> vante quimioterapia con - CVP.
E N F E R M E D A D	G E N E R A L I Z A D A	EH	III y IV	Quimioterapia con MOPP y - en casos severos ABVD.
		LNH	III y IV	Quimioterapia con CVP y - en casos severos CHOP.

TABLA IV

EH=Enfermedad de Hodgkin.

LNH=Linfoma no Hodgkin.

MOPP=(mecloretamina, vincristina, procarbicina y prednisona).

CVP =(ciclofosfamida, vincristina y prednisona).

ABVD=(deoxorubicin, bleomicina, vinblastina y dicarbicina).

CHOP=(ciclofosfamida, dexorubicina, vincristina y prednisona).

OBJETIVOS

1.-Determinar la relación de la masa tumoral de los Linfomas (LNH) y en la Enfermedad de Hodgkin (EH) a través de la -- extensión de la enfermedad con las concentraciones de la β 2-mi croglobulina sérica al momento del diagnóstico y durante la -- evolución de la enfermedad, en un grupo de pacientes del Servi cio de Hematología Especial del Centro Médico la Raza.

2.-Identificar las diferencias de los resultados en nues- tros pacientes con los obtenidos en pacientes de otros países.

HIPOTESIS:

Si la β_2 -m es producida por células tumorales, la β_2 -m sérica tendrá una relación directa con la masa tumoral.

HIPOTESIS ALTERNA:

La β_2 -m no tiene relación directa con la masa tumoral de las enfermedades neoplásicas pero si con la Enfermedad de Hodgkin y los Linfomas no Hodgkin.

HIPOTESIS NULA:

La β_2 -m no guarda relación con la masa tumoral de ningún proceso linfoproliferativo.

MATERIAL Y METODOS

PLAN DE TRABAJO.

Para relacionar la masa tumoral con los niveles de β_2 -microglobulina, se medirá la concentración sérica de esta proteína por la técnica de ELISA (22) en pacientes con Enfermedad de Hodgkin y Linfomas no Hodgkin que se diagnostiquen en el Departamento de Hematología Especial. Estas concentraciones de β_2 -m sérica se relacionarán con la extensión del tumor en la etapa inicial. De esta forma se conocerá si existe relación entre la masa tumoral y la β_2 -m, así como β_2 -m y extensión de la enfermedad. Se excluirán los pacientes que tengan creatinina sérica mayor de 1.2 mg/100ml por la técnica de Fonanes Tausky.

El estudio longitudinal por seis meses con determinaciones mensuales de la β_2 -m sérica permitirá conocer la relación de estas con la remisión de la enfermedad y la recaída.

El diagnóstico de enfermedad linfoproliferativa maligna - se realizó en todos los casos por medio de estudios histopatológicos y determinando la extensión de la enfermedad de acuerdo a los criterios de Ann-Arbor.

Los pacientes con EH serán tratados con MOPP y para casos resistentes con ABVD, mientras que los LNH se tratarán con CVP.

Los niveles séricos normales de β_2 -m se medirán en 30 sujetos donadores de sangre de grupos étnicos diferentes, ya que los niveles de β_2 -m sérica se modifican con la edad.

I.-MATERIAL.

1.-Material biológico= suero humano a partir de:

- Grupo de 29 sujetos sanos entre 18 y 70 años.
- Grupo de 22 pacientes con EH o LNH.

2.-Reactivos: equipo comercial de los laboratorios Behring.

-Tubos anti β 2-m humana: tubos recubiertos con anticuerpos de cabra.

-Conjugado de β 2-m y peroxidasa.

-Tampón conjugado para el conjugado de β 2-m.

-Estándares de β 2-m S1 al S2: β 2-microglobulina en albúmina sérica bovina de concentraciones conocidas (margen nominal de -- concentración entre 10 y 1000 μ g/l).

-Suero de control de β 2-m: β 2-microglobulina en suero humano - de título conocido.

-Tampón para muestras.

-Solución de lavado: tampón fosfato más tween.

-Cromógeno: dihidrocloruro de o-fenilendiamina.

-Tampón/sustrato: peróxido de hidrógeno en solución de tampón-citrato y fosfato.

-Solución de detenimiento: ácido sulfúrico a 0.5N.

-Láminas adhesivas.

3.-Equipo:

-Diluctores de 20 y 500 μ l para diluir suero control y muestras.

-Diluctores de 50, 200 y 1000 μ l para la realización de la prueba.

-Espectrofotómetro.

-Baño de agua a 37°C.

II.-METODO.

1.-Determinación de los niveles de β 2-m sérica por la técnica de ELISA (Prueba de Inmunoanálisis Enzimático).

FUNDAMENTO.

Prueba inmunoenzimática competitiva: en donde la β 2-m de la muestra a determinar y una concentración conocida de β 2-m conjugada son adicionadas a unos tubos de plástico cuyas paredes se encuentran recubiertas con anticuerpos específicos anti β 2-m, estableciéndose una reacción inmunocompetitiva. Los componentes no fijados son eliminados por lavado y a continuación se determina la actividad enzimática de la β 2-m conjugada mediante un sustrato cromogénico para desarrollar una coloración que es leída espectrofotométricamente a una longitud de onda de 492nm. La concentración de β 2-m presente en la muestra es inversamente proporcional a la intensidad de la coloración (22, 23).

Sensibilidad: altamente sensible con un límite inferior de 3 μ g/l.

Especificidad: no hay reacción cruzada con IgG, IgA, IgM, albúmina humana y proteína fijadora del retinol (24).

2.-Trabajos preliminares.

a) Toma de muestras: se obtuvieron 3ml de sangre venosa de cada paciente y tras ser centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, el suero fue separado y congelado a -20°C hasta el momento de ser utilizadas.

b) Todos los reactivos y muestras se pusieron entre 20 y 25°C antes de comenzar la prueba.

c) Dilución de las muestras:

Muestra (μ l)	Tampón (μ l)	Dilución
-suero normal 20 +	500	1:26
-suero problema 20 +	500	1:26
-suero control 20 +	500	1:26
-estándares	sin diluir	

d) Reconstitución de:

- estándares en 0.5ml de agua destilada.
- 50ml de solución de lavado aforar a 1 litro con agua destilada.
- 200 l de μ 2-m conjugada que se reconstituye en 11ml de tampón conjugado.
- cromógeno reconstituir en 10 ml de solución tampón sustrato- y mezclar por agitación.

3.-Procedimiento.

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

a) Dosificación de las muestras y del conjugado:

	S1		S2		S3		S4		S5		control		s. normal			s. problema		
Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	etc.	20	21	etc.
Estándar (μ l)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50						
S. control (μ l)											50	50						
S. normal (μ l)													50	50	50			
S. prob. (μ l)																50	50	50
S. conj. (μ l)	←————— 200 μ l —————→																	

b) Incubación: cubrir los tubos con lámina adhesiva e incubar en baño de agua a 37°C por 1 hr.

c) Lavado: decantar todos los tubos y agregar 2ml de solución de lavado y nuevamente decantar.

d) Dosificación del sustrato:

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	etc.
sustrato	----- 200 μ l -----							

e) Incubación: cubrir los tubos con lámina adhesiva e incubar a 20°-25°C por 30 minutos al abrigo de la luz.

f) Detenimiento de la reacción:

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	etc.
sol. de detenimiento (H2SO4)	----- 1000 μ l -----							

g) Valoración: leer dentro de la hora siguiente las extinciones de las muestras a una longitud de onda de 492nm contra blanco de reactivos.

4.-Cálculos: determinar la media de los valores de extinción de cada una de las muestras (suero control, suero normal, suero problema y estándar).

Se trabajó una curva de referencia para un control de -- muestra técnica, empleando para la elaboración de dicha curva estándares puros de β 2-m con concentraciones de 10, 30, 100, - 300 y 1000 μ g/l.

Utilizando un control comercial de β 2-m, el cual presenta un valor promedio de 1600 μ g/l y localizando la lectura de este control en la curva de referencia se obtiene un valor de -- 1450 μ g/l.

La curva obtenida es la siguiente:

[β 2-m] (μ g/l)	Lecturas (absorbancias)
10	1.676
30	1.180
100	0.545
300	0.264
1000	0.106

Sobre la curva se hizo la lectura para determinar la concentración de β 2-m tanto del suero control como de las muestras a partir de sus ΔE . Una vez obtenida la concentración se multiplicó por el factor de dilución y dividida por 1000.

$$\frac{[\beta 2-m (\mu g/l)] \times \text{Factor de dilución}}{1000} = [\beta 2-m (mg/l)]$$

III.-MANEJO DE DATOS.

1.-Linearización: haciendo una regresión lineal para observar el comportamiento de los niveles de β_2 -m respecto a la edad en el grupo de personas sanas.

2.-Métodos estadísticos: para cada grupo tanto de sujetos sanos como de enfermos se calculó el valor medio y la desviación estándar, así como la aplicación de la Prueba no Paramétrica - de Mann-Whitney para determinar si la diferencia entre los grupos de sujetos sanos (grupo control) y los pacientes con EH y-LNH es estadísticamente significativa.

$$V1 = n1n2 + \frac{n1(n1+1)}{2} - R1$$

$$V2 = n1n2 - V1$$

$$V = \min.(V1, V2)$$

V = variable aleatoria.

n1 = número de pacientes del grupo más pequeño.

n2 = número de pacientes del grupo más grande.

R1 = sumatoria del lugar que ocupa cada valor en el grupo más -- pequeño.

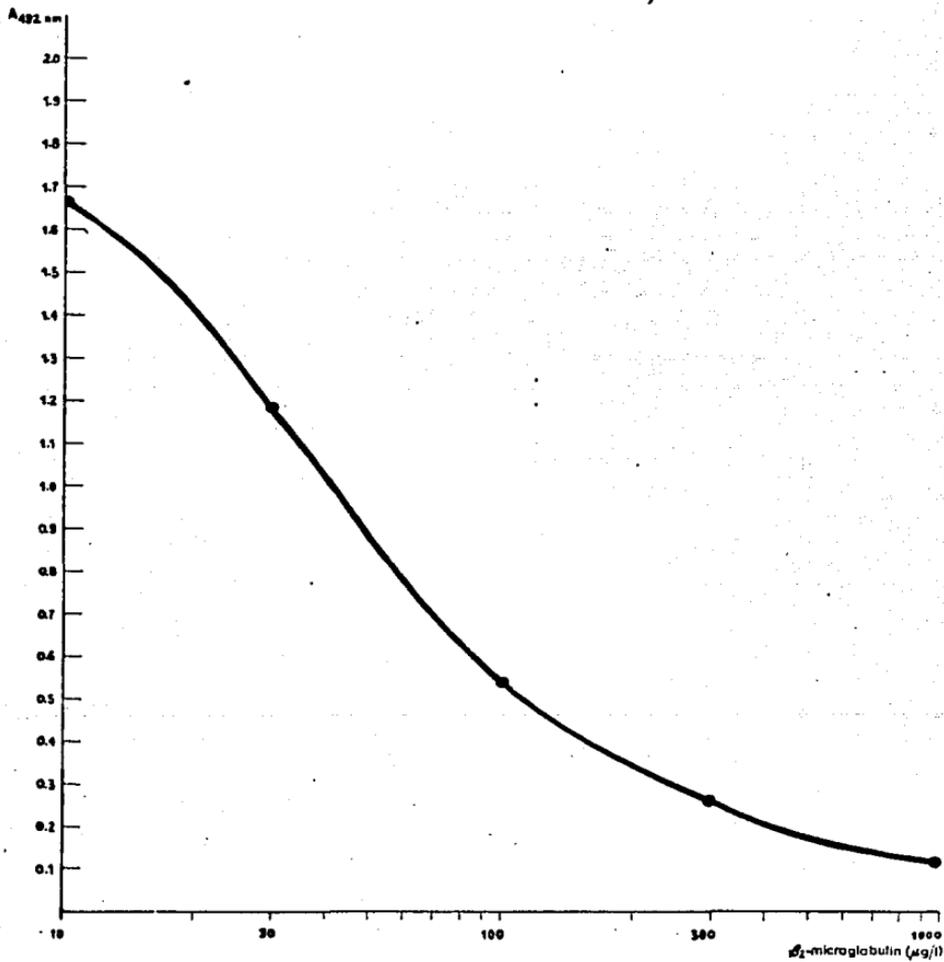
El valor de "V" calculado se compara en tablas de Mann-Whitney con el objeto de obtener el valor de P.

Valores de P menores a 0.05 permiten establecer diferencia significativa entre dos muestras (25).

RESULTADOS

CURVA DE REFERENCIA

CONTROL: 1450 $\mu\text{g/l}$



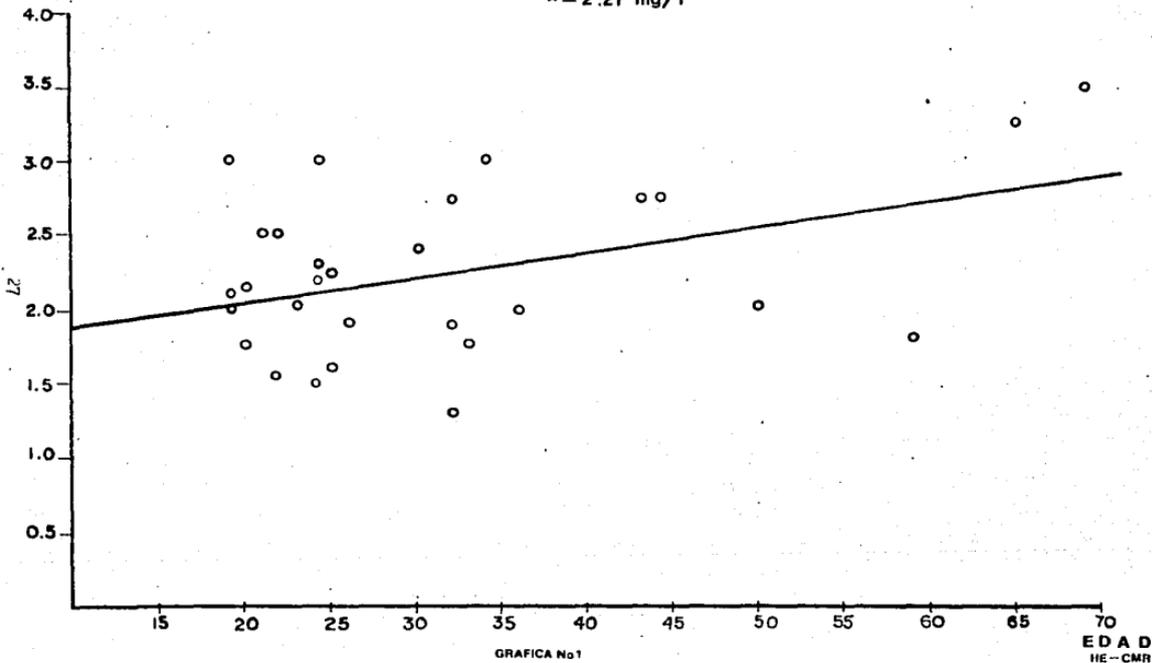
T A B L A N O 1

Resultados de las determinaciones de β 2-m en el grupo de sujetos sanos.

No.	Edad	Década	[β 2-m] (mg/l)	Valor medio [β 2-m] por décadas (mg/l)
1	19	2°	2.0	
2	19	"	2.15	
3	19	"	3.0	2.21
4	20	"	1.75	
5	20	"	2.15	
6	21	3°	2.50	
7	22	"	1.55	
8	22	"	2.50	
9	23	"	2.05	
10	24	"	1.50	
11	24	"	2.20	2.13
12	24	"	2.30	
13	24	"	3.0	
14	25	"	1.60	
15	25	"	2.25	
16	26	"	1.95	
17	31	4°	2.40	
18	32	"	1.30	
19	32	"	1.90	
20	32	"	2.75	2.15
21	33	"	1.75	
22	34	"	3.0	
23	36	"	2.0	
24	43	5°	2.75	2.75
25	44	"	2.75	
26	51	6°	2.05	2.0
27	59	"	1.80	
28	65	7°	3.25	3.5
29	69	"	3.75	

β_{2m}
mg/l

GPO. CONTROL · (PERSONAS SANAS 18 - 70 AÑOS)
INCREMENTO DE β_{2m} EN PROPORCION DIRECTA A LA EDAD
 $\bar{x} = 2.27 \text{ mg/l}$



GRAFICA No 1

EDAD
HE-CMR

T A B L A N O 2

Resultados de las determinaciones de β_2 -m sérica en el momento del diagnóstico para pacientes con:

ENFERMEDAD DE HODGKIN.

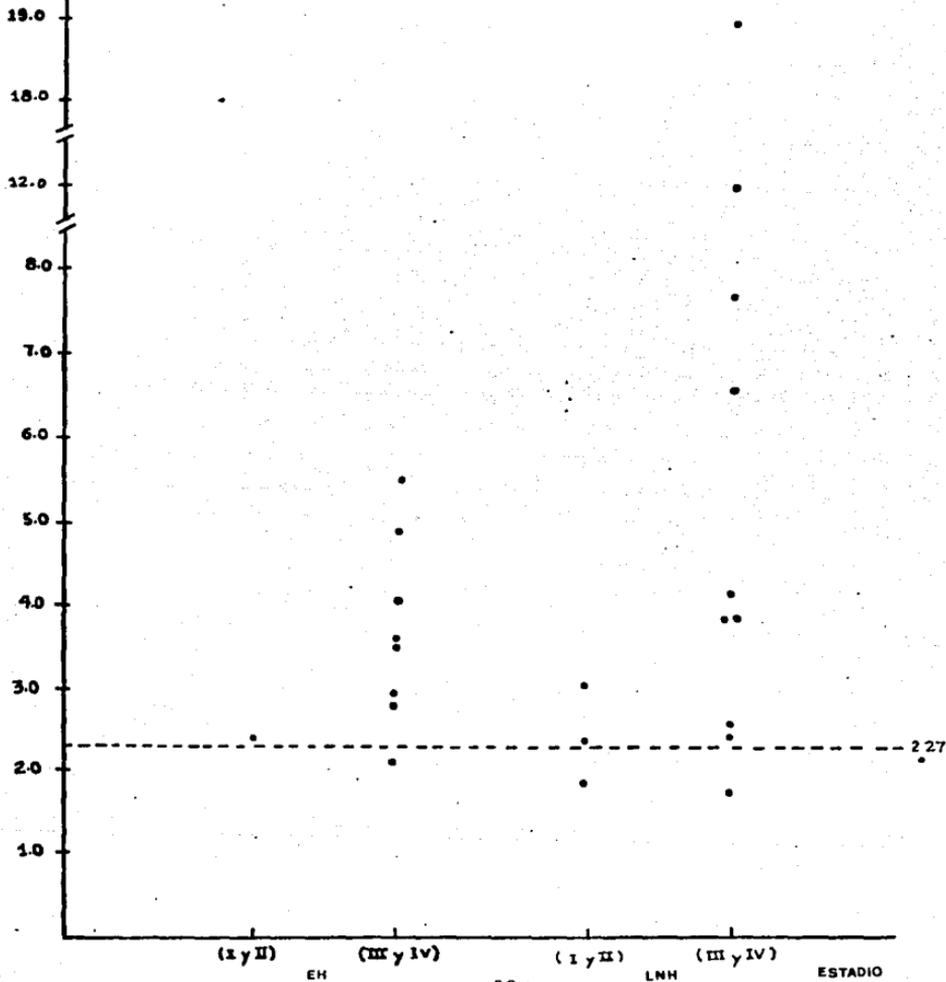
No.	Edad	Estadio	[β_2 -m] (mg/l)
1	54	IIB	2.30
2	21	IIIA	2.19
3	42	IIIA	2.93
4	16	IIIB	4.12
5	37	IIIB	2.80
6	54	IIIB	4.94
7	73	IIIB	5.50
8	43	IVB	3.60
9	55	IVB	3.53

LINFOMAS NO HODGKIN.

No.	Edad	Estadio	[β_2 -m] (mg/l)
1	29	IIB	3.0
2	32	IIB	1.8
3	47	IIB	2.3
4	16	IIIA	2.42
5	40	IIIB	19.19
6	45	IIIB	4.44
7	55	IIIB	1.75
8	63	IIIB	7.75
9	75	IIIB	3.85
10	21	IVB	2.6
11	54	IVB	3.85
12	58	IVB	6.69
13	59	IVB	12.19

(β_2 -m)
mg/l

NIVELES DE β_2 -M SERICA EN PACIENTES CON EH Y LNH EN EL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO



T A B L A N O 3

Valores medios y desviación estándar de las concentraciones de β 2-m tanto para el grupo control como para los pacientes con - EH y LNH.

Grupo	Edad promedio	[β 2-m(mg/l)]	
		\bar{X}	S
Sanos	32	*2.27	0.57
EH	43	3.54	1.14
LNH	45	5.52	5.05

\bar{X} = valor medio.

S = desviación estándar.

* = valor de referencia.

T A B L A N O 4

Valores de "V" en la Prueba no Paramétrica de Mann-Whitney y su correspondiente probabilidad.

Determinación de [β 2-m sérica]	"V"	Probabilidad
EH \neq Sanos*	15	P < 0.05
LNH \neq Sanos	31	P < 0.02
LNH \neq EH	50	P < 0.05

* = grupo control.

T A B L A N O 5

Seguimiento longitudinal en 4 pacientes con EH durante la quimioterapia.

No.	Edad	Estadio	M e s e s							
			0	1	2	3	4	5		
			[β 2-m (mg/l)]							
1	16	IIIB	4.12	1.88	1.70	1.80	1.75	-		RC
2	54	IIIB	4.94	4.44	4.70	2.43	2.25	-		RC
3	43	IVB	3.60	1.36	4.20	4.0	3.30	-		RC
4	55	IVB	3.53	3.7	3.2	2.19	2.8	3.3		RC

Seguimiento longitudinal en 8 pacientes con LNH durante la quimioterapia.

No.	Edad	Estadio	M e s e s								
			0	1	2	3	4	5	6		7
			[β 2-m (mg/l)]								
1	29	IIB	3.0	4.25	2.7	1.8	2.1	2.18	-	-	RC
2	47	IIB	2.3	1.75	2.3	2.2	2.1	2.8	1.8	-	RC
3	32	IIB	1.8	1.7	2.9	2.4	3.4	2.9	2.6	2.6	RC
4	21	IVB	2.6	2.2	1.6	2.2	2.3	-	-	-	RC
5	55	IIIB	1.7	1.2	1.5	1.9	2.7	1.8	1.98	-	RC, ↓ y †
6	54	IVB	3.8	1.9	4.2	3.9	3.4	2.18	-	-	Rp
7	75	IIIB	3.8	4.2	7.0	4.9	4.9	4.05	-	-	Rp
8	45	IIIB	4.4	2.5	1.7	4.5	4.7	4.2	3.3	2.95	Rp y †

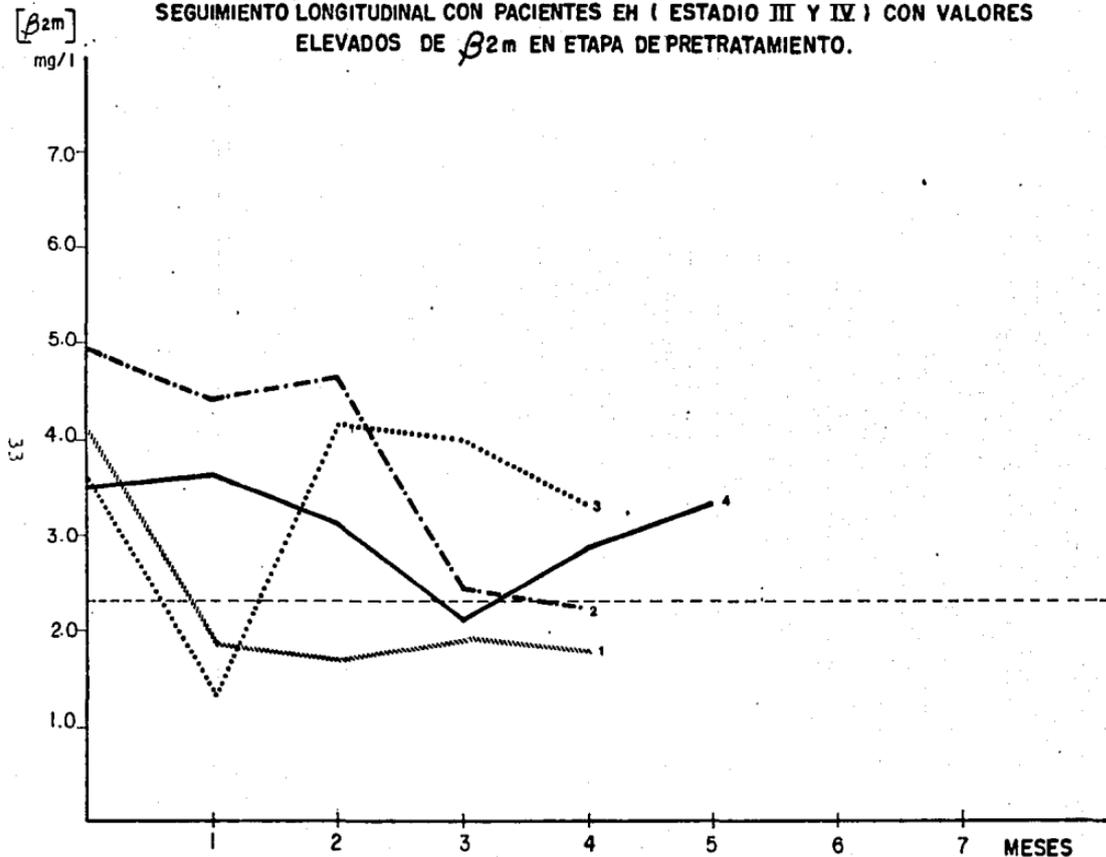
RC = Remisión completa.

Rp = Remisión parcial.

↓ = Recaída.

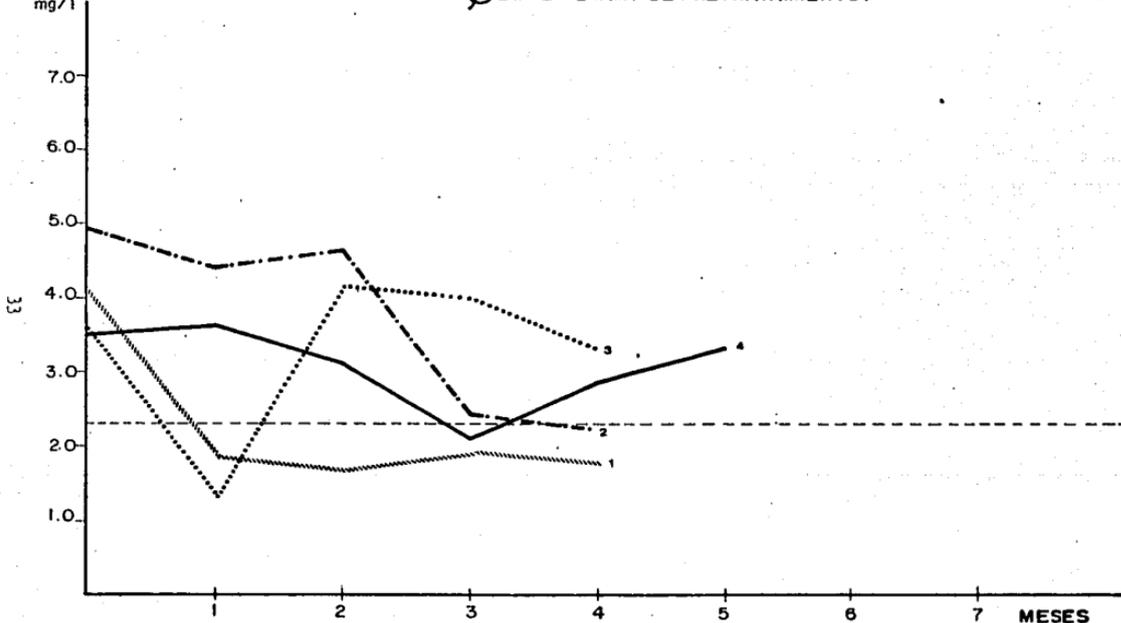
† = Muerte.

SEGUIMIENTO LONGITUDINAL CON PACIENTES EH (ESTADIO III Y IV) CON VALORES ELEVADOS DE β_{2m} EN ETAPA DE PRETRATAMIENTO.



[β_{2m}]
mg/l

SEGUIMIENTO LONGITUDINAL CON PACIENTES EH (ESTADIO III Y IV) CON VALORES ELEVADOS DE β_{2m} EN ETAPA DE PRETRATAMIENTO.

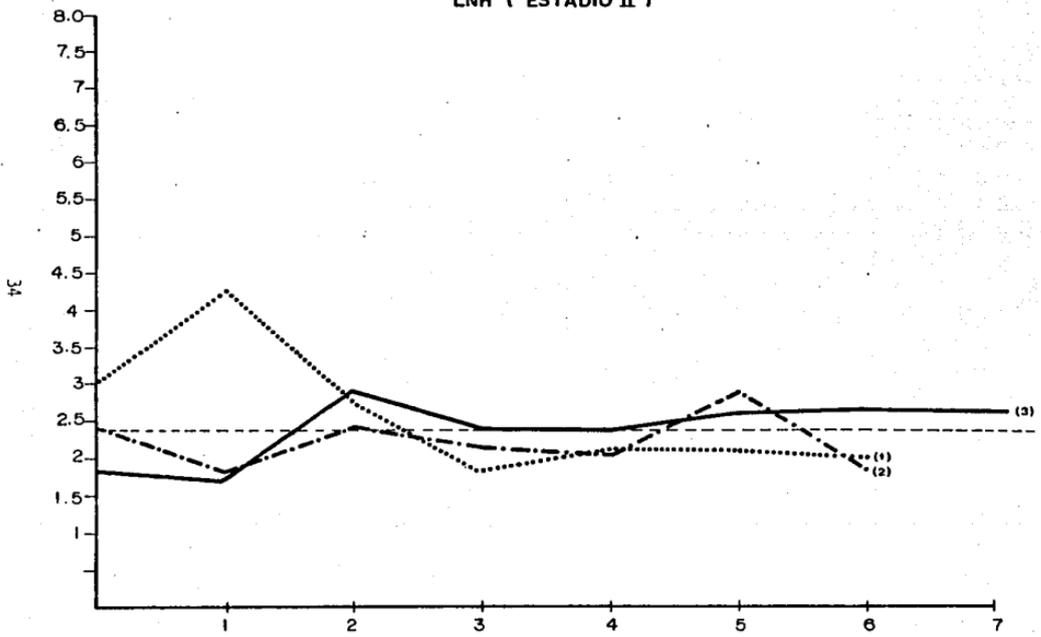


GRAFICA No3

HE-CMR

[β_2m]
mg/l

SEGUIMIENTO LONGITUDINAL DE 3 PACIENTES LNH (ESTADIO II)

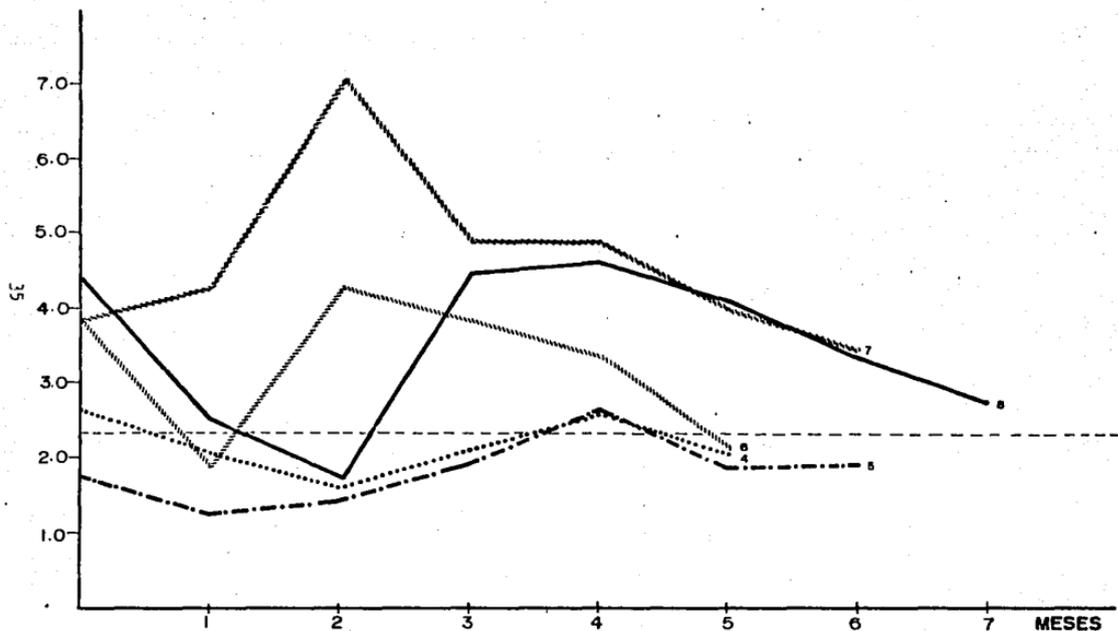


GRAFICA No 4

MESES
HE-CMR

β_{2m}
mg/l

SÉGUIMIENTO LONGITUDINAL DE PACIENTES LNH (ESTADIO III Y IV)



GRAFICA No 5

HE-CMR

RESULTADOS:

Los valores de β_2m relacionados con la edad en un grupo control de 29 sujetos sanos entre 18 y 70 años de edad, así como los promedios de las concentraciones de β_2m desde la segunda hasta la séptima década, se pueden apreciar en la tabla 1. Lo escaso de los sujetos en algunas décadas fueron limitantes para hacer el estudio estadístico. Se observó una relación directa entre los niveles de la β_2m sérica y la edad, incrementando esta proteína en un 1.8% por año (gráfica 1).

Llevando los requisitos de inclusión en 13 pacientes -- con LNH y 9 con EH, la distribución de estadios de extensión, edades y niveles de β_2m en etapa de pretratamiento se observan en la tabla 2. En la EH 6/9 pacientes tuvieron estadio III (dos sin síntomas y cuatro con ellos) y 2 de 9 en estadio IVB. En los pacientes con LNH 3/13 fueron estadio IIB, 6 en estadio IIIB y 4 con estadio IVB.

Los valores de β_2m tuvieron correlación con la masa tumoral ya que en los estadios más avanzados de la enfermedad hubo concentraciones más altas, lo cual se ilustra en la gráfica 2. Los pacientes con EH en estadio III y IV tuvieron un valor medio de 3.58mg/l. Para pacientes con LNH estadio II el valor medio fue de 2.3mg/l y para los pacientes en estadio III y IV fue de 6.44mg/l. Las cifras de referencia corregidas para la edad confirman lo dicho.

Utilizando como valor de referencia 2.27mg/l (tabla 3) y aplicando la Prueba no Paramétrica de Mann-Whitney para establecer niveles de significancia entre los grupos de estudio, y se encontró que para el 77% de los pacientes con EH -- muestran concentraciones elevadas de β_2m en el momento del diagnóstico y el valor medio fue de 3.53 ± 1.14 con una diferencia respecto al grupo control ($P < 0.05$); y 70% de pacien-

tes con LNH los niveles de $\beta 2$ -m estaban incrementados, el valor medio de este grupo fue de 5.25 ± 5.0 con una elevación significativa respecto al grupo control ($P < 0.02$) y los pacientes con EH ($P < 0.05$) (tabla 4).

Los valores de $\beta 2$ -m en etapa de pretratamiento tuvieron valor pronóstico para los LNH ya que los pacientes con niveles de $\beta 2$ -m normales respondieron más rápido y favorablemente al tratamiento, mientras que aquellos con concentraciones elevadas respondieron con mayor dificultad al tratamiento: 3 pacientes en estadio II tuvieron valores normales de la proteína alcanzando remisión completa y uno de ellos tuvo recaída seguida de una remisión; 2 de 7 en estadio III y IV presentaron concentraciones normales de $\beta 2$ -m sérica alcanzando ambos remisión completa; por último 5 de 7 pacientes en estadio III y IV tuvieron niveles altos de la proteína donde 3 tuvieron remisión completa en un período prolongado y uno de ellos posteriormente murió, y los otros dos no respondieron a la terapia y murieron.

Para la Enfermedad de Hodgkin no encontramos un valor pronóstico de la $\beta 2$ -m ya que sólo 4 pacientes en estadio III y IV siguieron el curso del tratamiento siendo que el resto lo abandonaron. Los cuatro pacientes que se lograron seguir, a pesar de que presentaron niveles altos de $\beta 2$ -m todos alcanzaron remisión completa en un período de tiempo relativamente corto.

En un período de aproximadamente seis meses (VIII/87 al IV/88) se llevó un seguimiento longitudinal en 4 pacientes con EH y 8 con LNH, encontrando poca relación entre las concentraciones de $\beta 2$ -m y durante el tratamiento. Los cuatro pacientes con EH lograron la remisión completa (tabla 5) apreciándose en dos de ellos un decrecimiento en la concentración de la proteína a partir del segundo mes (gráfica 3).

En los LNH todos los pacientes en sus diferentes estadios presentaron un comportamiento errático (como se muestra

en la tabla 6) en las determinaciones de β 2-m durante los primeros tres meses de terapia y a partir del tercer mes hay una tendencia a la normalización de los niveles de la proteína y algunos en estadio III y IV se mantuvieron por arriba del valor de referencia como se ilustra en las gráficas 4 y 5.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION

A pesar de que se han realizado una serie de estudios, aún no se ha encontrado un marcador tumoral confiable para el monitoreo de Linfomas malignos. Desde que se ha reportado que la $\beta 2$ -m se eleva en dichos procesos y que correlaciona con la actividad de la enfermedad se han venido haciendo una serie de investigaciones para determinar el valor que esta proteína tiene dentro de estos padecimientos

Both-Child (26) reportaron que en pacientes con EH y LNH la $\beta 2$ -m sérica se encuentra frecuentemente más elevada en enfermedades generalizadas (estadio III y IV) que en localizadas (estadio I y II). Lo cual ha sido confirmado en este estudio; siendo por lo tanto útil como marcador de masa tumoral.

No se encontró correlación entre los niveles de $\beta 2$ -m sérica inicial y la frecuencia de remisión y/o grado de supervivencia en pacientes con EH, por lo que se consideró ser de pobre valor pronóstico.

En contraste a la EH, se encontró una buena correlación en los pacientes con LNH entre los niveles de $\beta 2$ -m sérica, extensión de la enfermedad y supervivencia, con un valor medio de 2.4mg/l en aquellos que alcanzaron remisión completa y de 3.47mg/l para aquellos que tuvieron remisión parcial y en dos pacientes de estos últimos fallecieron, por lo que parece ser de valor pronóstico. Resultados similares fueron los obtenidos por Ioannis (27).

Contrariamente a Hagberg y Killander (28) nosotros no encontramos una buena relación entre los niveles de $\beta 2$ -m sérica y la masa tumoral durante el curso clínico de la enfermedad y la quimioterapia.

En este estudio fue normal la función renal de los pacientes, lo que sugiere un incremento en la producción de la $\beta 2$ -m por parte de las células tumorales o bien un recambio-

acelerado de sus membranas celulares y por lo tanto la concentración sérica de la proteína estaría en relación directa con la masa tumoral. Ya que el periodo de observación se limitó al tiempo de inducción de la remisión, no se tiene una observación longitudinal para relacionar los niveles séricos de la β_2 -m durante la recaída.

CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis realizado en nuestro grupo de estudio, tenemos que la β 2-m es útil como marcador de la masa tumoral en el momento del diagnóstico.

Para pacientes con LNH, la β 2-m es de valor pronóstico para obtener una respuesta, confirmando así nuestra hipótesis alterna.

En contraste, en los pacientes con EH, la β 2-m fué de pobre valor pronóstico

De alguna manera creemos haber contribuido con el conocimiento de estos estudios, introduciendolos en una pequeña población de nuestro país, sin embargo estos resultados no se pueden generalizar ya que el número de pacientes fue muy reducido y algunos abandonaron el tratamiento, por lo que se propone que esta investigación sea ampliada con un número mayor de pacientes y períodos de seguimiento más prolongados, así como tratamiento de recaída temprana, esto con el fin de determinar la utilidad de la β 2-microglobulina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Berggard, I. and Bearn, A.G.: Insolation and properties - of a low molecular weight β 2-microglobulin occurring in human biological fluids. J. Biol. Chem. 234: 4095-4103 (1968).
- 2.-Bernier, G.M.: β 2-Microglobulin: Structure, Function and-Significance. Vox. Sang. 38: 323-327 (1980).
- 3.-Peterson, P.A.; Cunningham, B.A.; Berggard, I. and Edelman, G.M. β 2-microglobulin a free immunoglobulin domain. Proc. -- Nat. Acad. Sci. USA. 69: 1697-1701 (1972).
- 4.-Trägårdh, L.; Kämpe, O.; Hammerling, U.; Böhme, J. and -- Claesson, L.: β 2-microglobulin and trasplantation antigens. Scand. J.C. Lab. Invest. 40 suppl. 154: 39-44 (1980).
- 5.-Goodfelloe, P.N.; Jones, E.A.; Van Heynigen, V.; Salomon, E. and Bobrow, M.: The β 2-Microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HLA region. Nature. 254: 267-268 (1975).
- 6.- Bernier, G.M. and Cornad, M.E.: Catabolism of human β 2-microglobulin by the rat kidney. American J. Physiol. 217 - (5) 1359-1363 (1969).
- 7.-Evrin, P.E.; Pertoft, H. and Nilsson, K.: β 2-microglobulin production in vitro by human hematopoietic, mesenchymal and-epithelial cells. J. Immunol. 112 (1): 137-143 (1974).
- 8.-Evrin, P.E. and Pertort, H.: β 2-Microglobulin in Human - Blood Cells. J. Immunol. 111 (4): 1147-1153 (1973).
- 9.-Michael, G.J.; Dingle S. and Dipersio L.: β 2-Microglobulin in human tumors heterografted into Athymic Mice. Vox. Sang. 38: 334-338 (1980).

- 10.-Poulik, M.D. and Bloom, A.D.: β 2-Microglobulin Production and Secretion by Lymphocytes in Culture. J. Immunol. 110(5):-1430-1433 (1973).
- 11.-Brenning, G; Wibell, L. and Bergstrom, R.: Serum β 2-microglobulin at remission and relapse in patients with multiple myeloma. Eur. J. Clin. Invest. 15:242-247 (1985).
- 12.-Vicent, C.; Revillard, J.P.; Pellet, H. and Traeger, J.: - β 2-Microglobulin Renal Trasplant Function. Trasplantation. -11(1): 438-442 (1979).
- 13.-Morell, A. and Riesen, W.: Serum β 2-Microglobulin, Serum Creatinine and Bone Marrow Plasma Cells in Benign and Malignant Monoclonal Gammopathy. Acta Haemat. 64: 87-93 (1980).
- 14.-Franciolo, P.; Clement, F.; Yersin, B.; Shädelin, J. and Glauser M.P.: Beta 2-Microglobulin in Acquired Immune Deficiency Syndrome. Antibiot. Chemother. 32: 147-152 (1984).
- 15.-Hammerschmidt, D.E.; Moldow, C.H.: Impaired Fibrin - Polymerization in Viral Hapatitis. Report of a case: probably identity of the inhibitor with β 2-microglobulin. J. Clin. Med. 92(6): 1002-1008 (1978).
- 16.-Oberg, G; Hallgren, R. and Vengre, P.: β 2-Microglobulin, - lysozyme and lactoferrin in cerebrospinal fluid in patients - with lymphoma or leukaemia: relationship to CSN involvement - and the effect of prophylactic intrathecal treatment with --- methotrexate. Br. J. Haematol. 66: 315-322 (1987).
- 17.-Dobbenburgh, O.A.; Rodenhuis, S.; Ockhuizen, T.H.; Weltervreden, E.; Houwen, B.; Fidler, V.; Meijer, S. and Marrink, J.: Serum β 2-microglobulin: a real improvement in the managment - of multiple myeloma. Br. J. Haematol. 61: 611-620 (1985).

- 18.-Evrin, P.E. and Wibell, L.: The serum levels and urinary excretion of β 2-microglobulin in apparently healthy subjects. Scand. Clin. Lab. Invest. 29: 69-74 (1972).
- 19.-López, F.A.; Cuesta, B. y Rocha, E.: Niveles séricos de β 2-microglobulina en hemopatías malignas. Sangre. 30 (3): - 320-329 (1985).
- 20.-Brenning, G.; Simonsson, B; Källander, C. and Ahre, A.: Pretreatment serum β 2-microglobulin in multiple myeloma. Br. J. Haematol. 62: 85-93 (1986).
- 21.-Williams J. Williams; Ernest Beutler, Allan J. Ersleu -- and R. Wayne Rundles. Hematología. Ed, Salvat Editores. Segunda edición. Tomo II. pp 901-926, 1983.Esp.
- 22.-Hernández, L.J.; Santos, A.L.: Aspectos relevantes del -- inmunoanálisis enzimático (ELISA). Infectología. Año V (2):-- 52-56 (1985).
- 23.-Voller, A. and Savigny, D.: Enzyme Linked Immunosorbent - Assay (ELISA). Tec. Clin. Immunol. Ed. Blackwell Scientific - Publication. 2° ed. London 1981.
- 24.-Bjerrum, O.W.: Lage, S. and Hansen. O.E.: Measurement of - β 2-microglobulin in human cerebrospinal fluid by ELISA technique. Acta Neurol. Scand. 74: 177-180 (1986).
- 25.-Erwin Kreyszgig: Introducción a la estadística matemática- Ed. Limusa. 7° reimpresión. Cap. 20: pp 391-405. México 1983.
- 26.-Child, J.A.; Späti, B and Illingworth, S.: Serum β 2-micro globulin and C-reactive protein in the monitoring of lymphomas. Cancer. 45: 318-326 (1980).

27.-Ioannis, P.; Pathouli, C.H. Karvountzis, G.; Papadopoulos, P.; Varvoutsi, M.; Eliakis, P.; Haadziyannis, S. and Komnios, Z. Serum β 2-Microglobulin in Malignant Lymphoproliferative -- Disorders. Cancer. 55: 2384-2389 (1985).

28.-Hagberg, H.; Killander, A. and Simonsson, B.: Serum β 2-microglobulin in Malignant Lymphoma. Cancer. 51: 2220-2225 (1983).