

00544

V-2
2Ej.

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

" UTILIDAD CLINICA DE ELECTROFORESIS
DE PROTEINAS EN EL INSTITUTO
NACIONAL DE CANCEROLOGIA, ESTUDIO
RETROSPECTIVO."

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA

P R E S E N T A:

DRA. ELSA RAMIREZ SANMARTIN

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. JEANNETTE GUARNER LANS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

JUNIO DE 1994





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).

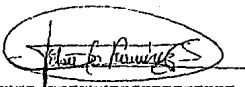
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

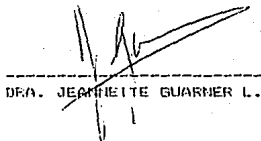
PRESIDENTE	DRA. REBECA FRANCO B.
VOCAL	DR. JESUS SUZHAN GARCIA
SECRETARIO	DR. PABLO RIVERA HIDALGO
1er. SUPLENTE	DRA. JEANNETTE GUARNER L.
2do. SUPLENTE	G.F.B. EVA HILDA GONZALEZ

SUSTITUTANTE

DIRECTOR DE TESIS



DRA. ELSA RAMIREZ SANMARTIN



DRA. JEANNETTE GUARNER L.

A Dios y a la Virreynita del Cisne
por permitirme llegar a este momento.
Gracias por tantas bendiciones.

A mis queridos Padres: Juan y Victoria,
Por su sacrificio, amor y apoyo constante
durante mi ausencia, por estar compartiendo
comúnmente momentos de alegría y tristeza a lo
largo de todo este tiempo.

A mis Hermanos: Miguel, Amada, Carlos,
Lupe, Vicente, Beatriz y Natalia,
el apoyo incondicional que me brindaron.

Expreso mi eterno reconocimiento al
Dr. Jesús Guzmán García, quien con
su mano amigable me guió y apoyó durante
mi estancia académica.

A mis amigos Mexicanos:
Gracias por mostrarme que las fronteras
no son barreras para la amistad y que
las cosas grandes, majestuosas y bellas
en este mundo se forjan en el interior
del hombre.

A todo el personal que trabaja en el
laboratorio clínico del Instituto
Nacional de Cancerología, por haberme
brindado su tiempo y experiencias.

A la Secretaría de Relaciones Exteriores
de México, con especial gratitud, sin su
apoyo no lo hubiera logrado.

Con especial respeto y admiración para la Dra. Jeannette Guarner Lans, por su valioso tiempo dedicado a la dirección de este trabajo. Gracias infinitamente por todas sus sugerencias.

Mi agradecimiento al Jurado por sus comentarios y enseñanzas.

C O N T E N I D O

I.- INTRODUCCION

- I.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- I.2.- HIPOTESIS
- I.3.- OBJETIVOS

II.- ANTECEDENTES

- II.1.- ESTUDIO DE PROTEINAS SERICAS
 - II.1.1.- DETERMINACION FISICO-QUIMICAS
 - 1) ULTRACENTRIFUGACION
 - 2) ELECTROFORESIS
 - 3) ELECTROENFOQUE
 - 4) OTRAS TECNICAS
 - II.1.2.- DETERMINACION INMUNOLOGICA
 - 1) INMUNODIFUSION RADIAL
 - 2) INMUNOFIJACION
 - 3) NEFELOMETRIA
 - 4) RIA
 - 5) INMUNOTRANSFERENCIA
 - 6) ELISA
- II.2.- FUNCION Y SIGNIFICADO CLINICO DE LAS PROTEINAS.
 - II.2.1.- FUNCION Y SIGNIFICADO CLINICO DE LAS INMUNOGLOBULINAS.
- II.3.- PATRONES ELECTROFORETICOS EN DIVERSAS CONDICIONES PATOLOGICAS.
- II.4.- IMPORTANCIA DE LA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN ENFERMEDADES NEOPLASICAS
 - II.4.1.- GAMMAPATIAS MONOCLONALES

III.- MATERIAL Y METODOS

- III.1.- DIAGRAMA DE FLUJO
- III.2.- SELECCION DE PACIENTES
- III.3.- EVALUACION DE COSTOS
- III.7.- ANALISIS ESTADISTICO

IV.- RESULTADOS

- IV.1.- CORRELACION GLOBAL DE LOS DIAGNOSTICOS FINALES DE LOS PACIENTES Y LOS PATRONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.
- IV.2.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE MIELOMA MULTIPLE
- IV.3.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE PLASMOCIDTOMA
- IV.4.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LINFOMAS
- IV.5.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LEUCEMIAS
- IV.6.- PACIENTES CON OTRAS NEOPLASIAS Y SIN ENFERMEDADES NEOPLASICAS.
- IV.7.- RESULTADOS DEL COSTO DE ESTAS PRUEBAS: ELECTROFORESIS Y DE INMUNOFIJACIONES

V.- DISCUSION DE RESULTADOS

- V.1.- CORRELACION GLOBAL DE LOS DIAGNOSTICOS FINALES DE LOS PACIENTES Y LOS PATRONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.
- V.2.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE MIELOMA MULTIPLE
- V.3.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE PLASMOCITOMA
- V.4.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LINFOMAS
- V.5.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LEUCEMIAS
- V.6.- PACIENTES CON OTRAS NEOPLASIAS Y SIN ENFERMEDADES NEOPLASICAS.
- V.7.- COSTO-BENEFICIO EN LAS PRUEBAS DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS Y CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS

VI.- CONCLUSIONES

VII.- BIBLIOGRAFIA

I.- INTRODUCCION

I.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Trabajos experimentales publicados durante los años 1940 por J. Hallen y B.G. Johonsson (1, 2, 3), mostraron la existencia de proteínas anormales en la región gamma al realizar electroforesis de proteínas en suero de pacientes con mieloma múltiple y macroglobulinemia.

Posteriormente, LAURELL y colaboradores (4), utilizaron geles de agarosa y describieron doce distintas fracciones protéicas; además de la presencia de picos monoclonales en pacientes con neoplasias no reticulares o enfermedades inflamatorias, particularmente en personas sobre los 70 años de edad.

Por la misma época, Alex Solomon y colaboradores (5), acuñaron el término gammapatía monoclonal o componente M al encontrar una banda anormal en la región gamma de barridos electroforéticos en acetato de celulosa. Macflier y colaboradores en un estudio de tamizaje de 11,275 sueros de pacientes provenientes de un Hospital de Veteranos, encontraron que 95 (1%) de ellos presentaban el componente M. De éstos, 60 enfermos tenían mieloma múltiple. En esta época se utilizaba acetato de celulosa como matriz de soporte para correr las electroforesis, con este material la resolución de las bandas es limitada por lo que el porcentaje de picos monoclonales fue bajo (6). Actualmente las técnicas analíticas han mejorado lo que ha permitido

mayor resolución y separación de proteínas en suero (7), por ejemplo, electroforesis de proteínas de alta resolución en gel de agarosa y/o con poliacrilamida (8) proporcionan un método de selección seguro, rápido y sensible para identificar la presencia de proteínas monoclonales (9).

Cabe señalar también, que solamente la electroforesis puede demostrar la naturaleza monoclonal de la proteína de Mieloma (10). Sin embargo puede suceder que los patrones electroforéticos no sean específicos y no muestren cambios característicos o aparezcan normales, y por tanto no ser sugestivo de pico monoclonal. Consecuentemente la inmunofijación e inmunodifusión es crítica (9,10). Estas últimas son técnicas utilizadas para confirmar la presencia de la proteína monoclonal que puede estar escondida debajo de alguna otra banda como la región beta, además, de determinar el tipo de inmunoglobulina anormal (6, 11, 12).

El avance constante y acelerado que ha experimentado el estudio de las electroforesis de proteínas en suero, ha llevado hoy en día a establecer patrones electroforéticos que servirán potencialmente de apoyo diagnóstico al médico tratante (7). Sin embargo debe de existir la interpretación de los resultados obtenidos, en base al metabolismo de cada una de las proteínas, su fisiopatología y en la fiabilidad y limitaciones de la técnica de estudio utilizadas (8).

El pico monoclonal anormal puede estar compuesto de

diversos componentes de las inmunoglobulinas. Los tres patrones más frecuentes son: 1) moléculas completas de gammaglobulinas que pueden ser IgG, IgA, IgM, IgD e IgE unidos a su cadena ligera ya sea kappa o lambda; 2) cadenas ligeras kappa o lambda solas sin estar unidas a su correspondiente cadena pesada (en ocasiones pueden coexistir dos picos uno de moléculas completas y por separado un excedente de cadenas ligeras no unidas a pesadas); y 3) Cadenas pesadas solamente, sin producción concomitante de cadenas livianas libres (13).

En el INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA (INCCAN), centro de referencia para cáncer en la República Mexicana, las enfermedades linfoproliferativas ocupan el 4to. lugar de los cánceres registrados, con un promedio anual de 186 (6.37%) pacientes nuevos atendidos y distribuidos así: linfoma no Hodgkin 87 (3.08%), leucemias 46 (1.58%), enfermedad de Hodgkin 33 (1.14%) y mieloma múltiple 17 (0.57%) (14,15). Un porcentaje importante de estas neoplasias está caracterizada por alteraciones de linfocitos B, sus precursores y células plasmáticas y pueden presentarse con posibles anomalías proteínicas características (inmunoglobulina monoclonal anormalmente secretada) (16). Debido a que estas inmunoglobulinas pueden ser detectadas y tener patrones característicos, su importancia es considerable en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con mieloma múltiple y enfermedades relacionadas. Las propiedades especiales de estas proteínas contribuyen directa o indirectamente a las manifestaciones clínicas de estas enfermedades (17), y por tanto

son consideradas como marcadores tumorales de la enfermedad. La detección de un componente monoclonal o inmunoglobulina anormal puede ser la consecuencia de una sospecha clínica, y por lo tanto la confirmación de un diagnóstico, mientras que en otras ocasiones puede resultar en un descubrimiento no esperado. (17, 5).

Debido a que en el año de 1972 se realizaron en el INCAN 553 electroforesis de proteínas y en prácticamente todas ellas se pedía cuantificación de inmunoglobulinas (Igs), se procedió a realizar la interpretación por parte del laboratorio del patrón de electroforesis y decidir si se realizaba la caracterización y cuantificación de las Igs. El propósito fue optimizar los recursos y solamente realizar cuantificación de Ig en los pacientes que realmente lo requieren, es decir, en pacientes con alteraciones linfoproliferativas. Para poder determinar si esta estrategia estaba dando resultado se decidió llevar a cabo este estudio retrospectivo, además, de que nos daría una idea del tipo de pacientes a los que se les solicita electroforesis de proteínas, y si podemos reducir el número de enfermos a los que se realiza este examen pudiendo de esta forma controlar los costos hospitalarios.

I.2.- H I P O T E S I S

H1: El médico especialista solicita la determinación de electroforesis de proteínas únicamente en pacientes con padecimientos linfoproliferativos.

H2: El médico especialista solicite la determinación de electroforesis de proteínas en forma rutinaria, incluyendo a pacientes con patologías que no corresponden a padecimientos linfoproliferativos.

1.3.- O B J E T I V O S

- 1.- Realizar un estudio retrospectivo de los pacientes a quienes se le solicitaron electroforesis de proteínas, en el Laboratorio Clínico del INSTITUTO NACIONAL DE CANCERDLOGIA durante el año de 1992, para conocer el motivo por el que se pide esta prueba dentro de esta Institución.
- 2.- Describir el tipo de población a la se que realiza electroforesis de proteínas detallando cuantos patrones de electroforesis de proteínas son normales y cuantos anormales, así como correlacionar el patrón con el diagnóstico del paciente.
- 3.- Estudiar la prevalencia de picos monoclonales y correlacionar con enfermedades neoplásicas; así como caracterizar estos.
- 4.- Evaluar si existe abuso por parte de los médicos tratantes al pedir que se realicen electroforesis de proteínas innecesariamente así como cuantificación de inmunoglobulinas.

II.- ANTECEDENTES: DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TEMA

II.1.- ESTUDIO DE PROTEÍNAS SERICAS

Las proteínas son polímeros lineales de alfa aminoácidos que son unidos covalentemente con enlaces peptídicos por medio del sistema de síntesis proteica de la célula. El orden real, o secuencia de aminoácidos de una proteína, designado estructura primaria (18,19), está predeterminado por el código genético dentro de la misma. La secuencia de información genética del DNA es transcrita por el RNA mensajero, que es traducido en el retículo endoplásmico rugoso del citoplasma con la formación de proteínas (20). La cadena polipeptídica lineal existe en forma tridimensional: alfa hélice, cadena beta plegada y espiral dispuesta al azar, dando a la proteína el carácter de "estructura secundaria". Cuando una cadena polipeptídica está en solución, es lo suficientemente flexible como para doblarse, permitiendo que las cadenas laterales interaccionen entre sí. este tipo de interacciones pueden ser enlaces covalentes disulfuro, enlaces no covalentes, atracciones electrostáticas entre lisina y leucina, puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals. La energía neta de todas estas interacciones es suficientemente alta como para estabilizar las proteínas en una disposición espacial tridimensional compleja plegada, que se denomina "estructura terciaria". La estructura terciaria, exclusiva de cada proteína, le confiere sus propiedades biológicas específicas (18). Las cadenas polipeptídicas plegadas están organizadas a menudo como agregados, con polipéptidos idénticos

o diferentes. El número o tipo específico de cadena polipeptídica determina las propiedades específicas de todo el complejo. La organización espacial de estas proteínas de múltiples cadenas se denomina "estructura cuaternaria". Habitualmente las propiedades biológicas de las proteínas cuaternarias constituidas por subunidades es la suma de las propiedades de cada cadena aislada (19). La estructura cuaternaria tiene una importancia fundamental para nuestro estudio ya que condiciona funciones biológicas importantes como la actividad enzimática, de anticuerpo, etc. (21).

Las proteínas en solución acuosa poseen un número de grupos cargados positivamente (grupos NH_3^+ libres residuales de la arginina y lisina, grupo imidazólico de la histidina y el NH_2 -terminal) y grupos cargados negativamente (grupos COO^- libres residuales de los ácidos aspártico y glutámico, y del grupo carboxilo terminal). La propiedad ácida o básica de la proteína (en solución neutra, pH 7), depende del número de grupos ácidos y básicos libres, de su constante de disociación y de su disposición geométrica en la molécula (estructura terciaria). Las proteínas se pueden comportar bien como ácido o bien como base, en función del pH de la solución: por ello se llaman "anfóteras". En solución ácida el exceso de H^+ frena la disociación del grupo carboxílico y la molécula permanece cargada positivamente (y en un campo eléctrico migra hacia el cátodo $-$), mientras que en solución alcalina se separa un protón del grupo amino y la molécula permanece cargada negativamente (y migra hacia el ánodo $+$) (22).

Existe un valor del pH en el que el número de cargas eléctricas negativas es igual al de las positivas: la carga final es cero, a este se le conoce como punto isoiónico, si se refiere a los grupos disociados de un sola proteína, o punto isoelectrico si se considera también la carga de los iones presentes en la solución. A tal pH, la proteína no tiene carga y si se somete a un campo eléctrico, no migran (19) ni al ánodo ni al cátodo.

II.1.1.- DETERMINACION FISICO-QUIMICO DE PROTEINAS:

La caracterización de una proteína se basa en las siguientes propiedades: solubilidad en condiciones determinadas, carga eléctrica, constante de sedimentación al ultracentrifugarse y a la especificidad inmunológica (21).

1.- ULTRACENTRIFUGACION.- En condiciones normales cuando la molécula protéica está sometida a la fuerza de la gravedad, la velocidad de sedimentación de las diversas moléculas es muy pequeña y la separación de los diversos compuestos protéicos se anula por la difusión. Con la ultracentrifugación es posible obtener campos gravitacionales muy altos que contrarrestan el efecto de la difusión. A la velocidad de sedimentación por unidad de fuerza centrífuga, se le llama coeficiente de sedimentación (expresada en unidades Svedbergs -S-), y es proporcional al peso molecular. La ultracentrifugación ha tenido el mérito histórico de refutar definitivamente el concepto de proteína como coloide heterogéneo,

posibilitando la determinación del peso molecular de muchas de ellas. Dio también un gran impulso al estudio de las lipoproteínas definidas en base a su densidad en la ultracentrifugación. La densidad de la mayoría de las proteínas varía dentro de límites superiores bastantes estrechos con respecto a la del agua, excepto las lipoproteínas que tienen una densidad menor, debido a lo cual estas proteínas pueden separarse entre sí y de otras en base a su densidad (19,23). Esta técnica no se presta al estudio del perfil seroprotéico, ya que su resolución es mala, puesto que, en el rango de 3-5 (S) es donde se encuentran numerosas proteínas (18).

2.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.- El movimiento de las partículas cargadas debido a un campo eléctrico externo se denomina "electroforesis". Dado que las moléculas cargadas pueden hacerse mover si se encuentran en un soporte de agarosa, acetato de celulosa, etc., es posible separar diferentes proteínas si poseen diferentes velocidades en un campo eléctrico. Por lo tanto, la electroforesis es una técnica de separación. (19).

La molécula protéica posee una carga eléctrica final que depende de: 1) el número de grupos ácidos y básicos libres residuales y de su constante de disociación; 2) la estructura terciaria y cuaternaria de la molécula; 3) el pH y fuerza iónica del solvente y 4) el peso molecular. Si se la somete en un campo

eléctrico. se moverá forzosamente o hacia el ánodo (+) o hacia el cátodo(-), con una velocidad que depende de su carga y de la fuerza del campo eléctrico, movimiento que se ve caracterizado por la dimensión y formas de las moléculas en solución. Este principio se aplica para separar las proteínas del suero. La separación puede ser seguida de una fijación permanente de las fracciones en el soporte en una posición determinada (13, 19).

La separación de proteínas en un campo eléctrico utilizando un medio totalmente líquido fue demostrado por Tiselius en 1937 y se conoce como electroforesis de límite móvil o electroforesis libre (19, 22). Utilizando ésta se logró separar las proteínas séricas en cuatro bandas que llamó albumina, alfa, beta y gamma. En los años 50 se introducen los soportes sólidos como el papel, que redujo la difusión y permitió una rápida lectura de las bandas separadas mediante un sencillo sistema de coloración. Posteriormente apareció un aparato que cuantificaba porcentualmente cada una de las bandas (densitómetro), esto permitió la cuantificación de cada una de las seroproteínas. El papel fue sustituido por otros soportes que aportaban una mayor resolución y/o lectura densitométrica más exacta, como el gel de agarosa que actualmente es el soporte más utilizado.

La resolución de un sistema electroforético depende de:

- 1) el gradiente de potencial eléctrico;
- 2) la temperatura;
- 3) el pH, composición y fuerza iónica de la solución buffer;
- 4) el flujo electroosmótico;
- 5) la calidad del soporte;
- 6) la cantidad y modo de aplicación de la muestra; y
- 7) la longitud del desarrollo electroforético (11).

Además hay que tener en cuenta lo siguiente:

1.- Gradiente de potencial (V/cm): cuando es alto induce un movimiento rápido de la proteína con una difusión mínima de ella. Pero cuanto mayor es dicho potencial, mayor es la intensidad de corriente y por tanto la producción de calor, con el consiguiente aumento de la difusión. Se debe pues elegir un gradiente de potencial que consiga el equilibrio óptimo entre los dos efectos: aumento de la velocidad (disminución de difusión) y disminución de la producción de calor (aumento de la difusión) (22).

2.- Temperatura: Un aumento de la temperatura aumenta la difusión y desnaturaliza las proteínas con producción de artefactos que eventualmente dañen el soporte. Su control se basa en: a) reducción de su producción (usando un gradiente de potencial no elevado y una solución buffer de baja fuerza iónica); y b) disminución de su dispersión bajando la temperatura (en la electroforesis en agarosa se utiliza una placa refrigerada) (3, 19, 22).

3.- pH: Las proteínas son moléculas anfóteras, es decir, son partículas no cargadas, o cargadas positiva o negativamente según el pH del buffer. El buffer más utilizado es el Barbitol (el ácido dietilbarbitúrico y su sal sódica). Este buffer no precipita ni desnaturaliza las proteínas y confiere una carga negativa a la mayoría de ellas a pH 8.6, por tanto éstas migran hacia el ánodo. El buffer ayuda a mantener un pH constante y asegura que cada proteína mantenga una carga estable durante toda la separación; la constancia del pH es vital si se desea obtener patrones reproducibles. La fuerza

iónica del buffer es usualmente de 0.05 a 0.15 mol/l. La migración se hace más lenta al aumentar la fuerza iónica debido a la competencia por la corriente de los iones del buffer. A mayor fuerza iónica, las bandas migradas son más nítidas pero están más juntas. El buffer utilizado para el reservorio del electrodo es, a menudo, diferente del usado para preparar el gel. El efecto neto es producir una discontinuidad de voltaje en la interfase de las dos soluciones. Cuando esta interfase atraviesa las bandas de proteína, dichas bandas se hacen compactas produciendo zonas más estrechas (19, 20, 22, 23).

4.- Flujo electroosmótico: En pH alcalino casi todas las proteínas están cargadas negativamente y por tanto se mueven hacia el ánodo (+). En estas condiciones de pH, el soporte se carga negativamente y provoca una atracción de las cargas positivas hacia el ánodo, creando por tanto una corriente del buffer llamada flujo electroosmótico, contrario al movimiento electroforético. Este flujo reduce la migración, y por tanto la resolución, de los compuestos proteínicos que migran más velozmente hacia el ánodo y mueve hacia el cátodo las fracciones más lentas. El soporte pierde líquido por evaporación, como primera consecuencia de la producción de calor. El efecto de la evaporación es en parte compensado en el lado aniónico por el buffer y en el lado catódico por el flujo electroosmótico. El flujo electroosmótico es proporcional a la diferencia entre la constante dieléctrica del soporte (gel o celulosa) y la del buffer (19, 20, 22, 23).

5.- Calidad del soporte : Existe una gran variedad de medios de soporte que incluyen gel de poliacrilamida, gel de almidón, papel, acetato de celulosa y gel de agarosa. Las técnicas de electroforesis con gel de poliacrilamida como medio de soporte han permitido establecer la existencia de más de cien proteínas del suero. Las numerosas bandas observadas con estas técnicas presentan una imagen compleja. Su uso en el laboratorio clínico de rutina no es frecuente ya que su preparación es laboriosa y no añade beneficio en comparación con otros soportes más sencillos de preparar. Soportes de acetato de celulosa o agarosa, producen 5 a 6 bandas, son técnicamente sencillos de preparar y útiles para establecer diagnósticos como gammopatías monoclonales, cirrosis hepática, insuficiencia renal, hipogamaglobulinemia, hipergamaglobulinemia, etc. El acetato de celulosa presenta varias ventajas sobre el papel: ya que la adsorción es mínima, da separaciones nítidas y bandas bien definidas, la preparación es rápida, y se pueden separar muy pequeñas cantidades de proteínas. Es posible aclarar el acetato de celulosa hasta lograr su transparencia antes de colorearlo, facilitando la densitometría (23). Por su parte, el gel de agarosa da una resolución más nítida de las bandas que el acetato de celulosa y la adsorción es mínima. Sin embargo, debido a la leve carga negativa de la agarosa, se produce electroendósmosis o movimiento de las sales del buffer hacia el cátodo. Con el gel de agarosa es posible lograr aclaramiento del soporte fácilmente. La electroforesis en gel de agarosa ha hallado uso creciente debido a su rendimiento más coherente, a la facilidad de su manipulación y por ende se considera

superior al acetato de celulosa para su uso de rutina. (24). La electroforesis de proteínas séricas con agarosa como medio de soporte se recomienda como método de elección. Este método fue desarrollado por Wieme y ha sido muy perfeccionado (25).

6.- Muestras : El suero es la muestra de elección; se puede usar plasma, pero en ese caso se observará una banda adicional de fibrinógeno. Cuando se utilizan pequeñas cantidades (inferior a 1 ul de suero) de muestra se puede perder algún componente protéico por ejemplo prealbumina (17).

7.- La longitud del desarrollo electroforético: La resolución entre las distintas bandas es mayor cuanto más largo es el desarrollo electroforético. La longitud del desarrollo depende del gradiente de potencial aplicado, del tiempo de migración, de la fuerza iónica del buffer y de la calidad del soporte. Las condiciones operativas se eligen para obtener el mejor resultado, considerando que la resolución viene acompañada de un aumento de la difusión (proporcional a la cantidad de calor producido durante el tiempo de la migración) y de la electroendósmosis. Una buena resolución requiere un desarrollo electroforético no inferior a 4 cm. (23). Diversos estudios demuestran que la mejor resolución se obtiene con geles de agarosa (24).

3.- ELECTROENFOQUE .- Esta técnica se introdujo en la década de los 60. En ella la proteína se mueve utilizando fuerza eléctrica y un gradiente de pH equivalente al punto

isoelectrico de ésta (carga neta de la proteína = 0). Esta igualdad en el gradiente de pH se obtiene con el uso de anfólitos (proteínas con diversos puntos isoelectricos) en el soporte, que al ser sometidas a un campo eléctrico se disponen linealmente del cátodo al ánodo, formando un gradiente de pH continuo y estable (de pH básico a pH ácido respectivamente). El efecto focalizante es debido al hecho de que el campo eléctrico actúa sobre la proteína hasta que ésta queda fijada en aquella zona en que el gradiente de pH corresponde a su punto isoelectrico, ya que solo en esta zona la proteína no posee carga neta. Generalmente se usa como soporte poliácridamida (22).

4.- OTRAS TECNICAS.- Se puede utilizar la cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de permeación en gel. Sin embargo se requieren de instrumentos de alto costo y muy complejos, por lo que su aplicación inmediata en el estudio rutinario de las seroproteínas no se ha hecho extensiva (21).

II.1.2.- DETERMINACIONES INMUNOLOGICAS :

1) DOBLE INMUNODIFUSION RADIAL.- Es el método más simple para revelar la presencia de una determinada proteína en una mezcla. Fue demostrada por Duchterlony en el año de 1949. El antígeno y el anticuerpo específico se depositan en dos pocillos a la distancia adecuada y se les deja difundir. Después de cierto tiempo se forma una línea de precipitación cuya forma permite establecer la

identidad, o la identidad parcial antigénica de dos o más proteínas (21).

En 1953, Grabar y Williams introducen una nueva técnica que combina la separación electroforética de las proteínas con su precipitación inmunológica, llamada inmunolectroforesis (IEF). Esta ha permitido la identificación de numerosos componentes de las zonas alfa, beta y gamma de la electroforesis, posibilitando nuevas perspectivas de su aplicación en el laboratorio clínico y en la investigación. Con esta técnica es posible identificar cerca de 35 componentes y valorarlos semicuantitativamente. La utilización más común de la IEF es en el estudio de la distribución relativa de las tres clases mayores de las inmunoglobulinas (cuando existen picos monoclonales). Es una valoración semicuantitativa (22, 26).

2) INMUNOFIJACION (IFE).- La inmunofijación es una técnica que combina electroforesis de proteínas en gel de agarosa y posteriormente inmunoprecipitación o sea la especificidad inherente de la reacción antígeno anticuerpo. El espécimen puede ser suero, orina, LCR, u otros fluidos corporales. El principal uso que se le ha dado a este estudio es para la caracterización y tipificación de inmunoglobulinas monoclonales, reemplazando de esta forma a la tradicional inmunolectroforesis como método de elección. Puede detectar y caracterizar proteínas monoclonales a niveles bajos (50 a 150 mg/dl), comparado a un gramo que detecta la inmunolectroforesis. Debido a que la electroforesis se realiza en gel de agarosa es fácil separar proteínas con movilidad

cerrada, como son aquellas que tienden a polimerizarse, (IgA y cadenas ligeras) en pequeñas cantidades (26).

3) NEFELOMETRIA.- Los pequeños agregados que se forman cuando mínimas cantidades de antígeno y anticuerpo se encuentran en solución, producen una turbidez que puede ser medida por la dispersión de un haz luminoso. Añadiendo polietilenglicol a la solución, el tamaño de los complejos aumenta y, por tanto, se obtiene mayor sensibilidad (27).

4) RADIOINMUNOENSAYO (RIA).- Es una técnica que puede medir cantidades extremadamente pequeñas de proteínas (u otros antígenos). Se puede llevar a cabo de dos formas: RIA competitivo la sustancia que se va a medir (antígeno), competirá en el sistema con un antígeno purificado marcado con un radioisótopo por el anticuerpo que estará en cantidad limitada. De esta forma, cuanto mayor sea la concentración de antígeno frío (no marcado), menor será la cantidad de antígeno marcado que se unirá al anticuerpo. RIA de exceso de anticuerpos, en esta el anticuerpo marcado radiactivamente es puesto en exceso y se unirá al antígeno cuya cantidad se desconoce; en este caso existe una relación directa entre el nivel del antígeno y la cantidad de anticuerpo caliente precipitado. En ambas formas de RIA es necesario separar adecuadamente la radioactividad fijada de la libre, y de esta forma poder medir la radioactividad de los complejos y extrapolar los resultados a una curva estándar con concentraciones conocidas de antígeno (27).

5) INMUNOTRANSFERENCIA.- También conocido como Western Blot, este método es de gran utilidad para detectar antígenos (o los anticuerpos dirigidos contra ellos) en una mezcla compleja de proteínas. Primero, se realiza la separación de los antígenos en una fase sólida (gel de poliacrilamida o agarosa) mediante electroforesis, y luego se transfieren a membranas (papel de nitrocelulosa), posteriormente se identifican mediante antisueros marcados con isótopos radioactivos o enzimas. Pueden utilizarse técnicas directas (un anticuerpo marcado), o indirectas (un primer anticuerpo no marcado, seguido de un segundo anticuerpo marcado) (27).

6) ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).- En este caso el marcador es una enzima en vez de un isótopo, por lo que habrá que medir la actividad enzimática sobre un sustrato adecuado, en lugar de la radioactividad. Es una técnica con menor sensibilidad e igual especificidad que el RIA, con la ventaja de que no se tiene que manejar material radiactivo, por lo que desaparece el peligro de contaminación y se alarga la vida media de los reactivos. Se puede utilizar para medir tanto anticuerpos como antígenos, de acuerdo con lo cual se pegará a una fase sólida el antígeno purificado o el anticuerpo respectivamente. En cada uno de los pasos se realiza un lavado para retirar los componentes que no se hayan unido. Después de reaccionar enzima y sustrato, se mide la intensidad del color obtenido por espectrofotometría (27, 28).

II.2.- FUNCION Y SIGNIFICADO CLINICO DE LAS PROTEINAS SERICAS.

Las proteínas constituyen el 80% de la masa de solutos en el suero (80 g/L). El plasma contiene fibrinógeno (3 g/L), proteína que está ausente en el suero. La concentración de proteínas séricas totales, o las proporciones de las fracciones proteicas individuales, cambian durante una variedad de enfermedades, siendo así de gran valor en el diagnóstico clínico de diversas patologías (19).

El suero humano contiene más de 125 proteínas identificadas, que cumplen varias funciones fisiológicas o biológicas:

- 1) Transportadores.- Numerosas proteínas séricas son transportadores específicos de moléculas pequeñas. La mayoría de las proteínas transportadoras son globulares, por ejemplo tiroglobulina (TBG) que transporta tiroxina, transcortina transporta cortisol y la albumina que transporta ácidos grasos libres, bilirrubina no conjugada, calcio y muchos otros compuestos endógenos y exógenos. Las propiedades de unión específica de estas proteínas de transporte han sido utilizadas como base para medir concentraciones séricas de cortisol, saturación de TBG y otras variables analíticas. Como proteínas transportadoras de lípidos tenemos a las lipoproteínas (21).
- 2) Receptores.- Por otro lado muchas proteínas celulares actúan como intermediarios procesadores de información para moléculas hormonales. Cada proteína denominada receptor, fija una hormona específica y luego transmite el mensaje hormonal a la célula. Las proteínas receptoras suelen ser glucoproteínas (18).

3) Catalizadores.- Una importante propiedad biológica de algunas proteínas es su capacidad de catalizar la velocidad de las reacciones bioquímicas. Las concentraciones séricas de estas proteínas, llamadas enzimas, son con frecuencia de suma importancia para determinar la naturaleza de un proceso patológico. La mayoría de las proteínas que exhiben propiedades catalíticas son globulares o metaloproteínas (15).

4) Presión osmótica de la sangre.- La albúmina explica el 75% de la presión osmótica del plasma. En enfermedades donde la albúmina disminuye (insuficiencia renal) se produce edema ya que sale líquido de los vasos por no poderse mantener la presión osmótica.

5) Amortiguador de pH.- La proteína más importantes en la hemoglobina. Es que con el grupo Heme regula la cantidad de CO₂ en la sangre (29).

6) Coagulación.- Todos los componentes de la cascada de la coagulación son proteínas circulantes e incluyen fibrinógeno, protrombina, globulina antihemofílica, factores V y VII, y demás. Por otro lado también existen los factores anticoagulantes que son proteicos y nos protegen ante coagulación excesiva (29).

7) Antígenos y anticuerpos.- Tanto antígenos como anticuerpos son proteínas importantes en el sistema inmune. Los anticuerpos son producidos por las células plasmáticas y se unen a epítopos específicos en antígenos generalmente externos. La inmunidad derivada de esto es conocida como humoral.

Las proteínas séricas se encuentran generalmente en exceso, respecto al nivel normalmente necesario. Este es un mecanismo de

compensación para tener cubiertas las funciones que lleva a cabo la proteína. Como ejemplo, las proteínas de transporte (transferrina, albumina) están solo a 1/3 de su saturación. Además otras proteínas pueden tener la misma función biológica. Como ejemplo se ha demostrado que la albumina puede sustituir eficientemente en su función a la heptoglobina (proteína acarreadora de hemoglobina) (22) cuando este se libera en exceso (anemia hemolítica), o en los individuos privados de tiroglobulinas (22) la tiroxina se fija a prealbumina. Sin embargo, en otros padecimientos la ausencia de una proteína puede provocar desordenes extremadamente graves. Como ejemplo la carencia de alfa-1 antitripsina es responsable tanto de enfisema como de la cirrosis juvenil (30), o la ausencia del factor VIII de la coagulación produce hemofilia.

La síntesis de la gran mayoría de las proteínas es en hígado, son excepciones las inmunoglobulinas sintetizadas por las células plasmáticas, y algunos componentes del complemento sintetizados por los macrófagos (30). La reducción en la síntesis de proteínas puede deberse a: a) disminución de la disponibilidad de aminoácidos secundaria a malnutrición, caquexia (en portadores de neoplasia), malabsorción, ayuno, etc. (22). b) problemas hepáticos con disfunción y/o disminución del número de hepatocitos por ejemplo: hepatotoxicidad por fármacos y radiaciones, hepatitis aguda y crónica, cirrosis, metástasis hepáticas y otras (22).

Por otra parte puede existir aumento en la síntesis de proteínas cuyas causas pueden ser: Fisiológicas como en el embarazo y patológicas como en hiperplasia de células plasmáticas (gamopatía

monoclonal benigna, o mieloma) y procesos reactivos (inflamación, cirrosis, enfermedades de la colégena, etc.) (18,29).

En lo que respecta a la distribución de las proteínas, algunos estudios demuestran que algunas se encuentran en el plasma solo de paso, procedentes de la destrucción fisiológica de los tejidos, dentro de estos caen algunas enzimas como la aspartato aminotransferasa (AST) o la alanina aminotransferasa (ALT) (21).

Siempre existe un equilibrio dinámico entre la fracción plasmática intravascular de las proteínas con la fracción extravascular. Por ejemplo, solo el 40 % de las proteínas de bajo peso molecular como albumina y transferrina están en el compartimento circulante. Cerca del 50% de IgG e IgA están en el compartimento extravascular; mientras que el 80% de IgM es intravascular (31). Por otro lado en el hígado y sistema reticuloendotelial se lleva la mayor parte del catabolismo endógeno de las proteínas. Consiste principalmente en remover las proteínas funcionalmente alteradas (19). Así mismo existen pérdidas externas de proteínas como son las secreciones enzimáticas al intestino y glándulas exocrinas, secreción de moco en sistema respiratorio y genital y pérdidas a través de mucosas y piel. Un porcentaje constante de las proteínas intravasculares es degradado diariamente y estas proteínas son reemplazadas a través de la síntesis, de tal manera que la cantidad total en plasma siempre es la misma (32).

Es importante recordar, que el catabolismo puede verse aumentado cuando existen: 1) pérdidas externas altas (hemorragia, proteinuria, gastroenteropatía, quemaduras, y otras); 2) el consumo se

incrementa especialmente en condiciones patológicas, así es el caso de la hipofibrinogenemia en el curso de la coagulación intravascular diseminada, disminución de la haptoglobina y hemopepsina en el curso de la anemia hemolítica y reducción de las fracciones del sistema del complemento en las enfermedades autoinmunes; y 3) al existir incremento en catabolismo de los tejidos, como sucede en el caso de inflamación crónica y neoplasia donde disminuye la albúmina y la transferrina. (22).

II.2.1.- FUNCION Y SIGNIFICADO CLINICO DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

Las Inmunoglobulinas (Ig), o anticuerpos, son proteínas capaces de combinarse específicamente con antígenos (23). Se sintetizan en las células plasmáticas. Están compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por puentes disulfuro (24). Cada cadena pesada o ligera está plegada sobre si misma y unida con enlaces disulfuro, formando lo que se conoce como regiones homólogas o dominios de Edelman (27). Estas regiones son constantes y se localizan hacia la porción amino terminal. La porción carboxiterminal presenta una gran variabilidad en su estructura primaria y se denomina región variable (19). Otras dos cadenas polipeptídicas accesorias tiene relevancia estructural para las Ig. Una es la cadena S (secretora), que se encuentra en el dímero de IgA (34). Esta no es sintetizada por las células plasmáticas y tiene fuerte afinidad por el moco (35), lo que contribuye a fijarle sobre

la mucosas. Por otra parte, la cadena J. se encarga de estabilizar y unir cinco monómeros IgM para formar un pentámero IgM y los dímeros de IgA. Tanto las cadenas pesadas (H) como las ligeras (L), poseen características antigénicas que permiten su clasificación basadas en sus alotipos, isotipos e idiotipos. El alotipo es un determinante antigénico diferente para los distintos individuos de la misma especie. Los isotipos son características antigénicas comunes a los individuos de la misma especie, lo que hace posible distinguir las cadenas ligeras (Kappa y lambda) y cinco clases de cadenas pesadas (gamma, alfa, mu, delta y epsilon). El idiotipo se debe a diferencias antigénicas causadas dentro del mismo isotipo dado por las diferencias estructurales de las regiones variables (32). Cada célula plasmática proviene de una clona es una clona y produce un solo tipo de inmunoglobulina (idiotipo) (32-35).

Es posible distinguir características funcionales diferentes en las varias clases de Ig:

IgM : generalmente se encuentran 5 monómeros unidos por una cadena J por lo que se le conoce como macroglobulina, representa el 5 a 10% de la concentración de Ig. Ha sido posible estudiar esta globulina por su presencia en ciertas alteraciones, como la macroglobulinemia de Waldenström y el mieloma múltiple (27, 36, 37). Los anticuerpos IgM se forman durante la respuesta inmune primaria al antígeno, es decir, de tipo humoral y funcionan como anticuerpos aglutinantes y fijadores del complemento. La IgM se encuentra casi ausente en el feto y sólo se eleva cuando existe algún estímulo antigénico, lo cual sucede

generalmente después del nacimiento. Este hecho es utilizado para el diagnóstico de infecciones intrauterinas (36, 37). Como se trata de una proteína de predominio intravascular, IgM es muy importante en la prevención de la diseminación hematogena de las infecciones. Tiene vida media de cinco días y su velocidad de catabolismo depende de la concentración sérica. La respuesta de IgM es relativamente de corta duración (27).

IgG : constituye más del 65% de las inmunoglobulinas totales, hallándose distribuida en forma equitativa en el plasma y en los líquidos de los tejidos. Tiene una vida media de 21 días. Se forma durante la respuesta secundaria a los antígenos y es importante fisiológicamente en la prevención de reinfección por bacterias y virus. La producción de IgG aparece después de la producción de IgM. La producción comienza durante los primeros meses de vida. En el recién nacido derivan en su totalidad de la circulación materna y le proporcionan buena protección contra infecciones microbianas. Sin embargo la cifra sérica declina a medida que la IgG materna es catabolizada, alcanzando alrededor de 25-30% de la cifra adulta 3-4 meses después del nacimiento. La IgG es la única globulina que atraviesa la placenta en el hombre, esta propiedad parece depender del reconocimiento, a nivel de las membranas fetales, de alguna estructura molecular localizada en las cadenas pesadas. El fragmento Fc perfunde la placenta con mayor facilidad que el fragmento Fab. Tiene la propiedad de fijarse en la piel y puede ser el agente causal de los fenómenos alérgicos en el hombre o inducir la anafilaxia

cutánea pasiva en el cobayo. Otra propiedad es la de activar el complemento sérico, y reaccionar con el factor reumatoideo (27).

IgA : generalmente se encuentra en forma de dímero y es alrededor de la cuarta parte de la concentración de Ig. Tiene un contenido elevado de carbohidratos que se encuentran asociados a las cadenas pesadas. Esta globulina se encuentra presente en cantidades elevadas en secreciones como la saliva, las lágrimas y el calostro. (37).

Como ya se indicó anteriormente, la globulina dimerica tiene además una cadena J y una pieza de transporte. Esta última se adiciona a la globulina durante el proceso de transporte a través del epitelio de las glándulas o a través de la superficie intestinal (27,36,37). La IgA secretora presenta una mayor resistencia que las otras inmunoglobulinas a la digestión por enzimas proteolíticas y a los agentes reductores, lo que en parte explica su papel protector a nivel de superficies mucosas (37).

La infección del aparato respiratorio por virus ocasiona una secreción de IgA específica en concentraciones elevadas. Esta globulina protege al huésped de contactos virales subsecuentes. La infección del intestino provoca la formación de coproanticuerpos que tienen actividad protectora (34).

IgE : Este anticuerpo se encuentra en muy pequeñas cantidades en la sangre. Ishizaka,T e Ishizaka,K (1966) fueron los primeros en obtenerla de un mieloma que secretaba IgE. Por otro lado es frecuente observarla elevada en el suero de individuos alérgicos. Las células plasmáticas que producen IgE se encuentran en gran cantidad en la

mucosa respiratoria e intestinal y en las secreciones exocrinas que bañan estos tejidos. Tiene la propiedad de fijarse en los tejidos sobre todo en las células cebadas y no precipita ni fija complemento por la vía clásica de activación (27).

IgD : Constituyen una pequeña parte de las inmunoglobulinas circulantes. Su descubrimiento se debió al hallazgo de un mieloma que no pertenecía a las otras clases de inmunoglobulinas (37), es muy susceptible a la acción de enzimas proteolíticas debido a que su conformación no es muy compacta. Su vida media es de tres días. El papel más importante de la IgD parece ser el de regular la respuesta inmune durante las etapas de maduración y desarrollo de los linfocitos B, encontrándose presentes sobre la superficie de los mismos (34).

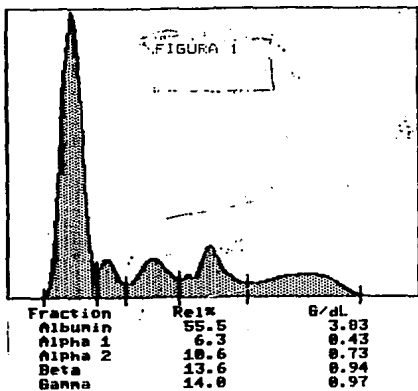
La concentración sérica de las Ig depende del balance entre su síntesis y su catabolismo y es diferente para cada clase. Son causa de hipogammaglobulinemia policlonal la malnutrición, senectud, inmunodeficiencias primarias, esplenectomía, gammopatías monoclonales, fármacos o agentes inmunodepresivos y radiaciones (2, 5). Mientras que existe hipergammaglobulinemia policlonal en casos de inflamación crónica y enfermedad hepática.

Por último, puede existir producción anormal de una inmunoglobulina, esta puede ser por disfunción de las células plasmáticas como es el caso de las gammopatías monoclonales benignas o por procesos neoplásicos de estas células como en el caso de mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström. En estos casos la Ig puede ser normal (con cadenas pesadas y ligeras) o anormal (sólo cadenas pesadas).

11.3.- PATRONES ELECTROFORETICOS EN DIVERSAS CONDICIONES PATOLOGICAS.

La electroforesis de proteínas es una técnica en donde se pueden valorar múltiples aspectos de las proteínas séricas. Al haber cambios en cualquiera de los componentes importantes habrá modificaciones en las diversas bandas. Así mismo pueden aparecer bandas que no son normales y denotan alteraciones de las células plasmáticas. Es una prueba de tamizaje cuando se sospecha mieloma múltiple y además da información en otras condiciones patológicas.

La figura 1 describe el patrón electroforético habitual sobre soporte de gel de agarosa obtenido de sueros de adultos aparentemente sanos. Se pueden observar cinco distintas bandas de proteínas. Estas regiones y las áreas entre las mismas, representan aproximadamente cien proteínas individuales.



Como se puede observar en la figura 1, la banda más grande es la albumina, la cual puede estar precedida anodalmente por otra banda, prealbumina. La banda de albumina es seguida por una banda conocida como región alfa-1 donde migran alfa-1 antitripsina, alfa-1 lipoproteína (apoproteína) y/o alfa-1 antiqumotripsina. En seguida de la región alfa 1 se encuentra la región alfa-dos cuyos componentes principales son alfa-2 macroglobulina y haptoglobina. Dentro de esta región también se puede encontrar la ceruloplasmina y la alfa-2 glicoproteína. La región beta la constituyen dos proteínas transferrina y luego complemento C3: en ocasiones estas pueden quedar generadas formando las bandas beta-1 y beta-2 (23). Por último encontremos la región gamma que consiste de inmunoglobulinas: IgG, IgA e IgM. Normalmente una producción heterogénea de estas inmunoglobulinas deja ver una zona difusa en el trazado electroforético. (7, 23).

Las alteraciones en la electroforesis de proteínas pueden ser cuantitativas, cuando disminuye o aumenta la cantidad de alguna proteína. Al realizar la electroforesis y hacer lectura densitométrica las alteraciones más apreciables son en la albumina, alfa-1 antitripsina, haptoglobina, transferrina, C3, e inmunoglobulinas. Estas alteraciones pueden ser genéticas (ausencia de alfa-1 antitripsina) o adquiridas (hipoalbuminemia) (23).

En el caso de las alteraciones cualitativas la proteína sérica es estructuralmente anormal, por lo que existen modificaciones fisicoquímicas y por lo tanto una movilidad diferente. Son ejemplos

la presencia de complejos inmunes que se presentan como bandas en la región gamma. En el caso de los picos monoclonales se observa una banda que no debería existir; en ocasiones son Iq normales pero que se presentan en forma de banda por su clonalidad, por otra parte puede tratarse de alguna Iq estructuralmente anormal. Para la detección de los picos monoclonales la sensibilidad de esta prueba es muy alta y sirve para seguir la respuesta de los pacientes a la terapia, por lo que es un gran marcador tumoral (38).

No es posible reflejar todas las alteraciones protéicas, pero trataremos de describir las más importantes y que generalmente están asociadas a patrones electroforéticos específicos.

P A T R O N D E I N F L A M A C I O N

La respuesta inflamatoria está acompañada por cambios protéicos característicos en el plasma. Estos cambios son conocidos como patrones de fase aguda (8). Dependiendo de la duración del proceso inflamatorio (19) se clasifican en agudos, subagudos y crónicos. Los cambios se deben a la necrosis tisular y a la liberación de mediadores como Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Factor de Necrosis Tumoral (FTN) y el Factor de estimulación Hepático (FSH) con sus dos componentes el F1SH y el F2SH o Interferón E2 (18), e inducen directa o indirectamente, modificaciones de numerosas proteínas plasmáticas. Estos factores, activan las RNA polimerases, estimulando la biosíntesis de RNAm y por tanto la

biosíntesis proteica: esto conlleva a hipertrofia del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, la activación de la glucosil transferasa y la glucosilación de la fracción proteica, lo que finalmente, da lugar a la secreción plasmática de estas proteínas. (35). También se sabe que los glucocorticoides tienen un papel potencializador de esta biosíntesis y que los estrógenos estimulan la biosíntesis de alfa-antitripsina, ceruloplasmina y fibrinógeno, mientras que disminuyen la de heptoglobina y alfa-glicoproteína. Un aumento de la permeabilidad capilar, causa redistribución de las proteínas y el líquido intra y extracelular. La albúmina, transferrina y la prealbumina, salen del torrente circulatorio por lo que existe reducción plasmática (18, 21).

En la siguiente tabla se presentan las alteraciones de las proteínas plasmáticas en los diversos tipos de inflamación :

CAMBIO PROTEICO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

FRACCION	AGUDA	SUBAGUDA	CRONICA
Proteínas Totales	N	N↑	
Albumina	↓	↓	↓
Banda alfa-1			
alfa-1 antitrip.	↑↑	↑	↑↓N
Banda alfa-2			
alfa-2 macroglo. heptoglobina	N ↑↑	↑	N
Banda Beta			
transferrina	↓	↑↑	↓-N
complemento C3	↑	↑	↓CN
Gamaglobulinas	N	↑	↑

Los pacientes con REACCIONES INFLAMATORIAS AGUDAS, generalmente exhiben proteínas totales normales. La albúmina puede mostrar un leve decremento con un marcado incremento en las bandas alfa 1 y alfa 2, debido al incremento en las proteínas de fase aguda. Los niveles de gammaglobulinas son usualmente normales. En enfermedades infecciosas tempranas pueden aparecer bandas oligoclonales en la región gamma (23). Estas bandas oligoclonales son indicativas de varias clonas de plasmocitos productores de anticuerpos que están formando complejos inmunes con los antígenos específicos. Eventualmente estas bandas desaparecen y son reemplazadas por la producción de anticuerpos policlonales (22).

Las proteínas cuyas concentraciones AUMENTAN durante la primera semana de la reacción inflamatoria se las llama proteínas de fase aguda, comprenden a la Proteína C Reactiva (PCR) que puede verse como una banda al final de la región gama, alfa-1 antitripsina (cuyas concentraciones aumentan en las primeras 5-10 horas del inicio del proceso inflamatorio), fibrinógeno, haptoglobina, alfa-1 glucoproteína ácida, alfa-1 antitripsina. De estas 4 últimas, la haptoglobina presenta un aumento más marcado y rápido, ya que su eliminación no se modifica o se reduce durante el proceso inflamatorio (19, 21). La transferrina y la albúmina son proteínas de fase aguda negativas, mostrando un decremento (23, 35).

El patrón de inflamación aguda puede ser diferenciado del patrón de malnutrición y de pérdida proteica no selectiva, en que no se eleva la alfa-2 macroglobulina (19).

INFLAMACIONES SUBAGUDAS.- producen modificaciones proteicas similares a las que se observan en la inflamación aguda.

En las infecciones subagudas, enfermedades de la colágena y padecimientos malignos se muestra un incremento en la fracción beta debido a incremento de CS. La banda alfa-2 globulina puede estar elevada cuando haya aumento en la LDL (39).

Estudios han mostrado que los niveles altos de alfa-1 glucoproteína ácida, alfa-1 antitripsina, haptoglobina y Proteína C reactiva se observa con infecciones bacterianas subagudas. En infecciones virales el incremento es relativamente corto en PCR y alfa-1 glucoproteína ácida con moderada elevación en alfa-1 antitripsina y haptoglobina (40).

El patrón de INFLAMACION CRONICA, puede ser observado en enfermedades infecciosas crónicas, en padecimientos del tejido conectivo, alergias y neoplasias malignas. En el trazado electroforético generalmente se observa un decremento en la albúmina con un incremento en las bandas alfa-1 y alfa-2, además existe un marcado incremento policonal en la región de gamma globulinas (23). La característica que distingue a este patrón de la de inflamación aguda es el incremento en las gammaglobulinas (22).

El aumento de algunas de las clases de Ig y las asociaciones clínicas más frecuentes son:

a) Aumento de IgG: se encuentra en el lupus eritematoso sistémico (LES) donde, en casos avanzados, puede alcanzar niveles muy elevados.

en la hepatitis crónica agresiva, en neoplasias avanzadas, absceso y en la hipergammaglobulinemia IgG de tipo familiar (21, 22, 41).

b) Aumento prevalente de IgA: se observa en cirrosis alcohólica (30), enfermedad pulmonar, artritis reumatoidea, inflamaciones intestinales, y en algunos casos de linfomas. En general, se observa un aumento de la IgA en las enfermedades que dañan el tejido epitelial (35).

c) Aumento de IgM: es típico en la cirrosis biliar primaria, lesiones intrauterinas, es también común en parasitosis por protozoarios e infecciones virales. Un aumento policlonal ocurre en el 40% de linfomas de alto grado, particularmente el inmunoblástico (35).

P A T R O N D E E N F E R M E D A D R E N A L . - P A T R O N N E F F O T I C O .

La nefrosis resulta de la pérdida de proteínas en la orina (30). El patrón nefrótico refleja permeabilidad alterada del aparato de filtración glomerular que se refleja en pérdida de sustancias de bajo peso molecular del plasma. El cuadro electroforético tiene un valor restringido en la enfermedad renal. Causas de daño renal incluyen : 1) infección (pielonefritis), 2) pérdida de proteínas, por defectos congénitos en la membrana basal glomerular, 3) activación del complemento y 4) depósitos de complejos inmunes en el glomérulo (30).

La albúmina está significativamente disminuida y la fracción alfa-1 puede ser normal o elevada debido a la retención de apolipoproteínas (alfa-lipoproteínas). La banda alfa-2 se incrementa

ya que la alfa-2 macroglobulina es una proteína grande que no pasa por los defectos de la membrana basal glomerular. Los niveles de transferrina pueden disminuir en el paciente nefrótico. El complemento C₃ en el caso de nefrosis lúpica puede estar disminuido debido a la incorporación dentro de complejos inmunes encontrados en la región subepitelial y subendotelial de el glómulo. Si se efectúa electroforesis en plasma, se observa un marcado incremento en fibrinógeno, especialmente en el síndrome nefrótico crónico (13).

En general, los patrones de pérdida de proteínas selectiva, pueden ser diferenciados de los patrones de pérdida proteínas al realizar electroforesis de proteínas en orina; si la alfa-2 macroglobulina se encuentra presente el daño renal es avanzado y se trata de una pérdida proteica no selectiva (21).

Se puede tener información más específica de acuerdo con las siguientes condiciones:

Glomerulonefritis aguda: caracterizada por una respuesta inflamatoria con C₃ normal o disminuido debido a su activación.

Glomerulonefritis membrano-proliferativa: muestra disminución marcada del C₃ con C₄ normal o aumentado (indicando una activación del sistema del complemento por la vía alterna probablemente inducida por el factor nefrótico).

Síndrome nefrótico: las modificaciones plasmoprotéicas son características e independientes de la etiología de este síndrome. Se deben a las pérdidas de proteínas de bajo peso molecular (albúmina, alfa-1 antitripsina, transferrina y frecuentemente las Ig), con

aumento relativo de la concentración de las proteínas de alto peso molecular (alfa-2 Macroglobulina, fibrinógeno, polímeros de la haptoglobina). La reducción de las proteínas de bajo peso molecular, sobre todo de la albúmina, se debe también al aumento de su catabolismo (7).

PATRON CARACTERISTICO DE SINDROME NEFROTICO

FRACCION	CONCENTRACION	COMENTARIO
Proteínas Totales	↓	
Albumina	↓	
Banda alfa-1	N-↑	incremento debido a apolipoproteínas
Banda alfa-2		
alfa-2 macroglo.	↑	
haptoglobina	N-↑	
Betalipoproteína	↑	
Banda Beta		
Transferrina	↓	
Complemento C3	↓-N	decrece en nefrosis lúpide.
Gamma globulinas	↓-N	IgG e IgA bajas IgM normal.

PATRONES EN ENFERMEDADES HEPATICAS Y DE VIAS BILIARES

El hígado es el órgano primario para la síntesis de la mayoría de proteínas plasmáticas (19). Cuando el daño del hígado es crónico y severo, la habilidad de éste para sintetizar proteínas y la

efectividad de las células de Kuffer para los procesos antigénicos, se ven afectados.

Kawai, y colaborados (23, 40) sostienen que los patrones electroforéticos en suero son muy complejos para el caso de la hepatitis y se pueden observar cualquiera de los siguientes patrones: 1) normal, 2) disminución de albúmina reflejando daño de células hepáticas, 3) decremento en albúmina con incremento en bandas alfa-1, alfa-2 y gammaglobulinas, es lo más común. Un incremento en la fracción alfa generalmente refleja un buen pronóstico; y 4) solamente la fracción gamma elevada reflejando daño de células intersticiales (30).

La inflamación aguda del parénquima hepático induce modificaciones de las proteínas que se diferencian del clásico cuadro observado en el curso de la inflamación. La alfa-1 antitripsina aumenta modestamente por aumento de síntesis. Su incremento es proporcional a la actividad flogística intrahepática. La alfa-1 glucoproteína ácida, no presenta modificaciones significativas. La disminución de la prealbumina se observa en el 54% de las hepatopatías y precede al decremento de la albúmina (21). Sin embargo, durante la fase de regeneración celular el nivel de la albúmina retorna a los niveles normales más precozmente que la prealbumina. Si existe hiperbilirrubinemia, la banda correspondiente a la albúmina migra hacia el ánodo. La alfa lipoproteína, es otra fracción que sufre disminución debido a la deficiencia de la enzima

esterificante del colesterol en el plasma: la lectin-colesterol-acil-transferasa (LACT). La concentración de la transferrina aumenta en la primera fase de la hepatitis aguda y disminuye en el caso de una merma importante de la masa celular funcional (6, 26).

Las modificaciones de las proteínas en el curso de las hepatopatías crónicas son muy variables. El complemento 3 disminuye en el 33% de las hepatopatías. Las causas de tal decremento se pueden deber a una reducción de su síntesis. Recordemos que C3 es sintetizado tanto en las células hepáticas como por los macrófagos y se ha teorizado sobre un posible empobrecimiento en macrófagos hepáticos durante la hepatitis crónica, o a un aumento de su consumo, debido a la presencia de inmunocomplejos. En casos de cirrosis la banda alfa-2, especialmente la haptoglobina tiende a decrecer, por reducción de su síntesis así como aumento de su consumo debido al incremento de la hemólisis originada por hipertensión portal que causa esplenomegalia (20).

Las inmunoglobulinas tienen un escaso significado en la hepatitis aguda, pero son importantes en el seguimiento ya que su aumento es señal de progresión hacia la hepatitis crónica. Las modificaciones de las inmunoglobulinas en las hepatopatías se describen en los siguientes cuadros:

ALTERACIONES DE LAS Igs EN LAS DIFERENTES ENFERMEDADES HEPATICAS

	IgG	IgA	IgM
Hepatitis aguda tipo A	↑	N	↑
Hepatitis aguda tipo E	(↑)	N	↑
Cirrosis alcohólica	↑	↑↑↑	N
Hepatitis crónica activa	↑↑↑	N	(↑)
Hepatitis crónica persistente	↑	N	(↑)
Cirrosis biliar primaria	N	↑↑	
Hepatocarcinoma	(↓) o ↑↑↑	N	

PATRON CARACTERISTICO HEPATODEGENERATIVO AGUDO, DIFUSO

FRACCION	CONCENTRACION	COMENTARIO
Proteinas totales	↓-N	
Albumina	↓-N	↓ en casos severos
Banda alfa-1	↓-N-↑	↑ en inflamación
Banda alfa-2		
alfa-2 macroglobulina	↓	
heptoglobina	↓	
Banda Beta		
transferrina	↓-N	
complemento C3	↓-N	
Gammaglobulinas	N-↑	quedan observarse bandas oligoclonales

PATRON EN ENTEROPATIA PERDEDORA DE PROTEINAS

Las modificaciones proteicas se deben generalmente a dos causas casi siempre concomitantes: la pérdida de proteínas y la inflamación. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa crónica inespecífica son ejemplos de esto. El orosomucoide y la haptoglobina están frecuente y notablemente aumentadas en la fase activa de estas enfermedades. El PCR es normal mientras que la alfa-1 antitripsina está ligeramente aumentada. En pérdidas asociadas a la inflamación, se observa un decremento de la alfa-1 lipoproteína y un aumento de la Beta-lipoproteína; mientras que en déficit nutricional primario se observa el cuadro contrario. Las proteínas de la fase aguda pueden permanecer normales ya que su síntesis aumentada queda enmascarada por sus pérdidas (15).

En el síndrome de malabsorción existen pérdidas proteicas debido a la inhabilidad de absorber aminoácidos esenciales y por tanto sintetizar proteínas. Las proteínas totales se reducen significativamente y la región alfa puede incrementarse. Las gammaglobulinas suelen presentar un descenso (23).

CARACTERISTICAS DEL PATRON DE ENTEROPATIA PERDEDORA DE PROTEINAS

FRACCION	CONCENTRACION	COMENTARIO
Proteinas totales	↓	
Albumina	↓	
Banda alfa-1	↑	
Banda alfa-2		
alfa-2 macroglobulina	N	
Haptoglobina	N	
Banda beta		
transferrina	N-↑	se incrementa en pérdida de sangre.
Complemento C3	N	
Gammaglobulinas	↓-N	

PATRON ELECTROFORETICO EN HEMOPATIAS

El patrón de anemia por deficiencia de hierro muestra distribución proteica normal excepto la fracción beta, la cual es marcadamente elevada debido al incremento de la transferrina (23). No obstante se debe recordar que la transferrina aumenta también durante el embarazo y en la primera fase de la hepatitis aguda (19).

En los casos de anemia hemolítica, el patrón presenta una reducción marcada de la haptoglobina, que rápidamente es eliminada bajo la forma de complejo con la hemoglobina en los hepatocitos. Si C3 y C4 están disminuidas, con incremento de IgG e IgM se puede sospechar de una enfermedad hemolítica autoinmune (27). También un aumento de la eritropoyesis ineficaz (observable en el curso de una carencia de vitamina B12, de ácido fólico, de anemia diseritropoyética, de hemoglobinopatía, etc.), induce una profunda disminución de la concentración de la haptoglobina (22).

FRACCION	DEFICIENCIA DE HIERRO		HEMOLISIS	
	CONCENT.	COMENTARIO	CONCENT.	COMENTARIO
Proteinas Totales	N			
Albumine	N		↓-N	
Banda alfa-1	N		N-↑	cambia con inflamación aguda
Banda alfa-2				
alfa-2 macroglobu.	N			
Haptoglobina	N		↓-N	cambia en inflamación aguda.
Banda Beta				
transferrina	↑-N	respuesta aguda es normal.	↓-N	"
Complemento C3	N		↓-N	"
Gammaglobulinas	N		N-↑	"

II.4.- GAMMAPATIAS MONOCLONES

II.4.1.- DESARROLLO NORMAL DE LOS LINFOCITOS B

Se pueden dividir la maduración y diferenciación de las células B en dos fases: La fase inicial consiste en la generación antígeno-independiente de la diversidad celular. La segunda fase está regulada por antígenos, interacción con células T y macrófagos, y tiene lugar en los órganos linfoides secundarios (21).

La célula madre origina la célula pre-B, que se caracteriza por la presencia de pequeñas cantidades de inmunoglobulina intracitoplasmática (IgTC) de tipo IgM, pero sin IgM de superficie. La célula pre-B se divide rápidamente y puede detectarse en el hígado fetal a partir de 7 semanas de gestación, 2 semanas antes de la detección de las células B con inmunoglobulina de superficie (IgS). Los linfocitos pre-B dan lugar a las células B con IgMS y receptores para FC y CS. Las células B, que producen otra clase de Ig, descienden de células que previamente sólo expresan IgMS. La IgDS se expresa de forma precoz en el desarrollo de todas las clases de células B, pero en un momento posterior al de la producción de IgM. Las células con IgSS e IgAS se detectan por primera vez hacia las 12 semanas de gestación. Estas células también expresan IgMS, y rara vez IgDS. Más adelante, IgSS e IgAS se pueden expresar de forma aislada o en combinación con IgDS, IgMS o ambas. A medida que transcurre la maduración, se pierde la IgDS.

En la segunda fase de maduración, los linfocitos B

interaccionan con antígenos en presencia de células T y de macrófagos y se transforman en células plasmáticas. Estas células se caracterizan por la abundante Ig intracitoplasmática (IgIC) que refleja la acumulación de Ig de la célula B activada. En esta fase se pierden los receptores FC y C3 y se reducen la IgS. Así pues, los linfocitos que portan IgS originan células que han de sintetizar IgM, IgG, IgA (Parkhouse, 1977) (21).

Al existir un proceso maligno de los linfocitos B, se detiene el proceso de maduración en una etapa y se puede producir alguna inmunoglobulina, de forma intracitoplasmática, superficial o secretada. Esto puede ser detectado utilizando diversas técnicas. Se pueden teñir las células malignas con anticuerpos anti Ig o si la proteína es secretada se puede detectar en una electroforesis de proteínas formándose una banda anormal (21).

La sospecha clínica de gammopatías puede ser debida a manifestaciones hematológicas, óseas, circulatorias, nefrológicas, infecciosas, etc.: por lo tanto, la detección de una banda homogénea, formada por inmunoglobulinas o sus fragmentos, sobre el trazado electroforético de las proteínas séricas, es un hecho frecuente en el laboratorio clínico de un centro de referencia para cáncer (34, 60).

Por otro lado, es importante conocer que existen anomalías moleculares y genéticas en los desordenes de las células plasmáticas. Las anomalías cromosómicas más frecuentes en estas patologías han sido estructurales y corresponden a los

cromosomas 1, 14, 11, 6, 7 y 3 con pérdidas frecuentes del cromosomas 5, 8, 17 y 12. La anomalía en el cromosoma 14+ es la más consistente y se asocia a patrones de enfermedades que progresan más rápido como en las leucemias de células plasmáticas. Tiene interés el oncogen N-ras y el receptor de IL6, ambos localizados en el cromosoma 1 (42, 43).

II.4.2.- GAMMAPATIAS MONOCLONALES BENIGNAS

El diagnóstico de gammapatía monoclonal benigna se hace en aquellos pacientes que presentan proteína monoclonal en suero pero que carecen de otros hallazgos diagnósticos para mieloma, macroglobulinemia o una de las otras neoplasias de células plasmáticas (44).

Se ha encontrado que el 1-2% aproximadamente de la población mayor de 25 años presente gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y ese porcentaje sube cerca del 3% en individuos de más de 60 años (45, 46). Después de un periodo de vigilancia, los individuos con GMSI, tienen cantidad relativamente pequeña de componente M en el suero, casi siempre menor de 2 mg/ml, y no excretan cadenas L por orina.

II.4.3.- MACROGLOBULINEMIA DE WALDENSTRÖM

Esta patología se observa en individuos de más de 40 años de edad, con una incidencia máxima entre los 60 y 70 años. Se caracteriza por proliferación policlonal de linfocitos (y células

Plasmáticas) y la presencia de por lo menos de 1 g/dl de IgM monoclonal o más en el suero, lo que constituye por lo menos un 15% de la proteína sérica total (21).

Los rasgos clínicos de la enfermedad son efecto del aumento de las macroglobulinas, las cuales causan síntomas debidos a un incremento en la viscosidad sérica y a la propia proliferación celular, que justifican la hepatoesplenomegalia y cierto grado de linfadenopatía. Es raro que presenten lesiones osteolíticas, en contraste con el mieloma en que si se presentan. Es característico observar filas de células rojas (rouleaux) en los frotis de sangre, en donde suelen estar aumentados los linfocitos. La globulina sérica está aumentada notablemente y la identificación de esta paraproteína se consigue por inmunofijación, la cual se requiere para la caracterización definitiva de la proteína (IgM unida a un tipo de cadena ligera). Por lo general la IgM monoclonal total supera los 10 mg/ml. (44)

II.4.4.- ENFERMEDAD DE CADENAS PESADAS

Se conoce que un pequeño número de pacientes producen y excretan fragmentos de cadena pesada sin cadenas ligeras asociadas. Algunas de estas presentan mutaciones estructurales (Frangione1973).

La mayor parte de estas enfermedades están asociadas a las siguientes cadenas: a) gamma.- Este trastorno se parece clínicamente más a linfoma maligno que al mieloma ya que presenta linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. Con frecuencia en la sangre se observan

linfocitos atípicos o células plasmáticas, en médula ósea tenemos aumento de células plasmáticas. Se ha encontrado en el trazado electroforético que la mayoría de los sueros de estos pacientes presentan en la región beta-gamma una banda de proteínas séricas, más bien ancha, acompañada por hipogammaglobulinemia. El diagnóstico se lleva a cabo demostrando que las proteínas reaccionan a la inmunoelectroforesis con antisueros para las cadenas gamma, pero no para las cadenas ligeras. b) Cadenas pesadas alfa.- Esta enfermedad aparece con mayor frecuencia que en la región gamma e incluye un grupo de edad más joven. Suele presentarse con una infiltración linfoplasmocítica masiva de la mucosa intestinal o un linfoma histiocítico del intestino. Generalmente, la electroforesis de proteínas es negativa, pero pueden detectarse pequeñas cantidades de cadenas alfa en el suero con el método de inmunofijación. La proteína anormal no contiene cadenas ligeras. c) Cadenas pesadas mu.- Es de poca frecuencia, los pacientes presentan leucemia linfocítica crónica con células plasmáticas vacuoladas en la médula ósea. La electroforesis de proteínas suele presentar hipogammaglobulinemia. La cadena pesada μ se detecta por inmunoelectroforesis o inmunofijación (21).

II.4.5.- MIELOMA MULTIPLE

Las gammopatías monoclonales caracterizan al Mieloma Múltiple que es una neoplasia maligna de células plasmáticas. En su mayoría secretan alguna inmunoglobulina anormal que define a la clona

maligna, con la concomitante supresión en la síntesis de otras clases de inmunoglobulinas. La proteína anormal es homogénea, es decir, la Ig completa y/o de sus subunidades (9, 22, 35, 45). Este pico monoclonal se presenta en suero en la gran mayoría de los casos, sin embargo al aparecer daño renal por el mismo depósito de las cadenas en el intersticio podemos tener bandas anormales en orina. Así mismo, si existe componente libre de cadenas ligeras estas pueden pasar a orina, a este componente se le conoce como proteína de Bence Jones (21, 31, 47).

La frecuencia con la cual los diferentes tipos de proteínas monoclonales son producidos por las neoplasias de células plasmáticas se muestra en la siguiente tabla:

TIPO DE PROTEINA MONOCLONAL	PORCENTAJE (%)
IgG	52
IgA	21
IgM	12
IgD	2
IgE	<0.01
Cadenas ligeras(k o lambda)	11
Cadenas pesadas	<1
2 o más proteínas monoclonales	<1
Sin proteína monoclonal en suero	1

(Datos sobre 1827 pacientes recopilados por Fruzanski y Orzylo) (35, 58).

Si la proteína monoclonal secretada está compuesta solamente de cadenas ligeras se le conoce como enfermedad de cadenas ligeras. En estos casos el bajo peso molecular de las cadenas ligeras hace que se excreten en la orina, por lo que es posible que en el suero no se encuentre el componente monoclonal. Por lo tanto es siempre necesario efectuar su investigación en orina (35).

Por otro lado, la cantidad de la inmunoglobulina monoclonal circulante es directamente proporcional a la masa celular monoclonal. Debemos recordar que las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen diferente metabolismo, así: la IgA y la IgM se catabolizan más rápidamente que la IgG, por lo que para que se mantenga un cierto nivel de la inmunoglobulina circulante es necesario una mayor masa neoplásica (42).

Se requiere para un diagnóstico clínico de mieloma múltiple la demostración de plasmocitosis en la médula ósea, una o varias lesiones líticas de hueso y la presencia de producción importante de inmunoglobulina monoclonal. La presencia de lesiones líticas en el hueso es el mejor signo a este respecto, esta destrucción ósea conduce a la movilización del calcio, con aumento de los niveles de éste en el suero y la calcificación metastásica. La supresión de inmunoglobulinas normales, así como la anemia, hipercalcemia, hiperazoemia, desmineralización ósea, fracturas por compresión y progresión del padecimiento, son apoyo en el diagnóstico de la enfermedad (29).

El trastorno de la función renal ejerce un efecto

desfavorable sobre la supervivencia, así los pacientes con creatinina sérica mayor a 2 mg/dl. tienden a tener mal pronóstico (44).

En cuanto a aspectos de laboratorio se observan, anemia normocrómica y normocítica, pudiendo existir en el frotis sanguíneos normoblastos. El rasgo más sorprendente del frotis sanguíneo es la formación de gran número de pilas de moneda (rouleaux), esto es los eritrocitos se pegan unos a otros por el alto contenido de proteínas. En médula ósea se observan células plasmáticas, que varían de 1 a más 90%. Con frecuencia la globulina sérica suele estar aumentada de forma sorprendente, lo que conlleva a elevación en la velocidad de sedimentación globular. Generalmente la electroforesis de proteínas muestra una banda homogénea en la región beta o gamma asociada con hipogammaglobulinemia policlonal. Sin embargo pueden existir casos con 2 bandas o picos anormales, esto se puede deber a que existan Igs completas (cadenas pesadas y ligeras) aunada a exceso de cadenas ligeras libres de la misma categoría o muy raramente a casos de biconalidad (51). La inmunofijación caracteriza y tipifica a la inmunoglobulina anormal y de esta manera se caracteriza al mieloma (21).

II.4.6.- LINFOMAS Y LEUCEMIAS

La inmunoglobulina monoclonal también llamada componente M o proteína M se ha encontrado asociada a linfomas en un 6% de los casos (35, 50). La mayoría de los (49) Linfomas No Hodgkin se originan de linfocitos B, por lo tanto, no es sorprendente que

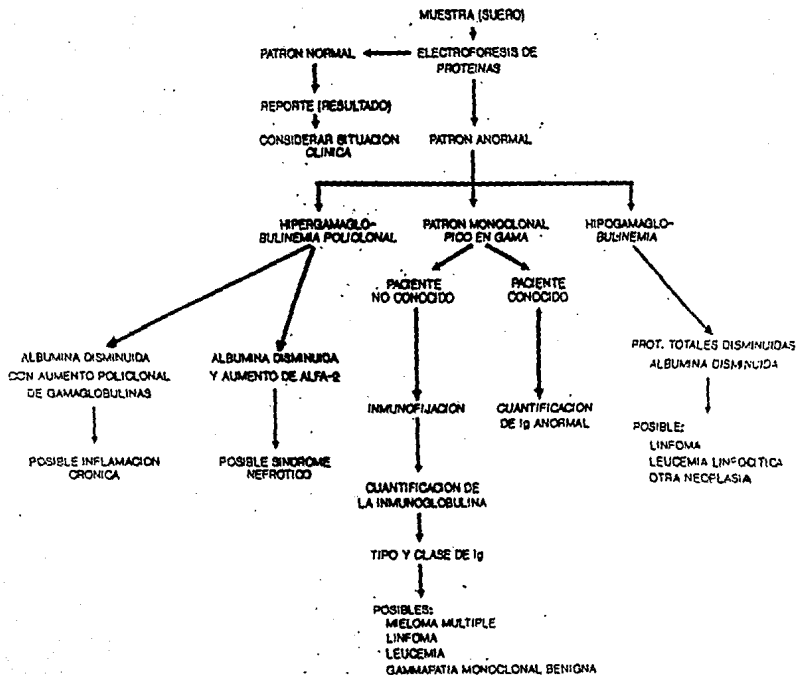
algunas células tumorales produzcan intracelularmente una u otra clase de inmunoglobulina anormal (50), e incluso lleguen a secretarla formando picos monoclonales (22). Los picos monoclonales asociados con linfomas han sido caracterizados como IgM de cadena kappa (aproximadamente el 50%), seguido por IgG (30%), mientras que el resto son IgA, IgE e IgD (35).

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- DIAGRAMA DE FLUJO (ANEXO I)

1) Se utilizó suero de pacientes a quienes se le solicitó electroforesis de proteínas y/o cuantificación de inmunoglobulinas. 2) Se realizó electroforesis de proteínas utilizando los geles de agarosa del Sistema Paragon (Beckman), 3) Se realizaron tanto un trazado densitométrico como interpretación visual del gel por un médico y un químico. 4) Si se observó pico monoclonal o sea una banda anormal en la región gamma o un aumento en las bandas alfa o beta, acompañado de hipocamaglobulinemia, se efectuó inmunofijación para tipificar el componente monoclonal. 5) Después de conocer cual era la inmunoglobulina anormal se procedió a determinar cuantitativamente la gammaglobulina monoclonal utilizando inmunofijación radial. 6) El resultado del laboratorio incluyó el trazado densitométrico, la cuantificación de cada banda y la interpretación visual. 7) Para seguir a los pacientes que tuvieron inmunoglobulinas monoclonales se llevó un fichero en el cual se anotaron nombres, número de expediente, fecha de primera inmunofijación, tipo de Ig y cuantificaciones subsecuentes con fecha. Aquellos pacientes con picos monoclonales que habían sido caracterizados previamente, solo se les realizó cuantificación de Ig anormal. 8) Si el trazado electroforético del suero no denotó la presencia de pico monoclonal, se concluyó el estudio con la interpretación del patrón electroforético (inflamación crónica, etc.).

DIAGRAMA DE FLUJO



III.2.- SELECCION DE PACIENTES.

Se efectuó la revisión retrospectiva de los expedientes clínicos de todos los pacientes a los que se les realizó electroforesis de proteínas durante el periodo comprendido de Enero a Diciembre del año 1972, en el laboratorio clínico del Instituto Nacional de Cancerología.

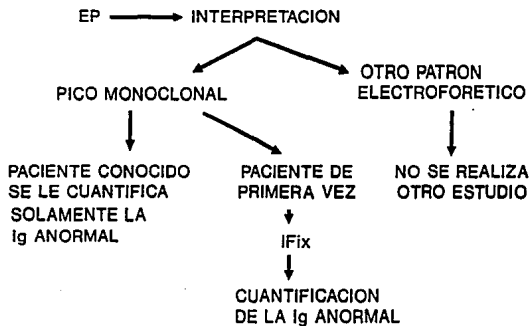
Los datos clínicos registrados para este estudio fueron: Datos demográficos, estudio de laboratorio, estudio de radiología, estudio de patología, diagnóstico inicial, diagnóstico final, tratamiento y sobrevida.

Es importante notar que algunos de los pacientes con picos monoclonales fueron diagnosticados en el Instituto desde 1960 y han sido seguidos hasta 1972.

III.3.- EVALUACION DE COSTOS

Para evaluar los costos de las electroforesis de proteínas y de la cuantificación de inmunoglobulinas, se diseñó en el laboratorio un esquema de trabajo a seguir. Se tomó en cuenta los costos de cada una de las pruebas, los mismos que son: N\$ 36,00 para EP y N\$ 87,00 para la cuantificación de Igs. Estos costos reales son el resultado de tomar en cuenta costos de mano de obra (trabajo del Químico), luz eléctrica, utilización de equipo, gastos de reactivos, tiempo de realización de la prueba y reporte de resultados. (ANEXO II)

EN EL LABORATORIO SE IMPLEMENTO
EL SIGUIENTE ESQUEMA DE TRABAJO



INÇan

III.7.- ANALISIS ESTADISTICO

Se aplicó análisis de frecuencias de los diversos acontecimientos utilizando porcentajes, medias, e intervalos de frecuencias. A su vez se realizó análisis de sensibilidad y especificidad utilizando el teorema de Bayes para evaluar la presencia de picos monoclonales en la electroforesis de proteínas en pacientes con mieloma múltiple. (55)

IV.- RESULTADOS

IV.1.- CORRELACION GLOBAL DE LOS DIAGNOSTICOS FINALES DE LOS PACIENTES Y LOS PATRONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.

En el Laboratorio Clínico (Área de Marcadores Tumorales) del Instituto Nacional de Cancerología, se realizaron 553 electroforesis de proteínas (EPs) durante el año 1982. De estas, 209 (38%) correspondieron a pacientes vistos por primera vez en el Instituto. Encontramos 49 (23.4%) casos con mieloma múltiple, 6 (2.9%) con plasmocitoma, 99 (47.4%) con neoplasias hematólogicas y el resto con neoplasias diversas o sin cáncer.

En la tabla 1 y 2 se presentan los diagnósticos clínicos y la correlación con el patrón de electroforesis de los 209 pacientes vistos por primera vez.

-----TABLA 1-----

DIAGNOSTICO CLINICO	Nro. PACIENTES	PORCENTAJE
Mieloma Múltiple (MM)	49	23.4%
Plasmocitoma (P)	6	2.9%
Linfoma No Hodgkin (LNH)	67	32.2%
Enfermedad de Hodgkin (EH)	20	9.6%
Leucemia (L)	12	5.8%
Otros cánceres (OC)	36	17.2%
Sin cáncer (SC)	19	9.0%
TOTAL: 209		

-----TABLA 2-----

RELACION DEL DIAGNOSTICO ELECTROFORETICO CON EL DIAGNOSTICO DEL PACIENTE.

DIAGNOSTICO FINAL DEL PACIENTE

RESULTADO DE LA EP.	MM	F	LNH	EH	L	OC	SC
PM	: 35 (72%)	1 (17%)	4 (6%)	-	-	-	-
> alfa 2	: 2 (4%)	-	3 (5%)	-	1 (8%)	-	-
> beta	: -	-	1 (2%)	-	-	1 (3%)	-
IC	: 3 (6%)	1 (17%)	22 (32%)	12 (60%)	1 (8%)	14 (37%)	5 (26%)
IR	: -	-	3 (5%)	-	-	2 (6%)	-
> gamma	: -	1 (17%)	11 (16%)	5 (25%)	3 (25%)	6 (17%)	7 (37%)
< gamma	: 1 (2%)	-	1 (2%)	-	-	-	2 (11%)
Normal	: 8 (16%)	3 (50%)	22 (32%)	3 (15%)	7 (58%)	13 (36%)	5 (26%)

PM= pico monoclonal. > alfa2= incremento en la banda alfa-2. > beta= incremento en la banda beta. IC= inflamación crónica. IR= insuficiencia renal. >gamma= hipergamaglobulinemia. <gamma= hipogamaglobulinemia. MM= mieloma múltiple. F= plasmocitoma. LNH= linfoma no Hodgkin. EH= enfermedad de Hodgkin. L= leucemia. OC= otros cánceres. SC= sin cáncer.

Trecientos cuarenta y cuatro (62%) de las electroforesis fueron repeticiones de los casos anteriores, y se encontraron los siguientes diagnósticos: 271 electroforesis correspondieron a pacientes con Mieloma Múltiple, 14 a Plasmocitomas, 12 para Linfomas

No Hodgkin, 6 Enfermedades de Hodgkin, 2 Leucemias, 33 a pacientes con otros cánceres y 6 sin cáncer.

Tomando en cuenta a todos los pacientes de la tabla 2 se efectuó una tabla de contingencias de 4 x 4 para obtener sensibilidad y especificidad (Teorema de Bayes).

Pacientes con diagnóstico de Mieloma Múltiple:

		si	no
Picos Monoclonales	si	35	5
	no	14	153

Sensibilidad = 71.4%

Especificidad = 96.8%

IV.2.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE MIELOMA MULTIPLE

De los 49 pacientes con diagnóstico de MM, 24(49%) fueron mujeres y 25 (51%) hombres. El promedio de edad de los pacientes considerados en el estudio fue 57 años con un rango de 37 a 87 años. Los resultados del laboratorio se presentan en tabla 3:

-----TABLA 3-----

PARAMETRO	RESULTADOS DE LABORATORIO	
	MEDIA	INTERVALO
Hb/Hto (g/%)	10.88/32.82	5.7-14.9/17.4-45.1
CALCIO (mg/dl)	9.96	8.4-15.4
CREATININA (mg/dl)	2.11	0.5-14.4
PROTEINAS TOTALES (g/dl)	9.1	5.4-19.4
ALBUMINA (g/dl)	3.2	1.51-4.6
GLOBULINA (g/dl)	5.57	2.47-13.2

Sobre este punto cabe precisar que 10 (21%) pacientes tenían insuficiencia renal (creatinina mayor a 1.8). 26 (55%) presentaron rouleaux. 16 (32.6%) tenían anemia (Hb menor a 10 g%). 32 (65.3%) tuvieron globulinas por arriba de lo normal y 9 (18.4%) presentaron hipercalcemia (calcio mayor a 11 mg/dl.).

En cuanto al estudio de Radiología: 44 (90%) tuvieron lesiones líticas múltiples, 4 (8%) una sola lesión lítica y en un (2%) paciente no se efectuó su estudio radiológico.

En cuanto a estudio de biopsia de médula ósea los resultados fueron: 33/49 (67%) pacientes presentaron infiltración por células plasmáticas 10 (20%) fueron normales y 6 (13%) no se reportaron. La media del porcentaje de células plasmáticas fue de 21.93 con un intervalo de 1 a 83 %. considerándose a 36 (73%) pacientes con valores anormales (arriba de 3%).

Se encontró pico monoclonal en las electroforesis de

proteínas en 35/49 (72.%) pacientes de los casos con mieloma múltiple.

En la tabla 4 se presenta la frecuencia de inmunoglobulina (Ig) anormal en estos 49 pacientes. Como se podrá observar la mayor incidencia de Ig alterada es IgG (64%), encontrándose estos porcentajes semejantes a los reportados en la literatura (35) .

-----TABLA 4-----

Ig ANORMAL	PACIENTES (%)	CONCENTRACION MEDIA g/L.	INTERVALO
Ig G	27 (60%)	52	7.0-150.2
Ig A	5 (10%)	22.5	6.3-74.5
Ig M	1 (2%)	4.8	-
Ig no detectada	14 (28%)	-	-
TOTAL	47		

Es importante recalcar en este punto que para el diagnóstico de MM, el estudio electroforético es un marcador que sirve para monitorear la evolución del paciente, lo cual se evidenció en el número de Electroforesis repetidas con una media de repeticiones para cada paciente de 17 con un rango de 1-65 por paciente.

El servicio donde fueron atendidos por primera vez estos pacientes y a su vez se les solicitó la electroforesis de proteínas se detalla en la siguiente manera:

Hemato-oncología	:	30	pacientes
Linfomas y Leucemias	:	7	"
Piel y Partes blandas	:	6	"
Medicina Interna	:	2	"
Cabeza y Cuello	:	2	"
Neurología	:	1	"
Radioterapia	:	1	"

Como se puede observar, 30/49 pacientes fueron remitidos de Hemato-oncología lo que hace pensar que la prueba electroforética, sirve de apoyo para confirmar un diagnóstico. Diez y nueve pacientes entraron por otro servicio que no fue Hemato-oncología.

IV.3.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE PLASMOCITOMA

Del estudio retrospectivo de expedientes clínicos, se encontró que 5 pacientes tuvieron diagnóstico de Plasmocitoma. De estos pacientes 2 (40%) fueron mujeres y 3(60%) hombres. El promedio de edad fue 40 años con un rango de 23 a 63. Los resultados de laboratorio se detallan en la tabla 5.

-----TABLA 5-----

PARAMETRO	RESULTADOS DE LABORATORIO		
		MEDIA	INTERVALO
Hb/Hto (g%/%)	13.2/39.1	8.2-15.6/25.1-47	
CALCIO (mg/dl)	9.7	8.2-10.9	
CREATININA (mg/dl)	0.75	0.5-1.1	
PROTEINAS TOTALES (g/dl)	7.1	5.9-7.8	
ALBUMINA (g/dl)	3.2	2.1-3.8	
GLOBULINAS (g/dl)	3.8	3.1-5.4	

Encontrándose anemia en un solo caso, no hubo pacientes con insuficiencia renal y solamente uno presentó aumento en las globulinas.

De estos pacientes, 3 tuvieron una sola lesión lítica (característica que la hace propia de éste diagnóstico), y 2 no la presentaron. Se encontró Pico Monoclonal en el trazado electroforético de un solo paciente y al cuantificar sus inmunoglobulinas encontramos que correspondió a una IgA. Es importante notar que el diagnóstico de éstos pacientes fue dado por el estudio patológico del tumor.

El servicio del cual fueron remitidos estos pacientes fue: Hemato-oncología 2, Neurología 1, Piel y Partes Blandas 1, y Radioterapia 1.

IV.4.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LINFOMAS

De los 87 pacientes con diagnóstico de Linfomas, 67 (77%) casos fueron de LINFOMA NO HODGKIN, mientras que 20 (22.9 %) de ENFERMEDAD DE HODGKIN.

En cuanto a sexo, 47/87 (54%) fueron hombres y 40/87 (45.9%) mujeres. Presentaron una edad promedio de 40.4 con un intervalo de 15 a 84 años.

Los estudios de laboratorio en el momento del Diagnóstico inicial se presentan en la tabla 6.

-----TABLA 6-----

RESULTADOS DE LABORATORIO:

PARAMETRO	LINFOMA NO HODGKIN		ENFERMEDAD DE HODGKIN	
	MEDIA	INTERVALO	MEDIA	INTERVALO
Hb/Hto (g%/%)	14/39	7.9-17.9/ 21.3-50.7	13.3/38	8.8-7.7/ 28.2-50
LINFOCITOS (%)	25.4	5-46	22.5	6-38
PMN (%)	66.4	19-94	71.2	58.2-90
PROT.TGT (g/dl)	9.2	3.31-12.9	7.6	5.3-8.5
ALBUMIN (g/dl)	3.2	1.1-5.5	3.3	2.1-4.5
GLOFUL. (g/dl)	3.8	2.2-8.8	4.3	3.1-5.8

Como se puede observar hubo 10 casos (11.5%) con anemia, 5 (5.7%) con neutropenia y 21 casos (24%) con globulinas aumentadas. De estos 27 pacientes, 6 (6.8%) presentaron Rouleaux.

De los estudios de MEDULA OSEA se obtuvo lo siguiente: La media del porcentaje de linfocitos para LNH fue de 19.8 con un rango de 0.0-76 y para enfermedad de Hodgkin de 19.2 con un intervalo de 10 a 69 (valor normal hasta 23%). La biopsia de médula ósea demostró infiltración por el proceso neoplásico en 15(17.2%), normales 27(31%), otros diagnósticos 21(24.2%) y no reportadas 24 (27.5%). En la tabla 7 se presenta la descripción de los patrones electroforéticos anormales encontrados tanto en linfoma de Hodgkin como en linfoma no Hodgkin.

-----TABLA 7-----

Dn. EF	LINFOMA NO HODKIN	ENFERMEDAD DE HODKIN
PICO MONOCLONAL	4 (6%)	0
INCREMENTO EN BANDA BETA	1 (2%)	0
INCREMENTO EN ALFA-2	3 (5%)	0
HIPERGAMAGLOBULINEMIA	32 (47%)	15 (75%)
NORMALES	28 (40%)	5 (25%)

Es importante notar que 22 (32%) pacientes presentaron patrón electroforético de inflamación crónica y 3(5%) de insuficiencia renal.

Al analizar los resultados de los pacientes con Linfomas, se observa que de los 67 pacientes con linfoma no hodgkin 4 presentaron pico monoclonal (definida como una banda en la región gamma o un incremento en la región beta o alfa-2 acompañado por hipogammaglobulinemia): 1 tuvo incremento en la región beta (acompañada por hipergammaglobulinemia pero no hiposalbuminemia, sugestivo de inflamación crónica), 3 tuvieron incremento en alfa-2 con hipergammaglobulinemia, 32 pacientes tuvieron inflamación crónica típica y 28 casos presentaron electroforesis dentro de límites normales.

Los cuatro pacientes con pico monoclonal asociado a linfoma no Hodgkin son casos raros que vale la pena estudiar más a fondo. Sus datos demográficos y de laboratorio se presentan en la tabla 9. Como podrá observarse en esta tabla todos los picos

monoclonales correspondieron a IgA (obtenido por inmunofijación). En todos los casos el tumor de origen se presentó en el ganglio linfático o tejido periorcular; ninguno de los pacientes tenía localizada la neoplasia en el tracto gastrointestinal o respiratorio. En tres de los casos el estudio patológico demostró un linfoma no Hodgkin difuso de células pequeñas o sea de grado intermedio en la clasificación de la formulación de trabajo. Sólo hubo un caso con un linfoma de alto grado (multilobulado de células grandes). De los pacientes con alteraciones en la banda beta y alfa-2 se puede presuponer que tuvieron IgA anormal. Sin embargo no se realizó inmunofijación para corroborar este diagnóstico.

-----TABLA B-----

DATOS DEMOGRAFICOS Y DE LABORATORIO				
	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
SEXO	F	M	F	
EDAD	52	70	66	38
Hb/Hto (g%/%)	10.9/33	14.6/44	13.6/40	9/26
LEUCOCITOS (mil/cc)	5.4	6.8	3.5	5.4
ROULEAU	-	-	-	SI
PROT. TOTALES (g/dl)	7.6	7.6	8.3	11.2
ALBUMINA (g/dl)	3.9	2.9	2.8	2.4
GLOBULINA (g/dl)	3.7	4.7	5.5	8.8
Dx. EP	PM en Beta	PM en Beta	PM en Beta	PM en Beta
Ig. ANORMAL	IgA	IgA	IgA	IgA
CUANTIFIC. de Ig	5.6	11.4	10.5	74.7
SITIO DE BIOPSIA	GL	Tejido periorcu.	GL	GL
Dx. PATOLOGICO	LNH difuso de células pequeñas	LNH multi-lobulado de cél. grandes	LNH difuso de células pequeñas	LNH difuso de células pequeñas

GL = ganglio linfático

El servicio donde se solicitó la electroforesis de proteínas se distribuye detalladamente en la tabla que sigue:

Hemato-oncología	=	58	pacientes
Cabeza y Cuello	=	17	"
Linfomas y Leucemias	=	6	"
Ginecología	=	1	"
Gastroenterología	=	2	"
Piel y Partes Blandas	=	3	"

Como se observa en la tabla anterior, 23 pacientes provinieron de otro servicio que no fue hemato-oncología (linfomas y leucemias).

IV.5.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LEUCEMIAS

Se encontró que 12 pacientes tuvieron diagnóstico de Leucemias de distintos tipos, con una edad promedio de 35 años y con un rango de 17 a 85 años. Dieve (81.8%) de ellos fueron hombres y 2 (18.2%) mujeres.

Los resultados del laboratorio se presentan en la tabla 9.

-----TABLA 9-----

RESULTADOS DE LABORATORIO:

PARAMETRO	MEDIA	INTERVALO
Hb/Hto (g%/%)	12.66/38.3	7.3-16.2/26.7-49.8
LEUCOS miles/mL.	11.56	2.7-21.9
LINFOCITOS (%)	54.2	2-80
PMN (%)	41.4	9-52
PROTEINAS TOTALES (g/dl)	8.3	3.1-8.5
ALBUMINA (g/dl)	3.7	3.1-4.5
GLOBULINAS (g/dl)	3.1	2.5-3.6

Ninguno de estos pacientes presentó Rouleaux, ni alteración en los niveles de proteínas totales. 2 (16.6%) presentaron anemia (Hb menor a 10 g%) y 4 (33.3%) leucocitosis. Los diagnósticos de las leucemias fueron: 3 mieloides agudas, 3 linfocíticas crónicas, 2 granulocíticas crónicas y 4 linfoblásticas agudas.

En lo que se refiere a estudio de Médula Ósea se obtuvo lo siguiente: La media porcentual de linfocitos fue de 22.6 con un rango de 6-70. Del estudio de Biopsia de Médula se presentaron 10 casos con infiltración del proceso linfoproliferativo y 2 con diagnóstico de médula Ósea normal. Todos los pacientes recibieron tratamiento.

El estudio electroforético reflejó que ninguno presentaba pico monoclonal, un paciente presentó elevación en banda beta, se le cuantificaron las inmunoglobulinas mismas que entraban en los valores normales, uno presentó patrón de inflamación crónica, 3 hipergammaglobulinemia policlonal y 7 fueron normales.

Todos estos pacientes provinieron del servicio de hematología.

IV.6.- PACIENTES CON OTRAS NEOPLASIAS Y SIN ENFERMEDADES NEOPLASICAS.

De los 209 pacientes analizados en esta investigación, 39 tenían diagnóstico que no correspondía a enfermedad linfoproliferativa, y se repitió la electroforesis de proteínas en prácticamente todos ellos ya que se realizaron 73 electroforesis en estos 39 pacientes.

La procedencia de solicitud para realizar electroforesis vino de los siguientes servicios:

Hemato-oncología	=	9	pacientes
Oncología médica	=	4	"
Gastroenterología	=	7	"
Hiel y partes blandas	=	7	"
Tumores Mamarios	=	4	"
Cabeza y Cuello	=	2	"
Ginecología	=	2	"
Linfomas y Leucemias	=	2	"
Radioterapia	=	1	"
Urología	=	1	"

Por otra parte los diagnósticos finales para estos pacientes fueron: 11 Adenocarcinoma, 6 Melanomas, 10 Carcinomas, 12 con otros cánceres. Ninguno presentó pico monoclonal, 14 presentaron inflamación crónica, 3 tuvieron hiperгамaglobulinemia policlonal. Esto indica que la electroforesis no tuvo valor diagnóstico y/o pronóstico en estas patologías.

Existieron 19 pacientes que no tenían cáncer y que se les solicitó electroforesis de proteínas, los resultados tanto de laboratorio, médula y radiológicos fueron normales.

IV.7.- RESULTADOS DEL COSTO DE ESTAS PRUEBAS:

ELECTROFORESIS E INMUNOFIJACION.

Si evaluamos el costo y beneficio del estudio de electroforesis de proteínas vemos que 127 electroforesis fueron realizadas innecesariamente (62 en pacientes con desordenes no

hematológicos o que no tenían cáncer y 59 repeticiones de los mismos pacientes). Si el costo de cada de EP en el año 1972 era de N\$ 39.00, se gastaron injustificadamente N\$ 4.953 pesos. Nuestros datos muestran (tabla 1), que se puede reducir el costo seleccionando a los pacientes, de tal manera que solo se realizaría este estudio si el paciente tiene MM, P, Linfomas y Leucemias, o por lo menos al no repetir electroforesis de pacientes sin estos diagnósticos.

Se realizó el análisis del costo de las determinaciones de Ig. El total de inmunoglobulinas cuantificadas fue de 325. Cuarenta de las 325 fueron casos con picos monoclonales en pacientes de primera vez, y 285 Ig en electroforesis de proteínas con gammopatías que han sido seguidas por el INCAN antes de 1972. Mediante nuestro esquema de trabajo para electroforesis, no se realizaron aproximadamente 200 cuantificaciones pedidas por los médicos tratantes ya que el 90% de las requisiciones para la realización de electroforesis de proteínas incluyen cuantificación de IgG, IgA e IgM y si tomamos en cuenta que el costo de cada Ig es de N\$ 89.00, hubo un ahorro de N\$ 17.800.00.

V.- DISCUSION DE RESULTADOS

VI.1.- CORRELACION GLOBAL DE LOS DIAGNOSTICOS FINALES DE LOS PACIENTES Y LOS PATRONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

De las 553 electroforesis de proteínas efectuadas en 1992, 344 fueron repeticiones: para pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple 271, Plasmocitomas 14, lo que indica que los estudios electroforéticos sirven para monitorear al paciente en su tratamiento, especialmente para aquellos con mieloma múltiple, macroglobulinemias, enfermedad de cadenas pesadas u otros procesos linfoproliferativos. No así, para las 59 EF realizadas para pacientes con otras neoplasias o en pacientes sin cáncer, en donde se ve que un alto porcentaje presenta reacción inflamatoria, es decir, la búsqueda del componente monoclonal en estas últimas no es de utilidad diagnóstica. Para controlar este problema se hace necesario que el clínico establezca una colaboración estrecha con el químico a fin de que se le presente un resumen clínico del paciente y de esta forma poder establecer estrategias a seguir. En general el 49% de las EF fueron de pacientes con mieloma múltiple, del 51% restante, 36.2% correspondieron a linfomas, 2.5% Plasmocitomas y 12.3% a otras neoplasias o que no tenían cáncer.

En cuanto al diagnóstico de los pacientes a los que se realizó EF por primera vez, 60/209 pacientes tuvieron EF con diagnóstico normal y 149/209 fueron anormales, de éstos últimos 40 correspondieron a Pico Monoclonal. Los 109 pacientes restantes

presentaron patrones variados incluyendo inflamación crónica e hiper-gamaglobulinemia policlonal como alteraciones más frecuentes.

Cabe señalar que es importante la interpretación, tanto visual (cualitativo) como densitométrica (semicuantitativo) del trazado electroforético porque junto con la semiología del paciente, el laboratorio puede informar al médico datos fisiopatológicos y no nada más valores numéricos.

V.2.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE MIELOMA MULTIPLE

Los pacientes con diagnóstico de Mieloma Múltiple presentaron pico monoclonal característico en 72% de los casos y lesiones líticas en el 90%. Como podemos ver es más frecuente encontrar lesiones líticas en pacientes con mieloma, sin embargo no es específico como marcador de la enfermedad ya que existen otras patologías neoplásicas que presentan esta característica. Los picos monoclonales son marcadores tumorales ya que cuando están presentes nos indican presencia de células plasmáticas anormales. Nosotros obtuvimos una sensibilidad de 71.4 % y especificidad de 96.6 % semejante a lo descrito en la literatura (9). Debemos recordar que no todos los mielomas tienen gamopatía y esto es secundario a que solamente buscamos IgG, IgM e IgA por ser las inmunoglobulinas más frecuentemente encontradas en esta patología. En nuestros casos 25% no tuvieron Ig detectada probablemente por no haber buscado escenas ligeras y/o otras Igs (D y E).

En lo relacionado a la inmunoglobulina anormal encontramos (tabla 4) porcentajes semejantes a lo descrito en la literatura (35). Con un predominio del 60% de IgG seguido de IgA.

En lo que respecta a los resultados de laboratorio: tenemos que el 32.6% presentaron anemia, la mayoría de autores encuentran muy frecuente este dato (1, 2), reportando especialmente anemia normocítica y normocrómica. Encontramos incremento de las globulinas en 32/49 casos es decir más del 50%, similar al encontrado en la literatura (21); este incremento es el responsable de la formación de rouleaux, debido al aumento de tensión superficial que ejercen estas proteínas sobre las células sanguíneas. En nuestra serie solo el 13.4% de los pacientes presentaron hipercalcemia. El aumento de calcio que presenta la mayoría de los pacientes, es debido a la destrucción ósea característica de esta enfermedad, la cual conduce a la movilización de este en el suero y dar lugar a calcificaciones metastásicas. Por otra parte el desarrollo de células mielomatosas en medula ósea produce tumores múltiples, las cuales aparecen como lesiones osteoporóticas múltiples; es por esto quizá que los pacientes son referidos de todos los servicios inclusive de Neurología ya que pueden predominar los síntomas neurológicos por invasión del tumor, el cual rompe y atraviesa la cortical ósea e invade los nervios espinales o la médula (1,2,16,35).

Existieron 14 pacientes en los que no se detectó Ig monoclonal, esto pudo ser debido a que la cuarta parte de los pacientes (21,35) presentan proteínas de cadenas ligeras kappa o

lambda y se filtran a través del glomérulo renal quedando pocas o ninguna en el suero. Con insuficiencia renal fueron 10 casos. este dato no concuerda con la literatura ya que algunos autores toman este parámetro como una forma de presentación (16, 35). La importancia diagnóstica de los diferentes resultados del laboratorio y de los datos clínicos se ha comprobado claramente en este estudio. es decir, gamopatía monoclonal es vital para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, al igual que lesiones líticas múltiples y aumento de células plasmáticas en médula ósea (52).

V.2.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE PLASMOCITOMA.

En estos pacientes, no se encontraron picos monoclonales característico en la región gamma, pero existió un caso con aumento de la región beta lo cual hizo pensar en una IgA anormal que migra a esta banda y efectivamente al hacer la inmunofijación correspondió a una IgA, lo cual corroboró nuestro diagnóstico. Es importante señalar que en este padecimiento es más característico el resultado de patología, en donde se encuentran células plasmáticas neoplásicas formando un tumor, esta masa puede localizarse en hueso por lo que el estudio radiológico es vital. En nuestros pacientes 3 presentaron una sola lesión lítica. En estos casos no se trató de MM ya que solo se encontró una masa sin metástasis y sin plasmocitosis en médula ósea.

Algunos autores sostienen que el plasmocitoma es un estado temprano del mieloma múltiple (53), mientras que otros (54,55) piensan que cuando hay presencia de pico monoclonal indica enfermedad

difusa. Nuestros cinco pacientes presentaron una sola lesión y solo uno presentó secreción de Ig anormal.

V.4.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LINFOMA

De los 20 pacientes con enfermedad de Hodgkin, el 75% tuvieron hipergamaglobulinemia policlonal e hipoalbuminemia, patrón característico de inflamación crónica. 5 pacientes presentaron diagnóstico electroforético normal, en estos pacientes no se encontró pico monoclonal. La enfermedad de Hodgkin se caracteriza por la célula de Reed Stenberg, que es la célula neoplásica pero cuyo origen se desconoce. Al parecer y con estudios de inmunohistoquímica es una célula histiocítica o una célula de Langhans (57). Siempre se encuentra acompañada la célula neoplásica de reacción inflamatoria crónica intensa e incluso granulomatosa, por lo que no es extraño encontrar el porcentaje tan alto de patrón de inflamación crónica en estos enfermos.

En cuanto a los pacientes con linfoma no Hodgkin encontramos 4 casos con picos monoclonales que correspondieron a IgA, resultado que no concuerda con lo reportado en la literatura (27). Estiven Douglas y Daniel Bergsagel (27), sostienen que la mayoría de picos monoclonales en linfomas no Hodgkin son IgM de tipo kappa en aproximadamente el 50% de los casos, seguidos de IgG y raramente IgA. En nuestra serie el sitio del diagnóstico del linfoma fue en ganglios linfáticos en tres de ellos y uno en tejido periorcular. Ninguno de los casos tuvieron manifestaciones gastrointestinales o

respiratorias ni sus estudios endoscópicos presentaron neoplasias en estos dos sitios. El estudio histopatológico mostró : tres casos con LNH difuso de células pequeñas de núcleo hendido y uno con LNH de células multilobuladas grandes.

Es interesante ver que en México encontramos tantos pacientes con linfomas secretores de IgA. Parece como si las infecciones intestinales y respiratorias tan frecuentes en este País dieran lugar a clones de células linfoides programadas para producir IgA. Estas células migran eventualmente a ganglios linfáticos donde por mutaciones pueden transformarse y dar lugar a linfomas secretores de IgA. En cuanto al caso de linfoma en el tejido periculer se puede postular (56,57), que infecciones repetidas de la conjuntiva (mucosa y por tanto con células secretoras de IgA), alguna célula linfoides se transformó y dió lugar a un linfoma secretor de IgA. De la tabla 7 los tres pacientes que presentan incremento en alfa-2 fueron acompañados con hipergammaglobulinemia con un diagnóstico electroforético sugestivo de inflamación crónica. Cabe recalcar que a ninguno de estos se le efectuó inmunofijación ya que el patron no lo ameritaba.

VI.5.- PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE LEUCEMIAS.

Ninguno de los pacientes con leucemias, presentó pico monoclonal, uno presentó incremento en beta con hipergammaglobulinemia sugestivo de inflamación crónica. El perfil

protóico de estos pacientes entraron en los valores de referencia. Los aspectos clínicos y de laboratorio fueron compatibles con el diagnóstico de leucemia encontrándose leucocitosis en el 36% de los casos. Nosotros no esperabamos encontrar picos monoclonales en este grupo de pacientes ya que solo en los tres casos con diagnóstico de leucemia linfocítica crónica hubiera sido posible encontrar una célula linfocida B madura capaz de producir Ig (21, 56,57).

El diagnóstico de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) de células pro-B se basa en la demostración de IgM en el interior del citoplasma de los blastos sin encontrar secreción externa, en tanto que la LLA de células B. los linfoblastos presentan una Ig de superficie (11,35).

V.6.- PACIENTES CON OTRAS NEOPLASIAS Y SIN ENFERMEDAD NEOPLASICA

Con respecto a los pacientes que no tuvieron cáncer, ninguno presentó electroforesis alterada. Nosotros creemos que los médicos tratantes venen esta prueba como apoyo para confirmar un diagnóstico; pero el alto número de pacientes sin enfermedades linfoproliferativa (39 casos) y 73 EP repetidas de estos, nos hace pensar que se está abusando de esta prueba, porque según nuestros datos ninguno presentó Ig monoclonal. Creemos que en estos casos solo se debe de realizar la prueba como ayuda diagnóstica una vez y no repetir el estudio.

V.7.- ESTUDIO COSTO-BENEFICIO DE LAS PRUEBAS DE
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS Y DE INMUNOGLOBULINAS.

Nosotros encontramos que hubo un abuso en la realización de estas pruebas, ya que demostramos que hubo altos costos injustificados: M\$ 4,953 para EP innecesarias. Por lo que proponemos que el laboratorio decida si es conveniente realizar en todos los pacientes este estudio, en especial el no repetírselo a pacientes que lo hayan presentado dentro de límites normales la primera vez.

Si nosotros seguimos el esquema de trabajo detallado en el capítulo III, se puede restringir la realización de la cuantificación de Ig a solo a aquellos pacientes con diagnóstico certero de MM. P. Linfomas y leucemias, es decir, en procesos linfoproliferativos que es donde se puede secretar alguna Ig anormal, y solo realizar la cuantificación de la Ig alterada. Con esto nosotros ahorramos M\$ 17,800, cantidad considerable que puede ser utilizada para otros fines.

VI.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir:

- 1.- Este estudio demuestra la importancia que tienen los patrones electroforéticos en el diagnóstico de enfermedades linfoproliferativas, especialmente en pacientes que tiene Mieloma Múltiple y Linfoma No Hodgkin para la detección de pico monoclonal.
- 2.- El diagnóstico de Mieloma Múltiple es multidisciplinario y requiere de la combinación de los siguientes parámetros: 1) presencia de pico monoclonal en el trazado electroforético, 2) demostración radiológica de lesiones óseas, 3) aumento de la cuota plasmocelular medular (la mayoría de los autores considera como valor diagnóstico tener más de 20% de células plasmáticas, sin embargo arriba de 3% es anormal). En nuestra población el 72% de los pacientes presenta pico monoclonal característico y el 90% lesiones líticas, esto nos indica que aunque es más específico para el diagnóstico la EP, es más sensible encontrar lesiones líticas.
- 3.- La mayoría de electroforesis 320/553 fueron para Diagnóstico y o seguimiento de pacientes con MM, lo que demuestra que sirve como marcador tumoral de esta enfermedad.
- 4.- Nuestros datos muestran que existe abuso del estudio de electroforesis de proteínas y que se puede reducir el costo si

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

solamente se realiza para pacientes con diagnóstico seleccionado (M1, P. Linfomas y Leucemias), no es costeable esta prueba en pacientes con neoplasias no hematológicas o pacientes que no tengan cáncer. Por otra parte es importante la interpretación visual del patrón ya que se pueden seguir esquemas de trabajo que permiten hacer cuantificación de inmunoglobulinas a solo los pacientes que lo requieren, disminuyendo aun más el costo.

5.- En nuestro estudio se presentó pico monoclonal en el 6% de los pacientes con linfomas, semejante a lo descrito en la literatura. Pensamos que se puede utilizar la presencia de Ig anormal en el monitoreo de estos pacientes.

6.- Un aspecto interesante que se presentó en este estudio es que todos los pacientes con gamopatía monoclonal en linfomas presentaron banda IgA. En la mayoría de los casos reportados existe asociación entre IgA y neoplasias linfoides gastrointestinales o respiratorias. Sin embargo, en nuestros casos no existió evidencia de este origen. Nosotros postulamos que en países donde las infecciones respiratorias y gastrointestinales están presentes, células linfoides que producen IgA migran a otros órganos linfoides en donde hay alguna mutación y eventualmente se transforman en linfomas malignos secretores de IgA.

7.- En los casos con linfoma de Hodgkin encontramos un alto porcentaje de hiper-gammaglobulinemia policlonal (75%) todos estos con

un patrón sugestivo de inflamación crónica. La frecuencia de este patrón en Enfermedad de Hodgkin se encuentra ligeramente elevada. Nosotros pensamos que esto demuestra la naturaleza de la neoplasia, en la que la presencia de célula maligna de Reed-Sternberg causa reacción inflamatoria extensiva.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Axelsson, U., Bachmann, R.: Frequency of pathology protein (M-components) in 6.955 sera from an adult population: Acta Med. Scand. Vol 179, Fascs 2, 235. 1966.
- 2.- Hällén, J.: Frequency of "abnormal" serum globulins (M-Components) in the aged: Acta Med. Scand. Vol 173, Fasc 6, 1963.
- 3.- Brian, R. Smith, MD: circulating monoclonal B lymphocytes in Non-Hodgkin's Lymphoma: The New England Journal of Medicine 1984; 311:1476-1481.
- 4.- Laurell, C.B: Composition and variation of the gel electrophoretic fractions of plasma, cerebrospinal fluid and urine. J. Clin. Lab. Invest 29 (Supl):124:71, 1972.
- 5.- Solomon Alan, M.D.: Homogeneous (Monoclonal) immunoglobulin in Cancer: American J. Med. Vol 63, August 1977, pp 169-173.
- 6.- Enzo Pascalis, et al.: Immunofixation: Application to the identification of "difficult" monoclonal components: Clin. Chim. Vol 28, No. 6, 1982.
- 7.- David, F. Karen, Md.: High resolution electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies and other serum protein disorder. Beckman Laboratories, 1950.
- 8.- Lawrence M. Killingsworth, PhD: High resolution protein electrophoresis: A clinical overview with case studies department of Laboratory Medicine, Sacred Heart Medical Center, Spokane, Washington, Helena Laboratories, 1991.

- 9.- Robert A. Kyle, MD: Diagnostic criteria of multiple myeloma: Hematology/Oncology Clinics of North America, Vol 6 No.2, April 1992.
- 10.- Killingsworth, L.M. PhD. and Barbara N. Warren. Immunofixation, and Educational Service from, Helena H. Laboratories, 1990.
- 11.- Killingsworth, L.M. et al. Diagnostic Medicine, 3-15, Jan/Feb, 1980.
- 12.- Fitchie, R.F. and Smith, R. Immunofixation III. Application to the Study of Monoclonal Proteins. Clin Chem, 22:1982-1985, 1976.
- 13.- Laurell, C. B: Electrophoresis especifica de proteins assay or both in measurement of plasma proteins. Clin Chem 1973: 19:99-102.
- 14.- Mohar Alejandro: Referencias Hospitalarias Pùblicas: Departamento de Investigaciòn Clinica: Instituto Nacional de Cancerologia, México 1992.
- 15.- Lopez Armando, Mora Teresa,: Departamento de Archivo Clinico y Bioestadística del Instituto Nacional de Cancerologia, 1992.
- 16.- Maxwell M. Wintrobe, col.: Hematologia Clinica, Tomo I y Tomo II, 4ta. Ediciòn, Ed. Interamermedica, Buenos Aires, Argentina, 1989.
- 17.- Regis Bataille, et al.: Prognostic Factor and Staging in Multiple Myeloma: A Reappraisal: Journal of Clinical Oncology, Vol 4, Nro.1, January, 1986: pp 60-67.
- 18.- Stryer Lubert (Universidad de Stanford): Bioquímica, 3ra. Ediciòn, Tomo I y Tomo II, Editorial Revertè, S.A.1990.

- 19.- Kaplan L.A., Pesce A.: Técnicas de Laboratorio- Fisiopatología- Metodos de Análisis- Teoría, Análisis y Correlación. Editorial Panamericana. 1ra. Edición, 1991.
- 20.- Murray Robert K. et al.: Bioquímica de Harper. Editorial Manual Moderno S.A., Undécima Edición, 1990.
- 21.- Henry J.B., Todd Sanford-Davidsonhn: Diagnóstico y tratamiento clínico por el Laboratorio, Tomo I y Tomo II, Sava. Edición, Editorial Salvat. 1992.
- 22.- Aguzzi Francesco, Meriini Gianpaolo: Aspectos Clínicos del Análisis de las Proteínas Plasmáticas. Manual de los Laboratorios Beckman. Italia. 1989.
- 23.- Jolliff Carl. et al.: Separation Technology: Serum Proteins Electrophoresis Patterns: Sistema Paragon de Beckman. 1990.
- 24.- Jeppsson J.D., Lauril, C.B., et al.: Agarose Gel Electrophoresis. Clin. Chem. 25:629-638. 1979.
- 25.- Wieme, R.J.: Agar Gel Electrophoresis. New York, 1965: Elsevier North- Holland, Inc.
- 26.- Cheryl M., Reichert, et al.: High Resolution zone Electrophoresis. Combined with immunofixation, in the Detection of an Occult Myeloma Paraproteins: Clinical Chemistry, Vol 28. No.11, 1982.
- 27.- Roith Ivan, Brostoff Jonathan, Male David.: Immunology, 2da. Edición, Barcelona, Salvat Editores. 1992.
- 28.- Voller, A, Bidwell, D:E: and Bartlett, A: The Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA), Nuffield Laboratories of Comparative Medicine, The Zoological Society of London, Regent's Park, London. NW1. 1992.

- 25.- Lynch M.J. et al.: Métodos de Laboratorio, Tomo I y Tomo II
Segunda Edición, Editorial Interamericana, México, D.F., 1967.
- 30.- Wilson Jeand, D. col: Harrison Principios de Medicina Interna,
12a. Edición, Edotial Interamericana Mc Graw-Hill, México,
1971.
- 31.- Jean Louis Freud'Homme, Md, PhD. et al: Synthesis of abnormal
immunoglobulins in Lymphoplasmocytic disorders with visceral
Light Chain Deposition. The American Journal of Medicine. Vol.
69. November 1980, pp 703-709.
- 32.- Johnson. B:5: et al.: Sequential Changes of Plasma Protein
after myocardial infarction. J. Clin. Lab. Invest. 25:117,
1972.
- 33.- Anze. L. M. and Poliaci J:R.: Three-Dimensional Structure of
Immunoglobulins: Ann. Rev. Biochem. 1979. 48:561-97.
- 34.- Weiss. L.: Inmunología del Tumor y otros mecanismos de defensa
del Huésped. Ginecología Oncológica. 2da. Edición. Editorial
Interamericana. 1989, pp 405-436.
- 35.- Williams W. J. Beutler E., Erslevaj Lichtmanna, Hematology.
New York, USA Mc Graw-Hill. 1990.
- 36.- Hirschberg, H., Braathen, L. R. and Thorshy, E.: Immunology.
Rev. 66: 57,77. (1982).
- 37.- Zinser, J. W.: Manual de Inmunología Avanzada. Laboratorios
Lakeside 1990.
- 38.- Kyle, R. A.: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
(MGUS): A Review "Clinics in Haematology", 11, 123. 1982.
- 39.- Russell E. Randall, Mds.: Manifestations of Systemic Light
Chain Deposition: The American Journal of Medicine. Vol 60,
Februaryv. 293-299. 1976.

- 40.- Kawai T.: Clinical Aspects of the Plasma Proteins, et al. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 841. 1983.
- 41.- Michael Potter, MD: Perspective on the origins of Multiple Myeloma and Plasmacytomas in mice: Haematology/ Oncology Clinics of North America: Vol6. Nro.12. Abril. 1992.
- 42.- Durie. S.G.M.: Molecular and Cellular Genetics of Myeloma.: Epidemiology and Biology of Multiple Myeloma. London, U.K., State of the Art Symposia. 1991. pp 137.
- 43.- Dewald. GW. Kyle. RA; Hicks. GA.: The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. Blood 66: 380. 1985.
- 44.- Wynszarden. J.B. Smith LLH: Cecil Tratado de Medicina Interna- 14 ava. Edición, Tomo I. Editorial Interamericana. 1985.
- 45.- Borbaun Joel, MD.: Mechanisms Disease: Monoclonal Immunoglobulin deposition. Hematology/ Oncology Clinics of North America. Volumen 6. No.2, April. 1992.
- 46.- Berenson James R. et al.: Expression of Shared Idiotypes by Paraprotein from patient with Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of undetermined significance. Blood, Vol 75, Nro. 11. June 1990. pp 2107-2111.
- 47.- William A. Blattner, MD, et al.: Multiple Myeloma in the United States. Cancer. 48: 2547-25-54. 1981.
- 48.- Berenson James, et al.: Evidence for Peripheral Blood B Lymphocyte but not T Lymphocyte Involvement in Multiple Myeloma. Blood, Vol 70, No. 5 (November). 1987. pp 1550-1556.
- 49.- National Cancer Institute Sponsered study of Clasifications of Non-Hodgkin's Lymphomas. Summary and Description of a Working Formulation for clinical usage. Cancer 49. 2112-2135. 1982.

- 50.- Rosal J. Ackerman's Surgical Pathology St. Louis, Missouri, USA. The C.V. Mosby Company. 1989.
- 51.- Guarnier Jeannette, MD. et al.: Biclona! Gammopathy (IgGk and IgG lambda) in a Patient with Non-Hodgkin's Lymphoma. Arch. Pathol. Lab. Med. Vol. 110. Mayo. 1986. pp 445-448.
- 52.- Jeffrey P. Jaffe MD. et al.: Calcium Binding by a Myeloma Protein: The American Journal of Medicine. Volumen 67, Agosto. pp 343-346. 1979.
- 53.- Woodruff K. R. et al.: Solitary Plasmocitoma of Bone : Cancer. 43 pp 2344-2347. 1979.
- 34.- James Courwin, MD. et al: Solitary Plasmocitoma of bone vs extramedulary plasmocithoma and their relationship to multiple mveloma. Cancer 47: 1007-1013. 1979.
- 55.- Knowing N. A: et al.: Comparison of extramedullary plasmocitomas with solitary and multiple plasma cell tumore of Bone: Journal of Clinical Oncology. Vol 1, No. 4 (April). 1983.
- 56.- Devita V.T. Helliman, S. Rosenberg S.A., Cancer, Principles and Practice of Oncology . Philadelphia U.S.A.
- 57.- Rosal J. Ackerman's Surgical Pathology. St. Louis, Missouri U.S.A. The C. V. Mosby Company. 1989.
- 58.- Pruzanski y Dryzlo: Adv. Clin Chem, 13:335. 1970
- 59.- Terrez Speziale A.: Patologia Clínica: Ciencia y Tecnología, Procesos analíticos. 1era. Edición, Merck de México. 1973.