

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO
E INVESTIGACIÓN EN SALUD
“SELADIS”



**DESARROLLO DE UN MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO
PARA APOYO AL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE
PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN DIAGNÓSTICO DE
LABORATORIO EN SALUD – MENCIÓN INMUNOLOGÍA

ELABORADO POR:

Lic. KARINA ZOILA CLARIVEL DELGADO FLORES

ASESORES:

MSc., PhD. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS

Dr. ABEL BERRIOS

LA PAZ – BOLIVIA
2010

Con todo amor, este trabajo va dedicado a mi amado papito Rubén que fue quien me guío, impulsó, apoyó todo el tiempo para terminar mi tesis.

A mí amado esposo Daniel y a mis dos hermosas hijas Nicole y Daniela por brindarme su apoyo y comprensión cada día de mi vida.

Agradezco a Dios por darme la vida, el valor suficiente para lograr este anhelo, e iluminarme el camino para ser útil a la sociedad.

Agradezco particularmente a la Dra. Jacqueline Calla, asesora de este trabajo por sus sabias enseñanzas, conocimientos, dedicación y el tiempo que invirtió conmigo.

Agradezco al Dr. Abel Berrios, asesor de este trabajo que me colaboró desinteresadamente en conseguir a los pacientes con Mieloma Múltiple y sobre todo por sus valiosos consejos y todo su apoyo.

Agradezco a SELADIS por brindarme todo el apoyo científico – tecnológico.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. DISEÑO TEORICO	7
2.1 MARCO REFERENCIAL	7
2.1.1 NOCIONES BÁSICAS	7
2.1.2 CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES	8
2.1.3 GENÉTICA Y REPERTORIO DE INMUNOGLOBULINAS	11
2.1.4 ESTRUCTURA BÁSICA DE UN ANTICUERPO	12
2.1.5 UNIDAD BÁSICA DE CUATRO CADENAS	16
2.1.6 HETEROGENEIDAD DE LAS INMUNOGLOBULINAS	17
2.1.6.1 TIPOS DE CADENAS LIGERAS	18
2.1.6.2 CLASES DE CADENA PESADA	18
2.1.7 MIELOMA MÚLTIPLE	19
2.1.7.1 GENERALIDADES	19
2.1.7.2 DEFINICIÓN CLÍNICA DE MIELOMA MÚLTIPLE	21
2.1.7.3 HISTORIA	21
2.1.8 EPIDEMIOLOGÍA, INCIDENCIA, EDAD Y SEXO	24
2.1.9 CARACTERÍSTICAS GENERALES	26
2.1.10 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	27
2.1.10.1 COMPROMISO ESQUELÉTICO	28
2.1.10.2 COMPROMISO RENAL	29
2.1.10.3 COMPROMISO NEUROLÓGICO	30
2.1.10.4 INFECCIONES	30
2.1.11 PATOLOGÍA, FISIOPATOLOGÍA Y DATOS CLÍNICO – LABORATORIALES	31

2.1.11.1	ETIOPATOGENIA INMUNOLÓGICA	31
2.1.11.2	SÍNTOMAS Y SIGNOS	32
2.1.11.3	DATOS DE LABORATORIO	33
2.1.12	FORMAS CLÍNICAS ESPECIALES	38
2.1.12.1	MIELOMA QUIESCENTE (SMOLDE – RING MYELOMA)	38
2.1.12.2	LEUCEMIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS	38
2.1.12.3	MIELOMA NO SECRETOR	38
2.1.12.4	MIELOMA OSTEOSCLERÓTICO	39
2.1.12.5	MIELOMA EN PACIENTES JÓVENES	39
2.1.12.6	PLASMOCITOMAS LOCALIZADOS	40
2.1.13	DIAGNÓSTICO	40
2.1.14	PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN	43
2.1.15	TRATAMIENTO	44
2.1.15.1	RADIOTERAPIA	45
2.1.15.2	TRATAMIENTO CITOSTÁTICO	45
2.1.15.3	MEDIDAS COMPLEMENTARIAS	47
2.2	MARCO CONCEPTUAL	47
2.2.1	Mieloma Múltiple	47
2.2.2	Mieloma indolente	48
2.2.3	Célula plasmática	48
2.2.4	Plasmocitoma	49
2.2.5	Cadenas ligeras y pesadas	49
2.2.6	Monoclonal	49
2.2.7	Proteína M	50
2.2.8	Ig G – Ig A	50
2.2.9	Ig D – Ig E	50
2.2.10	Bence Jones	50
2.2.11	Hipercalcemia	51
2.2.12	Electroforesis	51
2.2.13	Inmunofijación	51
2.2.14	Alogeneico	52

2.2.15	Autólogo	52
2.2.16	Interferón	52
2.2.17	Terapia de inducción	52
2.2.18	Enfermedad estable	52
2.2.19	Nefelometría	53
III.	ANTECEDENTES	54
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	59
	PREGUNTA PROBLEMICA	59
V.	JUSTIFICACIÓN	61
VI.	OBJETIVOS	62
6.1	OBJETIVO GENERAL	62
6.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	62
VII.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	63
7.1	POBLACIÓN	63
7.2	LUGAR	63
	PERSONAS APARENTEMENTE SANAS	63
	PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE	64
7.3	MATERIAL Y METODOS	64
7.3.1	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y CONSERVACIÓN	66
7.3.2	REDUCCIÓN DE PUENTES DISULFURO	67
7.3.2.1	Diálisis de las muestras de suero	67
7.3.2.2	Determinación de la concentración aproximada de Ditiotritol	68
7.3.2.3	Utilización de Iodoacetamida y Trietanolamida	68
7.3.2.4	Determinación de la cinética de reacción	69
7.3.2.5	Inmunolectroforesis	70
7.3.2.6	Tinción de las placas de inmunolectroforesis	70
7.3.3	Método ensayo inmunoenzimático sándwich	71
	Fundamento	71
	Técnica	72

	Criterios de Interpretación	74
7.3.4	Técnica de inmunodifusión radial (IDR)	74
	Fundamento	74
	Técnica	75
	Criterios de Interpretación	75
7.3.5	Determinación de proteínas	75
7.3.6	Determinación de proteinuria	76
	Criterios de Interpretación	76
7.3.7	Determinación de proteínas de Bence Jones	77
VIII.	RESULTADOS	78
8.1	REDUCCIÓN DE PUENTES DISULFURO	78
8.1.1	Evaluación de los parámetros establecidos para la reducción de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas	78
8.1.2	Análisis de los resultados de la reducción de puentes disulfuro por el método de inmunoelectroforesis (I.E.F.)	78
8.2	MÉTODO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO SÁNDWICH	84
8.3	TÉCNICA DE INMUNODIFUSION RADIAL (IDR)	86
8.4	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	90
8.5	DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA	91
8.6	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE BENICE JONES	92
IX.	DISCUSIÓN	93
X.	CONCLUSIONES	106
XI.	RECOMENDACIÓN	107
XII.	BIBLIOGRAFÍA	108
	ANEXOS	

RESUMEN

El **Mieloma Múltiple** es una neoplasia de las células plasmáticas que se origina en la médula ósea y que se caracteriza por la afectación de múltiples lugares del esqueleto, el rango de edad de mayor incidencia es de 50 y 60 años, sin embargo; también se presenta en otras edades. El pronóstico de este trastorno depende del estadio en el momento del diagnóstico. Los pacientes con múltiples lesiones óseas, si no se tratan, rara vez sobreviven más de 6 a 12 meses. Actualmente el tratamiento básico que se utiliza para dicha enfermedad, es la quimioterapia.

El **Mieloma Múltiple** en nuestro medio, es una enfermedad que tiene una frecuencia relativamente considerable, sin embargo; no se conocen estudios médicos, ni clínicos en cuanto: a su evolución, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Es por ello que surge el interés de realizar un trabajo de investigación, que de alguna manera contribuya a su diagnóstico y seguimiento; por ello, el trabajo se basó en la estandarización de una nueva prueba de laboratorio que pueda apoyar en ese sentido.

Una vez estandarizado el método ensayo enzimático tipo sándwich, los resultados obtenidos determinaron valores normales de los pacientes aparentemente sanos; mientras que en uno de los pacientes con **Mieloma Múltiple** se observó un resultado por encima de lo normal. Con relación a las muestras de orina de 24 horas, los resultados obtenidos dieron valores dentro de los rangos normales para ambos grupos en estudio.

Con la finalidad de validar nuestro método estandarizado, se compararon dichos resultados con la técnica de inmunodifusión radial (IDR) por kits comerciales, los resultados obtenidos; fueron realmente importantes y significativos, debido a que el grupo de control negativo, dio valores dentro de los rangos normales; mientras que los resultados de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, se detectaron dos casos que presentaban valores superiores al rango normal en el caso de la determinación de cadenas kappa.

Existen diferencias marcadas entre ambas técnicas evaluadas, uno fue el método estandarizado ensayo enzimático tipo sándwich y la otra fue la técnica de inmunodifusión radial comercial. Es importante remarcar que para estandarizar un nuevo método de diagnóstico, es de suma importancia hacer un estudio mucho más minucioso y que requiere de otras pruebas adicionales hasta lograr la optimización del mismo.

Con el presente trabajo, se logró de forma preliminar estandarizar el método ensayo enzimático sándwich para la dosificación de cadenas livianas kappa y lambda; el mismo que requiere la continuidad con futuros trabajos de investigación hasta conseguir el objetivo marcado; que es el de perfeccionar un método de diagnóstico para los casos de **Mieloma Múltiple**.

ABSTRACT

The **Multiple Mieloma** is a type of cancer of the bone marrow, it takes place at the plasmatic cell level and it is characterized for multiple affections in the skeleton; the range of age of more incidence is from 50 to 60 years, however it can be presented also in other ages. The presage of this dysfunction depends on the stadium in the moment of the diagnosis. If the patients with multiple bone lesions are not treated properly, rarely survive more than 6 to 12 months. At the moment the basic treatment used for this illness is the chemotherapy.

In our country, the **Multiple Mieloma** is an illness that has a significant frequency; however no medical or clinical studies are known about the evolution, diagnostic, presage and treatment of this illness. For that reason, the interest of carrying out an investigation work arises in order to contribute somehow in its diagnosis. The work was directed to the standardization of a new laboratory test that allows in some way to support the diagnosis.

Once the rehearsal method of enzymatic sandwich has been standardized, the obtained results determined normal values in the healthy patients; while in one of the patients with Multiple Mieloma was observed that the obtained result was above the normal values. In relationship to the samples of 24 hours urine test, the obtained results gave values inside the normal ranges for both groups in study.

In order to validate our standardized method, this results were compared with the technique of radial inmunodifusión (IDR) of commercial kits. The obtained results were really important and significant, because the group of negative control, gave values inside the normal ranges. For the patients with **Multiple Mieloma**, two cases of higher values in the determination of kappa chains were detected.

Marked differences exist between both evaluated techniques, the preliminary standardized method and the commercial radial inmunodifusion technique. It is important to remark that for the standardization of a new method of diagnose, is of supreme importance to

make a much more meticulous study and it requires too of other additional tests until achieving the optimization of this method.

With the present work, it was possible to preliminary standardize the rehearsal method of enzymatic sandwich. This method requires of further future investigation until it can reach the marked objective; that means to improve a diagnosis method for the cases of **Multiple Mieloma**.

I. INTRODUCCION

El **Mieloma Múltiple** es una neoplasia de las células plasmáticas que se origina en la médula ósea y que se caracteriza por la afectación de múltiples lugares del esqueleto. Puede diseminarse también a muchos tejidos extraóseos. Las células plasmáticas neoplásicas sintetizan inmunoglobulinas completas, incompletas o de ambas formas. Es la gammapatía más común. (17)

El rango de edad de mayor incidencia del **Mieloma Múltiple** es de 50 y 60 años. Afecta a ambos sexos. El pronóstico de este trastorno depende del estadio en el momento del diagnóstico. Los pacientes con múltiples lesiones óseas, si no se tratan, rara vez sobreviven más de 6 a 12 meses. La quimioterapia en forma de agentes alquilantes induce remisión en el 50 a 70% de los pacientes, pero la supervivencia media sigue siendo de 3 años. Los trasplantes autólogo y alogénico de médula ósea, más una quimioterapia intensiva ofrecen una esperanza de curación. (17)

Se estima que se producen más de 4 millones de muertes anuales por cáncer en el mundo, constituyendo la causa de una de cada 10 muertes anuales producidas y la tercera causa de muerte mundial. La incidencia global del cáncer es extremadamente variable entre distintas regiones del mundo. (26)

En nuestro medio, se llevó a cabo un trabajo estadístico importante, el cual proporcionó información relevante acerca de las patologías hematológicas más frecuentes en nuestra población. Así, el **Mieloma Múltiple** junto con otras entidades oncohematológicas se encuentran en un segundo lugar en frecuencia; en general suma un 25%. El estudio realizado en el Hospital Obrero por medio de la recolección de la información de los registros de internación de los Servicios de Medicina Interna y Pediatría, durante el periodo 1988 a 1998; con relación a la frecuencia de enfermedades hematológicas, señala que de 821 pacientes; 32 casos estuvieron relacionados con **Mieloma Múltiple**, lo que significa un 3,8%. Ahora, con relación a la frecuencia de entidades hematológicas en la unidad de Medicina Interna, de 505 pacientes, se presentaron 32 casos con **Mieloma Múltiple**, lo que significa un 6,3%. (23)

Actualmente son objeto de estudio diferentes pruebas laboratoriales que podrían aportar al diagnóstico del **Mieloma Múltiple**, juntamente con los síntomas clínicos y las pruebas de rutina. Se consideran como pruebas de rutina: determinación de proteínas, crioglobulinas, electroforesis de proteínas, proteinuria de Bence Jones, proteína C reactiva, mediciones importantes de inmunoglobulinas, inmunofijación de inmunoglobulina, creatinina, calcio y cuantificación de cadenas livianas kappa y lambda. (21)

En el presente trabajo se pretende estandarizar una técnica de ensayo inmunoenzimático (EIA) que permita cuantificar las cadenas livianas kappa y lambda, técnica que permitirá junto con las demás aportar al diagnóstico y seguimiento terapéutico de los pacientes con **Mieloma Múltiple**.

II. DISEÑO TEORICO

2.1 MARCO REFERENCIAL

2.1.1 NOCIONES BÁSICAS

En el ámbito de la respuesta inmune específica de los organismos vertebrados, las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (Ac) juegan un papel central. Estas moléculas tienen la habilidad de reconocer específicamente y mediar la eliminación de sustancias y organismos extraños, tales como toxinas, bacterias y virus. Ello se logra gracias a que, luego de ligar el antígeno (Ag), los Ac interactúan con receptores presentes en ciertas poblaciones celulares y con moléculas del sistema de complemento (Figura 1), conduciendo a la activación de mecanismos efectores, los cuales finalmente, son los responsables de la mencionada eliminación. (38, 58)

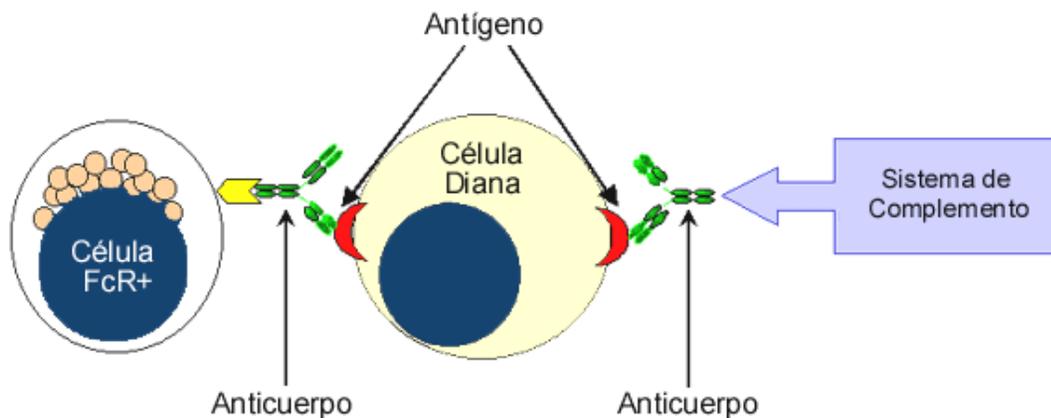


Figura 1
Mecanismos efectores de la molécula de anticuerpo

2.1.2 CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

Los Ac son glicoproteínas solubles, sintetizadas y secretadas de manera exclusiva por un tipo particular de glóbulo blanco denominado linfocito B. Moléculas de Ac han sido encontradas virtualmente, en todos los fluidos y cavidades corporales. En mamíferos se han descrito cinco clases de Ig a saber Ig M, G, A, D y E. Cada una de ellas posee, además de un metabolismo y fisiología característicos, rasgos estructurales y funcionales particulares. (58)

Sin embargo, todas comparten una estructura básica común que bien puede ser ejemplificada por la molécula IgG (Figura 4 y 4a). Básicamente, la molécula de Ac consta de dos tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas cadena liviana / ligera y cadena pesada, con pesos moleculares aparentes de unos 25 y 50 kD, respectivamente (Figura 2a y 2c) Se han identificado dos tipos de cadena liviana: kappa (***k***) y lambda (***l***), y cinco clases de cadena pesada: mu (***m***), gamma (***g***), alfa (***a***), delta (***d***) y épsilon (***e***). Cada monómero de Ig, independientemente de la clase, consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas igualmente idénticas. Las cadenas pesadas establecen abundantes interacciones no covalentes y cierto número de enlaces covalentes (del tipo puente disulfuro) entre sí y con las cadenas livianas. (58, 69)

Figura 2
La molécula de Ac y los genes que la codifican

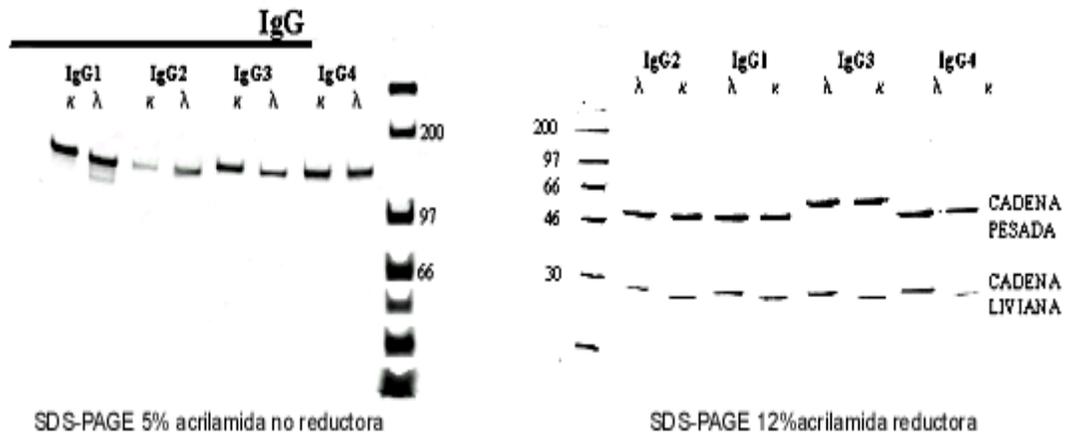
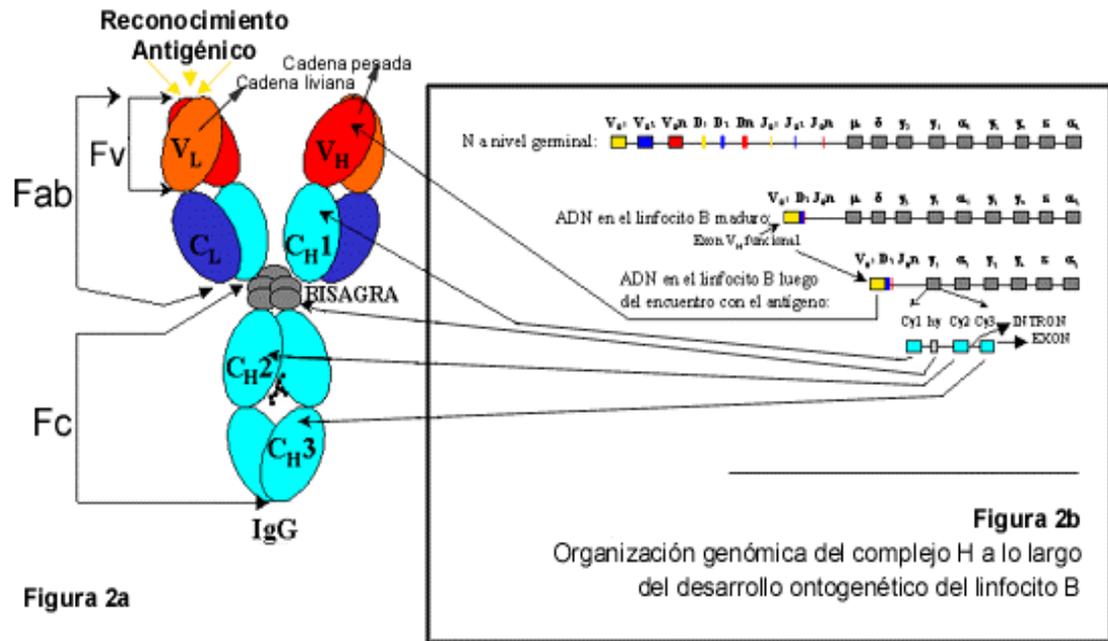


Figura 2c

La característica bioquímica estructural más resaltante de las cadenas Ig es el "dominio Ig" (82). Muy resumidamente, un dominio Ig es una secuencia polipeptídica de unos 100 - 110 aminoácidos que presenta, de manera muy conservada, dos residuos de cisteína localizados hacia los extremos opuestos de la secuencia. Estos residuos permiten la formación de un puente disulfuro intracatenario importante para la estabilización de la estructura terciaria del dominio y, consecuentemente, de la molécula. La distribución de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos en la secuencia primaria del dominio trae como resultado la formación de lo que, en bioquímica de proteínas, se conoce con el nombre de hojas plegadas tipo b. Estas hojas b se organizan en forma antiparalela, se unen mediante segmentos relativamente cortos de secuencia llamados asas o "loops", en los cuales es usual encontrar la conformación tipo hélice α y se arreglan a nivel tridimensional para formar un par de láminas (Figura 3). (38, 58)

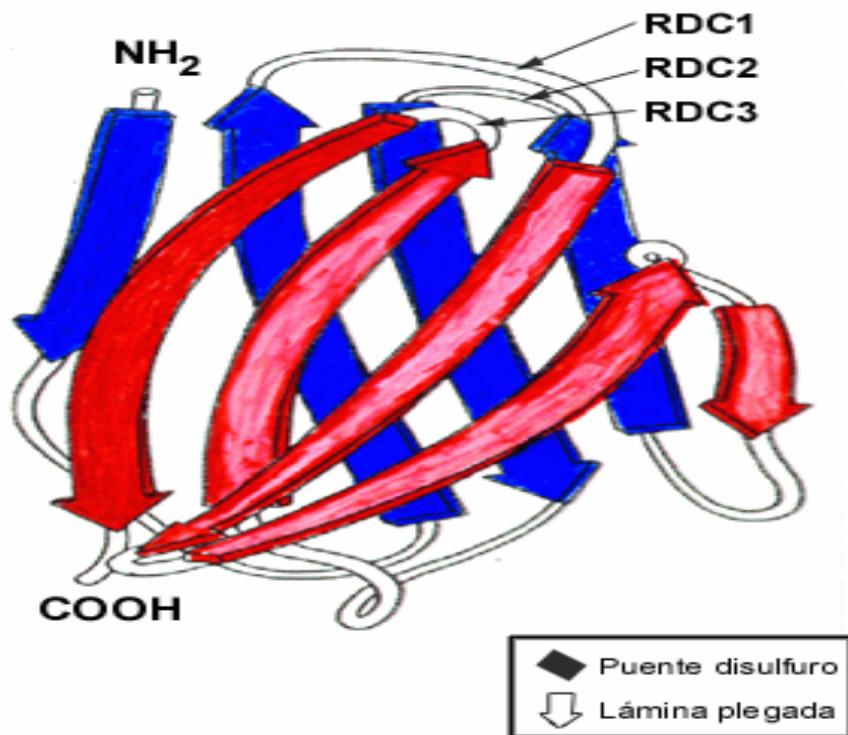


Figura 3
El dominio Ig

Estudios comparativos de la secuencia primaria de aminoácidos, en un número importante de moléculas de Ac, han permitido la identificación de dos tipos de dominio en las

cadena Ig: el dominio variable (V) y el dominio constante (C). Esta denominación obedece a la variabilidad encontrada en cada posición de la secuencia primaria. Tanto la cadena liviana como la pesada poseen un dominio variable designados V_L y V_H , respectivamente. La cadena liviana posee un único dominio constante (C_L), mientras la cadena pesada posee tres o cuatro dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}), dependiendo de la clase de Ig (Figura 2a). El dominio Ig tiene implicaciones importantes para la funcionalidad de la molécula de Ac. Por ejemplo, los dominios V_L y V_H se conjugan en un módulo funcional denominado Fv, en el cual se encuentra el sitio de reconocimiento del antígeno o paratopo (Figura 2a). Mediante la comparación de secuencias de aminoácidos disponibles para numerosos dominios V_L y V_H , ha sido posible identificar tres sitios en cada dominio V, denominados regiones hipervariables, en los que la variabilidad, en la secuencia primaria de aminoácidos, alcanza un máximo. Estas regiones contienen los residuos principales que conforman el paratopo y, por ello, también se les conoce con el nombre de regiones determinantes de complementariedad (RDC). Las RDC corresponden a las asas o "loops" de los dominios V (Figura 3) y se encuentran flanqueadas por regiones de menor variabilidad designadas marco (M). El dominio Ig ha sido explotado más allá del ámbito de los Ac, de manera que hoy se acepta la existencia de una superfamilia de proteínas que contienen en su estructura dominios Ig, entre estas proteínas se cuentan, además de los Ac, el receptor antigénico de linfocitos T, las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad, receptores para el fragmento Fc de las Ig, moléculas de adhesión intercelular, etc. (38, 58, 69)

2.1.3 GENÉTICA Y REPERTORIO DE INMUNOGLOBULINAS

Los genes que codifican las Ig están organizados en complejos genéticos. Existe un complejo genético en el que se encuentran los elementos codificantes de todas las cadenas pesadas (complejo H) y dos complejos para las cadenas livianas, uno para la cadena k (complejo k) y otro para la cadena l (complejo l). El complejo H se encuentra localizado en la región telomérica del cromosoma 14 humano y está formado por un número variable de elementos codificantes denominados V_H , D_H , J_H , h_H y C_H (Figura 2b). En forma similar, los complejos k y l contienen elementos V_L , J_L y C_L , pero no poseen segmentos D ni h y están ubicados en los cromosomas 2 y 22 humanos, respectivamente. Cada complejo posee un número significativo de elementos V y, en menor cuantía, elementos D (complejo H) y J. Los

elementos codificantes h y C constituyen éxones completos, los cuales contienen la información estructural para la síntesis de la región bisagra (cadena pesada) y de los diferentes dominios constantes, respectivamente. (Figura 2b) (38, 58, 69)

Por otro lado, los dominios V son producidos a partir de la combinación de los elementos V, D y J. Durante la ontogenia del linfocito B estos complejos génicos sufren un interesante proceso de reordenamiento, o rearreglo, cuyos detalles mecánicos no han sido del todo entendidos. Un sofisticado sistema de recombinación somática actúa sobre los elementos V, D y J, permitiendo en cada linfocito B el rearreglo funcional de un segmento V_L con un segmento J_L , para así generar un exón V_L , el cual codifica el dominio V_L de la cadena liviana. Algo similar ocurre con los segmentos V_H , D_H , y J_H del complejo H (Figura 2b). Luego de que, en un linfocito B particular, ocurre el rearreglo funcional de estos segmentos y se genera un exón V_L y uno V_H , el proceso se detiene de manera que cada linfocito B despliega una única especificidad y es capaz de secretar, luego de la estimulación antigénica, únicamente Ac con esa especificidad. En humanos, se ha estimado que el proceso de rearreglo génico de los segmentos V, D, y J, en el cual se ven, además, involucrados fenómenos de adición de nuevos nucleótidos e inversión y uso simultáneo de varios segmentos D, tiene la potencialidad de generar 10^4 dominios V_L y 10^8 dominios V_H diferentes, pudiendo combinarse aleatoriamente para generar hasta 10^{12} moléculas de anticuerpo con especificidades diferentes. Este gigantesco repertorio permite al sistema inmune humoral disponer de la capacidad para reconocer y responder prácticamente ante cualquier reto antigénico. (38, 58, 69)

2.1.4 ESTRUCTURA BASICA DE UN ANTICUERPO

Las inmunoglobulinas (Igs) son un grupo de glicoproteínas que se hallan presentes en el plasma y líquidos intersticiales, constituyen los anticuerpos (Acs) que el organismo elabora ante la entrada de un antígeno (Ag) y que tienen la capacidad de unirse específicamente al mismo. Son producidas y secretadas en gran cantidad por las células plasmáticas resultantes de la activación y diferenciación de los linfocitos B, pudiendo encontrarse en forma soluble o unida a la membrana de los linfocitos B, constituyendo el receptor de la célula B específica para el antígeno (BCR). (38, 69)

Las Igs en el hombre son de cinco clases diferentes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE; difieren en tamaño, carga eléctrica, composición de aminoácidos y azúcares. Todas las inmunoglobulinas reconocen algún antígeno en forma específica, pero se diferencian en cuanto a su localización tisular, reactividad con otras proteínas, etcétera. Básicamente, una molécula de anticuerpo está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H, de Heavy) idénticas entre sí y dos livianas (L, de Light) también idénticas entre sí. Tal como se aprecia en las figuras 4 y 4a, las cadenas pesadas se encuentran unidas por puentes disulfuro (-S-S-) y de la misma manera se unen, a cada una de ellas, cada una de las cadenas livianas. Estas figuras también ponen de manifiesto que la proteína tiene forma de Y. Cada brazo de la Y, designado fragmento Fab (de antigen binding Fragment), une el antígeno en forma independiente, o sea, que el anticuerpo es bivalente. El resto de la molécula, o fragmento Fc –porque cristaliza con facilidad– no participa en la unión con el antígeno sino que es reconocido por receptores celulares específicos, y contribuye a la efectividad del proceso mediante el cual ese antígeno es destruido. (38, 58, 69)

Ambas cadenas, tanto pesadas como livianas son idénticas, y al estar unidas por puentes disulfuro se dividen en dos regiones: una llamada «variable» (VL) y otra la región «constante» (CL). Los dominios variables están unidos a los constantes por regiones J (de Joining). Tanto en las cadenas pesadas como en las livianas, el carácter variable o constante de las zonas queda determinado por la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, cuando se comparó la secuencia de varias cadenas L de una misma especie –aproximadamente 220 aminoácidos–, se halló que la región carboxilo terminal (-COOH) era casi idéntica en todas ellas, mientras que la región amino terminal (-NH₂) era muy distinta. Por esto la estructura formada por los primeros 110 aminoácidos se denominó VL y la segunda mitad CL. Más adelante se halló que los cambios de aminoácidos en las regiones variables no estaban distribuidos de manera homogénea; algunas porciones de la cadena manifestaban ser más variables que las otras por lo que se las denominó regiones hipervariables. En las cadenas L esas zonas se localizan cerca de los aminoácidos, 30, 50 y 95. (38, 58, 69)

En la actualidad se acepta que las regiones hipervariables constituyen el sitio de unión del anticuerpo con el antígeno, por lo que se las denomina CDR (de Complementary Determining Regions). Tanto en la cadena L como en la H hay tres segmentos CDR

separados por estructuras rígidas que reciben el nombre de FR (de Framework Regions). (38, 58, 69)

Las cadenas livianas, menores o ligeras pueden ser de dos tipos: Kappa y Lambda, comunes a todas las Igs. En el humano el 65% de los Acs poseen Kappa y el 35% Lambda, las mismas pueden ser diferenciadas por antisueros específicos. En un dado anticuerpo las dos cadenas livianas son siempre de la misma clase. (38, 58, 69)

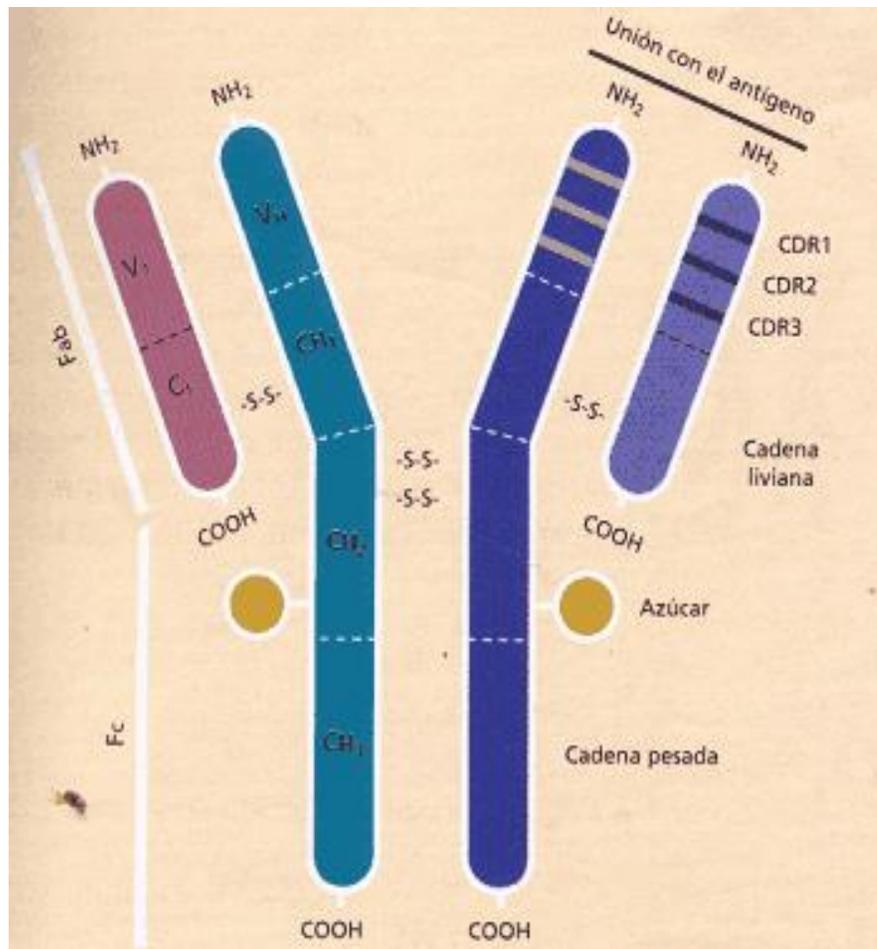
Las cadenas pesadas son esencialmente de cinco tipos diferentes, y son las que definen la clase o isotipo de los anticuerpos: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. El sitio de combinación del Ac con el Ag está determinado en forma conjunta por la estructura espacial de las regiones de las cadenas livianas y pesadas. Por lo tanto, una molécula de Ac, como la mostrada en la (Figura 4), posee dos sitios de unión, es decir, es bivalente. La digestión enzimática de los Acs por papaína genera dos fragmentos llamados Fab (cada uno con su sitio de combinación) y un fragmento llamado Fc, asimismo la digestión por la pepsina permite generar un fragmento llamado F (ab)₂ y el Fc. (38, 58, 69)

La variabilidad en las regiones V, no es uniforme, sino que existen sectores de hipervariabilidad, que determinan la complementariedad con la superficie tridimensional del Ag. Estos sitios se denominan idiotipo, que se comportan como verdaderos Acs, contra los cuales se pueden producir Acs anti-idiotípicos, (éste sería un mecanismo de regulación inmune normal). (38, 58)

La función primaria de los Acs es la de unirse al Ag, en algunos casos esta unión tiene consecuencias directas, como por ejemplo, neutralización de toxinas bacterianas o inhibición de la penetración del virus en las células. Sin embargo, la interacción del Ag con el Ac no siempre tiene expresión biológica, a menos que intervengan funciones «efectoras» secundarias. (38, 69)

La porción Fc de las Igs es la que define sus propiedades efectoras, como activación del sistema complemento, capacidad de actuar como opsoninas para fagocitos mononucleares y neutrófilos, transferencia placentaria, etc. (38, 58)

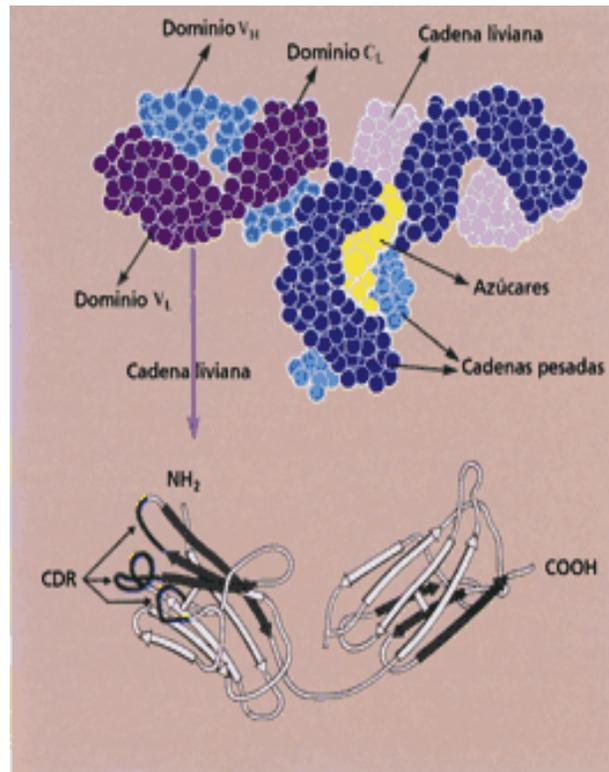
Figura 4



Esquema de la estructura de un anticuerpo (IgG)

Esquema de la estructura de un anticuerpo, en el que cada aminoácido ha sido reemplazado por una esfera (adaptado de Silvertown et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1977, USA, 74:5140).

Figura 4a



Esquema del plegamiento tridimensional de la cadena liviana. Las flechas representan el esqueleto rígido (estructuras en hoja plegada). Se señalan los péptidos que forman los “lazos” correspondientes a cada CDR (adaptado de Marchalonis y Shluter, 1989, FASEB J 3:2469).

2.1.5 UNIDAD BÁSICA DE CUATRO CADENAS

Las moléculas de inmunoglobulina se componen de números iguales de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras, que pueden ser presentadas por la fórmula general (H₂L₂)_n. Las cadenas se mantienen unidas por fuerzas no covalentes y, por lo general, por enlaces de disulfuro intercatenarios covalentes, para formar una estructura simétrica bilateral. Se ha

demostrado que todas las inmunoglobulinas normales tienen esta estructura básica, aunque algunas están compuestas de más de una unidad de cuatro cadenas. (61)

Cada cadena polipeptídica está hecha de cierto número de asas o dominios de un tamaño muy constante (100 a 110 aminoácidos), formadas por puentes disulfuro intracatenarios. El dominio N-terminal de cada cadena, muestra mucha más variación en la secuencia de aminoácidos que los otros, y se denomina la región variable para distinguirla de los otros dominios relativamente constantes (denominados colectivamente región constante en cada cadena). La zona donde se unen las regiones constante y variable, se denomina región de cambio. (61)

Las inmunoglobulinas son bastante sensibles a la digestión proteolítica, pero se parten con mayor facilidad alrededor de la cadena pesada en un área entre los dominios primero y segundo de la región constante (C_{H1} y C_{H2}). La papaína, parte la molécula en el lado N-terminal de los puentes de disulfuro intercatenarios, en tres fragmentos de tamaño similar; dos fragmentos Fab que incluyen toda la cadena ligera y los dominios V_H y C_{H1} de la cadena pesada y un fragmento Fc compuesto de las mitades C terminal de las cadenas ligeras. Si se utiliza pepsina, la ruptura ocurre en la porción C terminal de los puentes de disulfuro intercatenarios de cadena H, lo que da un gran fragmento $F(ab)_2$ compuesto de dos fragmentos Fab. La pepsina degrada el fragmento Fc. La región en la cadena H susceptible a ataque proteolítico, es más flexible y está más expuesta al medio que los dominios más compactos, globulares, y se conoce como la región de la "bisagra". La actividad de captación de antígeno se relaciona con los fragmentos Fab o de manera más específica, con los dominios V_H y V_L , mientras que la mayor parte de las actividades biológicas de las inmunoglobulinas (por ejemplo, fijación del complemento) se asocia con el fragmento Fc. (61)

2.1.6 HETEROGENEIDAD DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Según se vio, las inmunoglobulinas comprenden una familia de proteínas con la misma arquitectura molecular básica, pero con un amplio arreglo de especificidades de captación del antígeno, y diferentes actividades biológicas. Estas diferentes actividades son, desde luego, reflejos de diferencias estructurales dictadas por la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. Esta heterogeneidad estructural ha sido un obstáculo para los

químicos de proteínas, pero los plasmacitomas de origen humano y murino proveen inmunoglobulinas homogéneas (monoclonales), que han facilitado, en gran parte, el estudio de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. Más aún, en la actualidad es posible producir cantidades casi ilimitadas de anticuerpos monoclonales de especificidad prescrita contra un antígeno y mediante la fusión somática de las células de plasmacitoma con células normales productoras de anticuerpo, provenientes de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales producidos por tales células híbridas (o hibridomas) se utilizan en gran cantidad como agentes diagnósticos. (61)

2.1.6.1 TIPOS DE CADENAS LIGERAS

Todas las cadenas L tiene peso molecular de cerca de 23,000, pero pueden clasificarse en dos tipos, kappa (κ) y lambda (λ), con base en múltiples diferencias estructurales en las regiones constantes, que se reflejan en diferencias antigénicas. Los dos tipos de cadenas L se han demostrado en muchas especies de mamíferos. De hecho, la homología de las secuencias de aminoácidos entre cadenas κ de ratón y humano, son mayores que aquellas entre las cadenas κ y λ dentro de cada especie, lo que indica que los dos tipos se separaron durante la evolución antes de la divergencia de las especies de mamíferos. (61)

La proporción de cadenas κ y λ en las inmunoglobulinas, varía de especie a especie, y es alrededor de 2:1 en humanos. Una molécula determinada de inmunoglobulina, siempre contiene dos cadenas idénticas κ y λ , pero nunca una mezcla de ambas. (61)

2.1.6.2 CLASES DE CADENA PESADA

Se han encontrado cinco clases de cadenas H en los humanos, basadas de nuevo en diferencias estructurales en las regiones constantes detectadas mediante métodos serológicos y químicos. Las formas diferentes de cadenas H denominadas: γ , α , μ , δ y ϵ , varían en peso molecular desde 50,000 a 70,000, y las cadenas μ y ϵ poseen cinco dominios (uno V y cuatro C) en vez de los cuatro de las cadenas γ y α . La cadena δ tiene un peso molecular intermedio que se piensa se debe a un aumento en la región de la bisagra. De

esta manera, la cadena γ_3 , tiene una región extendida de la bisagra, que consiste de cerca de 60 aminoácidos lo que incluye 14 cisteínas, y esto determina el número de enlaces disulfuro intracatenarios de H en la Ig G3. (61)

La clase de la cadena H determina las cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Dos cadenas γ combinadas con dos cadenas L λ o dos κ , constituyen una molécula de IgG, la clase principal de inmunoglobulinas en suero. De manera similar, dos cadenas μ y dos cadenas L forman una subunidad IgM; las moléculas IgM son macroglobulinas que consisten de cinco de estas unidades básicas de cuatro cadenas. La IgA es polidispersa, y comprende de una a cinco de tales unidades. Las otras clases (IgD e IgE), lo mismo que la IgG, consisten de una sola unidad de cuatro cadenas. (61)

2.1.7 MIELOMA MÚLTIPLE

2.1.7.1 GENERALIDADES

El **Mieloma Múltiple** se encuentra dentro del grupo de las enfermedades plasmocelulares, es una neoplasia de las células plasmáticas, ocurre usualmente en la médula ósea, pero algunas veces en otros sitios del cuerpo; en un primer tiempo se identificó con varias de las células medulares, así es que se hablaba de mieloma mieloblástico, eritroblástico, etc. Hasta que por fin se identificó como célula característica al **plasmocite inmaduro**, maligno. Habitualmente el plasmocite es una célula normal en la médula ósea, que interviene en la defensa contra las enfermedades formando anticuerpos (célula plasmática. Linfocito B). (66)

El primer paciente descrito, de apellido McBean, era un alpinista y fue diagnosticado en **1845** por el Dr. Macintyre. Cada ascenso que hacía implicaba una costilla fracturada. En ese tiempo la anemia, que es muy común en el mieloma por el compromiso medular con las células malignas, se trataba dándole a comer al paciente una oblea con limadura de fierro, y los dolores musculares se trataban con "ÁRNICA" (supongo que McBean padecía también de anemia y dolores musculares). Bueno, este enfermo terminó con una enfermedad que se llamó *Mollites Osseun*, que significa "hueso carcomido", pues esto es algo que ocurre en el mieloma. El médico que lo vio en ese tiempo descubrió algo muy raro al hacer el examen de orina: la albúmina precipitaba al ser calentada a tan sólo 40°C, en circunstancias de que la albúmina

urinaria normal precipita a temperatura de ebullición (100°C). Luego de un examen muy prolijo descubrió que ésta era una albúmina especial, de un peso molecular muy bajo: entre 50.000 - 200.000 Kd; que hoy conocemos como proteína de Bence-Jones, cuya característica es precipitar entre 40 y 60 °C. (66)

La importancia de la albúmina de Bence-Jones se da a partir de **1956** y es que implica un pronóstico más maligno del mieloma, porque se deposita en los túbulos renales junto con el calcio, el ácido úrico y células descamadas; formando un tapón en los túbulos que lleva a la insuficiencia renal. En este tipo de mieloma de cadenas livianas (albúmina de Bence-Jones*) el paciente no dura más de 1 ó 2 años, en circunstancias que los otros mielomas duran entre 3 a 5 años, salvo excepciones. (66)

En **1889** siguieron los descubrimientos y Kahler hizo la descripción general de la enfermedad, que pasó a llamarse "enfermedad de Kahler". Ahora, claro, los rusos le llaman "enfermedad de Lusinski", y los italianos de otra manera... (Aquí el doctor cuenta de cómo casi se hace famoso con el cráneo de una momia que parece que tenía mieloma, pero el padre Le Paige no le prestó el cráneo para cerciorarse...) (66)

Las lesiones características del mieloma son las **Geodas**, pequeñas destrucciones circulares de hasta 1cm, de los huesos, que a veces son confluentes como los huesos de la pelvis, llegando a tener varios centímetros. Son únicamente osteoclásticas, sin atisbo de nueva formación de hueso, aunque pueden acompañarse de fibrosis. Esto las diferencia de las lesiones por cánceres metastásicos, en que sí puede encontrarse nuevo hueso formado. (66)

La frecuencia del mieloma en Chile se ha casi cuadruplicado, hace veinte años se tenía 0,6 casos por 100.000 habitantes; ahora se tienen 2 por cada 100.00. El primer caso en Chile, fue del telefonista de la posta, que sufrió una fractura de tres costillas por un codazo. Era un paciente con proteinuria (compromiso del riñón), sin edema y sin HTA, pero tenía insuficiencia renal. Se le hizo una punción esternal y se confirmó el diagnóstico de mieloma. (66)

2.1.7.2 DEFINICIÓN CLÍNICA DE MIELOMA MÚLTIPLE

El **Mieloma Múltiple**, mielomatosis o enfermedad de Kahler, es el prototipo de gammapatía monoclonal maligna. Las manifestaciones se deben, por una parte, a la proliferación tumoral plasmocelular (lesiones esqueléticas, anemia, hipercalcemia e infiltración de diversos órganos y tejidos) y, por otra, a la producción de la proteína monoclonal por parte de las células mielomatosas (insuficiencia renal, predisposición a las infecciones, síndrome de hiperviscosidad). (26)

El **Mieloma Múltiple** es un cáncer de la médula ósea. Más específicamente es un crecimiento incontrolable de las células plasmáticas. Se encuentra comúnmente en las personas de edad, pero cada vez más gente joven contrae la enfermedad y en casos no frecuentes en niños. Las células plasmáticas son una parte importante del sistema inmunológico del cuerpo. Estas células se producen en la médula ósea y se transportan en el torrente sanguíneo. La médula ósea es la fábrica del cuerpo que produce las células sanguíneas. Esta se encuentra en todos los huesos, pero se concentra en el adulto en la pelvis, costillas, columna y en los huesos largos de los brazos y piernas. Normalmente las células plasmáticas comprenden una pequeña porción. Las personas que padecen mieloma tienen un crecimiento descontrolable de las células plasmáticas. Por ello, presentarán un incremento de las células plasmáticas en la médula ósea (superior al 10%, y a menudo más del 90%). Dada la elevada cantidad, estas células se visualizan con el microscopio en un preparado de médula como capas de células plasmáticas. Las células plasmáticas malignas tienen la particularidad de ser monoclonales (es decir, se originan a partir de una sola célula defectuosa que inició el ciclo de crecimiento canceroso sin control). (47)

2.1.7.3 HISTORIA

1844: Los primeros casos descritos de “mollitis y fragilis oseum” (hueso blando y frágil).

1850: El paciente Thomas Alexander McBean fue diagnosticado en 1845 por el Dr. William Macintyre, en el consultorio de la calle Harley en Londres. El inusual problema de la orina se descubrió por una investigación completa realizada por el Dr. Henry Bence Jones, con una

publicación de su encuentro en 1848. Mr. John Dalrymple (un cirujano) notó y publicó en 1846 que las enfermedades del hueso contenían células, subsecuentemente demostró que eran células del plasma. Dr. Macintyre publicó los detalles completos de un caso de mieloma de Bence Jones en 1850. En retrospectiva esto fue notado por el Dr. Solly que publicó un caso de mieloma (Sarah Newbury) en 1844.

1873: Rustizky introdujo el término de “**Mieloma Múltiple**” designado a la presencia de tumores múltiples en los huesos.

1889: Otto Kahler (Viena) publicó un detalle clínico descrito en el **Mieloma Múltiple** (“enfermedad de Kahler”).

1890: Ramón y Cajal aportaron con la primera descripción exacta de las células plasmáticas.

1900: Wright descubrió que las células del **Mieloma Múltiple** eran células plasmáticas.

1903: Weber notó que el mieloma era una enfermedad del hueso (lesiones líticas del hueso), lo cual demostró por rayos X.

1909: Weber también fue el primero en sugerir que las células del plasma en la medula ósea actualmente producían el mieloma con destrucción ósea y *lambda* (Lipari) en su honor.

1930: El diagnóstico de rutina del mieloma presentaba dificultades, hasta que a partir de 1930 se realizó por primera vez aspirados de médula ósea. El desarrollo de la ultra centrifugación y la electroforesis aportó al diagnóstico.

1953: Al introducir la inmunoelectroforesis, permitió una identificación exacta de las proteínas monoclonales.

1956: Karngold y Lipari notaron que las proteínas de Bence Jones tenían relación en un suero normal, las gamma globulinas son proteínas que en un suero anormal eran semejantes a las proteínas de Bence Jones. Las proteínas de Bence Jones subsecuentemente fueron llamadas *kappa* (K; Karngold).

1958: Se descubrió el primer fármaco antineoplásico llamado Sarcolysin, y en ese tiempo fue uno de los primeros tratamientos posible. Luego apareció el Melphalan (Alkeran) como un derivado.

1961: Waldenström enfatizó la importancia de la diferenciación entre gammopatías monoclonales y policlonales. Él asociaba que las proteínas Ig M con macroglobulinemia eran distintas del mieloma.

1962: Primer reporte de un próspero tratamiento de mieloma con Melphalan (Alkeran) por Bergsagel.

1964: Primer reporte de un nuevo tratamiento para el mieloma con ciclofosfamida (cytoxan) por Korst. Los resultados con Melphalan y ciclofosfamida más bien fueron similares.

1969: La combinación de melphalan con prednisona (MP) (por Alexanian) demostró dar mejores resultados que solo con melphalan.

1975: Durie/Salmon introdujeron el primer esquema del sistema del mieloma. Esto permitió que los pacientes puedan ser clasificados y ello contribuya a su beneficio para la quimioterapia y diferenciar los estados de la enfermedad (I/II/III, A o B).

1976 – 1992: Varias combinaciones de quimioterapias se han tratado incluyendo el régimen M2 (BMCP), VMCP – VBAP, y ABCM que indica algún beneficio versus MP. Sin embargo, en 1992 se comparó la meta de análisis (Gregory) y se demostró que los resultados eran equivalentes para todas las combinaciones.

1979 – 1980: Labeling indicó el aumento de las fracciones en el análisis, fue el primero en introducir un test en mieloma y la relación con otras enfermedades.

La remisión estable en la primera fase del mieloma se identificó claramente con las células del mieloma y su aumento en la fracción de L1% = 0%.

1982: Se reportó el primer trasplante de gemelos con mieloma (Fefer y Osseman).

1983: Primer uso de suero β 2 microglobulina para un test pronóstico en mieloma (Bataille y Durie).

1984: Primer reporte del uso de VAD quimioterapia (Barlogie y Alexanian).

1984 – 1986: Primeros reportes de trasplantes alogénicos en mieloma (varios investigadores).

1986 – 1996: Innumerables estudios evaluaron las dosis altas de terapias con autólogos de médula ósea o célula stem que se preservaban en el mieloma (varios investigadores). Ambos el simple (McElwain) y el doble (Barlogie) introdujeron los procedimientos del trasplante.

1996: Primer reporte de un estudio casual indica el beneficio de altas dosis de terapia con trasplante de médula ósea versus quimioterapia standard (Attal). Sin embargo, el análisis no llegó a su meta para ser comparado con otros largos estudios que se realizaron.

La combinación de melphalan – prednisona (MP) dio una respuesta objetiva en un 50 – 60 % de los pacientes. Muchas otras “poliquimioterapias” tienden a proyectar como tratamiento, desde que no se obtuvieron mejores resultados. MP hoy en día es el “modelo oro” de terapia para el mieloma. Aunque altas dosis de terapia (Ej.: altas dosis IV de melphalan) pueden mejorar la remisión en pacientes sintomáticos con enfermedad avanzada, el impacto de supervivencia a dado lugar a una contribución completa para el tratamiento en el mieloma. (22)

2.1.8 EPIDEMIOLOGÍA, INCIDENCIA, EDAD Y SEXO

El **Mieloma Múltiple** constituye la neoplasia de células plasmáticas y es la segunda enfermedad hematológica más frecuente. Aunque la enfermedad es predominantemente un cáncer en personas mayores (la media es de 65 a 70 años), estadísticas recientes indican que la incidencia ha aumentado y que afecta a personas cada vez más jóvenes. Cada año hay casi 19.000 casos nuevos y más de 14.000 muertes provocadas por esta enfermedad en la Unión Europea. Aproximadamente hay en todo el mundo 74.000 casos nuevos y más de 45.000 personas mueren cada año. (50)

El mieloma habitualmente aparece tarde en la vida. Se observa en todas las razas y es dos veces más frecuente en hombres que en mujeres; es decir, la relación es de 2:1; en cambio la prevalencia en hombres y mujeres es más o menos la misma. La mayor prevalencia se presenta en la 3ra edad (entre los 40 y 60 años). (26, 37)

La incidencia del **Mieloma Múltiple** es de 4 casos/100.000 habitantes por año. Representa el 1% de todas las neoplasias y alrededor del 10% de las hemopatías malignas.

Sólo el 15 y el 2% de los pacientes tienen menos de 50 y 40 años, respectivamente. En las series actuales estudiadas no existe un claro predominio sexual. (26)

La frecuencia del mieloma ha ido en aumento en todo el mundo. Hace 20 años se reportaban 0,6 casos por 100.000 habitantes; ahora se reportan 2 por cada 100.000, o sea, su frecuencia se ha casi cuadruplicado, igual que con el linfoma no Hodgkin. (26)

Este año habrá alrededor de 1300 casos de **Mieloma Múltiple** en la Argentina. Esta enfermedad es raramente observada en pacientes menores de 40 años. El 90% de los pacientes tienen más de 55 años, mientras que el 50% tienen más de 70 años cuando se les realiza el diagnóstico. (24)

Los estudios epidemiológicos del Instituto Carlos III en España, han revelado interesantes datos de mortalidad por mieloma, se analizaron poblaciones en un entorno de 0 a 30 Km. de las centrales nucleares y de las instalaciones de combustible en Garoña, Zorita y Almaraz. El **Mieloma Múltiple**, sin relación demostrada con la radiación, ha sido detectado en Zorita con el máximo valor de mortalidad. Esta enfermedad pudiera estar relacionada con productos utilizados habitualmente en el entorno rural como son los pesticidas. Se desconoce la relación entre el uso de determinados productos y el mayor índice de la enfermedad. En el caso de que la central nuclear fuera la causa principal, el valor máximo debería darse en los propios trabajadores de la central o en el entorno más próximo a la central; mientras que los casos de mieloma anteriores al año 1989 fueron difíciles de estudiar debido a que su diagnóstico es posible a avances médicos posteriores a esta fecha. Para su diagnóstico es necesaria la biopsia de médula ósea y otras prácticas disponibles desde los años noventa. La media de muertes por mieloma en Guadalajara está por debajo de la media española. (27)

En Chile, en los últimos cinco años se ha registrado un aumento de la frecuencia del **Mieloma Múltiple**, enfermedad que aún no tiene cura y cuyo origen no se ha determinado científicamente. Se trata del **Mieloma Múltiple**, el segundo cáncer hematológico de mayor relevancia, que se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea y, con menor reiteración, en tejidos blandos y vísceras. Las estadísticas señalan que en los últimos cinco años se ha producido un aumento en su frecuencia, especialmente en personas menores de 55 años. Ello, pese a que el promedio de edad de quienes lo contraen es de 70 años; la recurrencia de esta patología es de aproximadamente

750 casos anuales. Los estudios realizados por el Dr. Guillermo Conte, Jefe de la Sección de Hematología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile indican que se ha observado dicho incremento y, lo que es más llamativo, la presencia de la enfermedad en personas de 40 años o menores y, en muchas oportunidades, de una manera muy agresiva. Según el especialista, no existe una causa conocida de esta enfermedad, aunque se han considerado las pinturas, los solventes y los pesticidas como factores etiológicos y agregó que investigaciones actuales plantean un posible origen viral. Aún cuando no se ha podido lograr una cura para el **Mieloma Múltiple**, la aparición de nuevos pronósticos e innovadoras alternativas terapéuticas, como el trasplante de médula ósea, ha permitido una sobrevida prolongada y una óptima calidad de vida para el paciente. (70)

Así también, el **Mieloma Múltiple** es responsable del 10 % de los cánceres hematológicos, es causa de muerte de aproximadamente, 10.000 norteamericanos cada año. La enfermedad es más común en los ancianos, los negros son 2 veces más afectados que los blancos. La causa del **Mieloma Múltiple** se desconoce y su extensión, complicaciones, sensibilidad a los medicamentos y evolución clínica varían grandemente entre la población de pacientes. Puesto que muchos aspectos sobre la biología de esta enfermedad se discuten recientemente. (4)

Sin embargo, las perspectivas para los pacientes con **Mieloma Múltiple** están mejorando constantemente, debido a que los nuevos tratamientos están sumando años a los porcentajes de supervivencia. Nuevas combinaciones de drogas han sido aplicadas para el tratamiento de esta enfermedad con resultados alentadores. Muchos de los progresos realizados para combatir esta enfermedad en la última década, es el resultado de usar solamente quimioterapia o altas dosis de quimioterapia junto con trasplante autólogo de células progenitoras de sangre periférica. (24, 25)

2.1.9 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las células plasmáticas malignas sintetizan una de las inmunoglobulinas en exceso, habitualmente la Ig G o la Ig A. Esto explica la cúspide que se forma en la curva electroforética (aguja). La síntesis de las inmunoglobulinas normales por lo general está disminuida. La inmunoglobulina consiste de dos pares de cadenas de polipéptidos; un par de cadenas “pesadas” (peso molecular alrededor de 55,000 cada una) cuyas subunidades

determinan si toda la molécula pertenece a la clase IgG, IgA o IgM y de un par de cadenas “livianas” (peso molecular de 20,000 cada una), la cual es la misma para las tres moléculas (IgG, IgA, IgM). Los dímeros de las cadenas livianas constituyen la proteína de Bence Jones la cual carece de cadenas pesadas. Puede estar desequilibrada la síntesis de cadenas pesadas y livianas, por ejemplo un exceso de producción de cadenas livianas conduce a proteinuria por proteína de Bence Jones. Las células malignas también pueden sintetizar sólo parte de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, en el mielograma de Bence Jones la cual se caracteriza por hipogammaglobulinemia en el suero y excreción de grandes cantidades de proteína Bence Jones en orina, dando una espiga para proteína en la electroforesis. Con mucha menor frecuencia, son sintetizadas sólo cadenas pesadas. Estas “enfermedades de cadenas pesadas” que pueden involucrar la producción excesiva de parte de moléculas IgG, IgA o IgM las cuales clínicamente se parecen más al linfoma que al **Mieloma Múltiple**. (37)

La amiloidosis, ya sea primaria o secundaria, va siempre asociada por lo general con neoplasias de células plasmáticas; proteínas anormales de gammaglobulinas, en especial aquellas del tipo proteínas Bence Jones, se hallan directamente implicadas en estos infiltrados tisulares (“amiloide”). (37)

2.1.10 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los dolores óseos constituyen el síntoma más frecuente. El dolor se localiza preferentemente en la columna vertebral y la parrilla costal, presenta características mecánicas y se exacerba con los movimientos y con la tos. La anemia también es una manifestación clínica frecuente. Puede existir afectación del estado general, con astenia y pérdida de peso. La fiebre debida a la propia enfermedad se da en menos del 5% de los enfermos. En muchos casos la primera manifestación del **Mieloma Múltiple** la constituyen infecciones de repetición, entre las que destaca la neumonía neumocócica. (17, 37)

Otras veces la enfermedad se manifiesta con insuficiencia renal o con sintomatología secundaria a hipercalcemia (náuseas, vómitos, poliuria, polidipsia, estreñimiento, cefaleas, somnolencia, irritabilidad e incluso coma). La diátesis hemorrágica, en forma de epistaxis,

hematurias o equimosis, puede ser también la manifestación inicial. En ocasiones el motivo de consulta es la palpación de una tumoración sobre el cráneo, las clavículas, la parrilla costal o el esternón. En algún caso, la compresión de la médula espinal constituye la primera manifestación. También existen casos asintomáticos (mieloma quiescente o *smoldering myeloma*) en los que el hallazgo de una VSG acelerada o de un componente M conduce al diagnóstico de mieloma. En alrededor del 10% de los casos existe una amiloidosis asociada, que se puede manifestar por insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome nefrótico, neuropatía periférica, dolores articulares o síndrome del túnel carpiano. (17, 37)

El dato exploratorio más característico es el dolor óseo a la presión de las regiones afectadas. La palidez cutáneo mucosa, que con frecuencia se observa, se halla en relación con el grado de anemia. En una cuarta parte de los casos se palpa hepatomegalia, y en el 5%, esplenomegalia, en general de escaso tamaño. La exploración neurológica puede poner de manifiesto una paraparesia espástica o un cuadro radicular, principalmente en forma de cialgia. Si hay amiloidosis asociada puede encontrarse macroglosia, síndrome del túnel carpiano o neuropatía periférica. Los plasmocitomas extraóseos son infrecuentes, pero pueden producir grandes masas cutáneas. (17, 37)

2.1.10.1 COMPROMISO ESQUELÉTICO

El 80% de los pacientes con **Mieloma Múltiple** tienen alteraciones radiológicas en forma de osteoporosis, osteólisis y/o fracturas patológicas en el momento del diagnóstico. En el 70% de los casos hay lesiones osteolíticas. Las regiones que con mayor frecuencia se afectan son el cráneo, la columna vertebral, las costillas, el esternón, la pelvis y los huesos largos proximales. Las lesiones típicas son puramente osteolíticas y, en general, la destrucción ósea aparece en forma de focos bien circunscritos, constituyendo las denominadas *geodas* o lesiones en “sacabocados”, con escasa o nula reacción esclerosa circundante. (26)

El cráneo constituye la localización ósea más frecuente. La afectación de la caja torácica también es muy frecuente. En ocasiones se aprecian fracturas costales, debidas a osteoporosis. Otras veces se observan claras osteólisis, costillas insufladas o desaparición

de amplios sectores costales. También pueden comprobarse masas tumorales, que partiendo de la superficie interna de una costilla simulan una tumoración pulmonar o pleural. (26)

En la columna vertebral suele existir una osteoporosis intensa, que origina vértebras en forma de “cuña” o de lente bicóncava. Los hundimientos vertebrales son a menudo múltiples y pueden afectar vértebras distantes entre sí, conduciendo a la disminución de la talla del paciente, incluso en varios centímetros. (26)

Lesiones osteoscleróticas sólo se registran en el 1-2% de los casos. El diagnóstico diferencial se debe establecer con las metástasis óseas de neoplasias sólidas. (26)

2.1.10.2 COMPROMISO RENAL

El riñón se afecta en aproximadamente la mitad de los pacientes con **Mieloma Múltiple** en algún período de su evolución. El 25-30% tiene insuficiencia renal en el momento del diagnóstico y en el resto la insuficiencia renal aparece en el curso de la enfermedad. La mayoría de los pacientes con insuficiencia renal presentan proteinuria de cadenas ligeras, que precipitan en los túbulos renales, dando lugar al denominado *riñón del mieloma*. Se han descrito casos aislados de acidosis tubular renal y síndrome de Fanconi del adulto, probablemente ocasionados por trastornos tubulares específicos, relacionados con la excreción de cadenas ligeras. Los glomérulos están preservados, excepto en dos situaciones: cuando existe amiloidosis, predominantemente asociada a cadenas ligeras lambda, y en la denominada enfermedad por depósito de las cadenas ligeras, en general de tipo kappa. En ambos casos suele existir una proteinuria de tipo glomerular y con valores de síndrome nefrótico, a diferencia del patrón tubular, que se observa en el típico riñón del mieloma. La hipercalcemia es el factor desencadenante de la insuficiencia renal en el 50% de los casos. La práctica de una urografía intravenosa, los procesos infecciosos (neumonías, infecciones urinarias, gastroenteritis), así como las intervenciones quirúrgicas, pueden provocar una deshidratación y ser el desencadenante de una insuficiencia renal aguda. No obstante, en algunos casos (5%) el **Mieloma Múltiple** se presenta en forma de insuficiencia renal aguda sin que se halle una causa desencadenante. Cuando la insuficiencia renal es

moderada (creatinina de 2-4 mg/dl; 177-354 mol/L) o se debe a hipercalcemia, es reversible en alrededor de la mitad de los casos. Por el contrario, la insuficiencia renal grave (creatinina 8 mg/dl; 704 mol/L) casi siempre es irreversible y tienen un pronóstico letal a corto plazo. (26)

2.1.10.3 COMPROMISO NEUROLÓGICO

La compresión medular y/o de las raíces nerviosas es la complicación neurológica más frecuente del **Mieloma Múltiple**. La radiculopatía es la complicación más habitual y suele ser de localización lumbosacra. El dolor radicular es consecuencia de la compresión nerviosa por afectación mielomatosa o por aplastamiento vertebral. La compresión de la médula espinal o de la cola de caballo por un plasmocitoma extradural se da en el 5-10% de los casos y puede ocasionar una paraplejía irreversible si no se efectúa un tratamiento inmediato. Otras complicaciones neurológicas raras del mieloma son la polineuropatía sensitivo motora, la afección intradural, la leucoencefalopatía multifocal progresiva y la mielomatosis meníngea. Si hay amiloidosis asociada los depósitos de amiloide pueden comprimir el nervio mediano y provocar un síndrome del túnel carpiano. La hipercalcemia puede ocasionar encefalopatía con cefalea, somnolencia, irritabilidad, convulsiones e incluso coma, que requiere un tratamiento de urgencia. (26)

2.1.10.4 INFECCIONES

Las infecciones bacterianas constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con **Mieloma Múltiple**. Las más frecuentes son las pulmonares y las urinarias. El neumococo es el agente etiológico más común de las infecciones pulmonares, mientras que los bacilos gramnegativos lo son de las urinarias. Algunos pacientes padecen neumonías neumocócicas de forma recurrente. Alrededor del 10% de los enfermos presentan herpes zoster. El aumento de la predisposición a las infecciones es multifactorial. Probablemente, la disminución de las inmunoglobulinas policlonales es el factor más importante en las infecciones por neumococo; la adición de otros factores, como hospitalización, inmovilización, administración de quimioterapia e insuficiencia renal, facilita las infecciones por gérmenes gramnegativos. (26)

2.1.11 PATOLOGÍA, FISIOPATOLOGÍA Y DATOS CLÍNICO - LABORATORIALES

Por lo general la enfermedad es incurable, excepto quizás por lo siguiente (pacientes jóvenes, enfermedad temprana, un riesgo bajo); para lo cual puede realizarse un trasplante de médula ósea o célula stem singénico (gemelos) o alogénico; ello puede dar lugar a que en un largo tiempo se presente la recaída y así sea mayor la opción de supervivencia. (26)

La médula ósea, por lo general, está infiltrada con nódulos de células de mieloma, aunque a veces se aprecia afección difusa. Las células son plasmáticas anormales con citoplasma abundante positivo a MGP y PAS, núcleos con cromatina fina y un solo nucléolo grande. Las mitosis son raras, pero los pacientes pueden desarrollar enfermedad más maligna con mitosis, por ejemplo, IBS-B. (61)

El incontrolable crecimiento de las células plasmáticas da lugar a una serie de consecuencias que incluyen falla al nivel de la médula ósea, incremento del volumen y viscosidad del plasma, supresión de producción de inmunoglobulinas normales, destrucción del esqueleto e insuficiencia renal. Nunca se ha presentado la enfermedad por muchos años en forma asintomática. En la fase sintomática se presenta más comúnmente dolores óseos. (17, 37)

2.1.11.1 ETIOPATOGENIA INMUNOLÓGICA

En cualquier desorden como por ejemplo desordenes tubulares renales, nefrotoxicidad por medicamentos, Lupus, en los cuales resulta aumento en el catabolismo de inmunoglobulina, puede producir aumento en los niveles de las cadenas livianas. La presencia de una cadena ligera monoclonal es gran evidencia de la existencia de un proceso maligno tal como **Mieloma Múltiple**, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis y ocasionalmente malignidades epiteliales como aquellas de pulmón o intestino. En casos muy raros pueden aparecer niveles altos asociados con infección severa y con enfermedades que tienen implicación inmunológica, tal como endocarditis bacteriana subaguda. En estos casos las proteínas desaparecen hasta la resolución del proceso primario. Las cadenas livianas

han sido asociadas con ciertas formas de amiloidosis. En muchos de estos casos los depósitos del tejido amiloide consisten en proteínas que reaccionan con antisuero contra las cadenas livianas. (18)

Las 5 clases de inmunoglobulinas contienen cadenas livianas como una porción integral de la molécula total, pero hay solo 2 tipos de cadenas livianas, kappa y lambda. La porción terminal de las cadenas livianas y pesadas forman un sitio de unión antigénica con diversa especificidad. Las cadenas ligeras libres están aumentadas en una variedad de desórdenes en el metabolismo y síntesis de inmunoglobulinas, la mayoría dramáticamente en monogamopatías de tipo benigno o maligno. Las moléculas existen como monómeros o dímeros, producidas por inmunocitos o ya existentes en conjunto con inmunoglobulinas intactas. Las cadenas livianas son eliminadas y destruidas por el riñón normal; sin embargo, como en la falla renal progresiva, los niveles sericos están aumentados. El término "Proteínas de Bence Jones" es a menudo aplicado incorrectamente para todas las cadenas livianas no asociadas. De hecho, este término debería ser aplicado solamente a un gran número de pequeñas cadenas livianas urinarias que presentan termolabilidad clásica (test de Bence-Jones). Menos del 10% de todas las cadenas livianas presentes en la orina podrían reaccionar de manera clásica. Algunas cadenas urinarias livianas han sido llamadas "determinantes ocultos" que sugieren una enfermedad maligna. Algunos antisueros comerciales disponibles reconocen estos epitopes. (18)

2.1.11.2 SÍNTOMAS Y SIGNOS

La única manifestación puede ser la anemia, aunque puede existir dolor óseo constante que se exacerba con el movimiento, dolor (especialmente en la espalda) y fracturas espontáneas. En general, el hígado y el bazo no se encuentran crecidos. En ocasiones se observan tumores extramedulares de células plasmáticas, localizados en bucofaringe, piel o sitios próximos a la médula espinal. Es frecuente encontrar una notable pérdida de peso. (37)

2.1.11.3 DATOS DE LABORATORIO

La anemia es moderada y de tipo normocítico y normocrómico. Se halla aumentada la tendencia a la formación de “cilindros celulares”, lo cual interfiere con la realización de la cuenta globular, de frotis, de determinaciones de grupos sanguíneos y de pruebas cruzadas. (37)

En el 90% de los pacientes la velocidad de eritrosedimentación (VSG) está muy acelerada, siendo, por lo general, superior a 100 mm en la primera hora. Sin embargo, en el 5-10% de los casos (mielomas de cadenas ligeras con escaso componente M) la VSG es inferior a 25 mm en la primera hora. El 60-70% de los pacientes presentan anemia por infiltración medular. (26)

El recuento de leucocitos es casi siempre normal. En el 15% de los pacientes hay trombocitopenia. El paso de células plasmáticas a la sangre periférica es muy infrecuente y, cuando se observa, rara vez excede del 5%, excepto en los casos de leucemia de células plasmáticas. En la extensión de sangre periférica es típico que los hematíes se agrupen formando pilas de monedas (*rouleaux*). En el 20-30% de los casos hay hipercalcemia en el momento del diagnóstico y en otro 30% aparece durante el curso de la enfermedad. Una cuarta parte de los pacientes presentan insuficiencia renal. En el 90% de los mielomas IgG e IgA la viscosidad plasmática es superior a la normal (1,8 cp). Sin embargo, en general la elevación es poco intensa. Tanto una viscosidad superior a 5 cp como el síndrome clínico de hiperviscosidad son muy raras en el **Mieloma Múltiple**. (26)

En el aspirado de médula ósea suele encontrarse una infiltración por células plasmáticas superior al 20%. Aunque existen casos de mieloma bien demostrado que cursan con una plasmocitosis medular muy discreta (5-10%), una proporción de células plasmáticas en médula ósea inferior al 10% orienta hacia una gammapatía monoclonal idiopática o hacia una plasmocitosis reactiva (cirrosis hepática, colagenosis, infecciones crónicas, SIDA). En los casos de mieloma, las células plasmáticas suelen ser de gran tamaño, con cromatina poco condensada y nucléolos prominentes. A veces muestran grandes inclusiones proteicas redondeadas en su citoplasma (cuerpos de Russell), agregados de esférulas de aspecto vacío (células en forma de mórula o células de Mott) o bien presentan características

tintoriales peculiares, como ocurre con las células plasmáticas flameadas. Sin embargo, las células plasmáticas no siempre adoptan una morfología normal. El microscopio electrónico pone de manifiesto un retículo endoplásmico muy desarrollado, característico de las células que están sintetizando proteínas. (26)

El proteinograma electroforético revela una banda homogénea evidente en el 85% de los casos. En el 15% restante la electroforesis sérica es normal o tiene sólo una pequeña banda (mielomas de cadenas ligeras, algunos casos de mielomas IgG con escaso componente M y los raros casos de mieloma IgD y no secretor). En los mielomas tipo IgG, el componente M suele migrar hacia la zona de las gammaglobulinas, dando lugar a una banda estrecha, mientras que en los IgA lo hace hacia la zona de las betaglobulinas, formando una banda más ancha. La proteinuria de Bence-Jones constituye un hecho muy característico, que se encuentra en la mitad de los casos. La clásica proteína de Bence-Jones precipita cuando se calienta hacia 50-60 °C y se disuelve de nuevo a 90-100 °C. El estudio cualitativo de las inmunoglobulinas mediante inmunoelectroforesis resulta imprescindible para identificar la clase que se produce en exceso y para confirmar su carácter monoclonal. El estudio cuantitativo o dosificación de las distintas inmunoglobulinas se efectúa habitualmente por inmunodifusión radial simple. Además del aumento de la inmunoglobulina monoclonal, en el 75% de los casos de **Mieloma Múltiple** existe una disminución de las inmunoglobulinas policlonales normales. La distribución del **Mieloma Múltiple** según el tipo de inmunoglobulina es la siguiente: IgG (55-60%), IgA (20-30%), cadenas ligeras –Bence-Jones puro– (10-20%), IgD (2%), no secretor (1-2%); los tipos IgM e IgE son excepcionales. La relación de cadenas ligeras kappa / lambda suele ser 2/1. (26)

En suero y/u orina se encuentra elevada la proteína M, la cual es una nueva característica de diagnóstico. El tratamiento a dado mejorías en la situación clínica, cerca de un 60 % de los pacientes. Los múltiples periodos de remisión y recaída pueden ocurrir. En general, cada recaída demostró la presencia de proteína M; y se observaba una remisión corta durante y hasta la fase final de la enfermedad, sobre todo cuando el paciente presentaba complicaciones. La forma esquematizada del curso típico de la enfermedad se ilustra a continuación: (26)

Células Plasmáticas	Usualmente en la: médula ósea (mieloma) pero puede solo ser extra-medular.
Esqueleto Se encontró: asociados los efectos de destrucción ósea	<ul style="list-style-type: none">• Solamente lesiones osteolíticas múltiples• Osteoporosis difusa• Elevación de calcio en suero• Hipercalciuria• Pérdida de altura
Mieloma extra óseo (Ej. : fuera del hueso)	Mas comúnmente en el área de cabeza / cuello Ej.: nasofaringe, puede establecerse en hígado, riñones y otros tejidos blandos.
Sangre periférica	<ul style="list-style-type: none">• Anemia, coagulación anormal• Leucopenia, trombocitopenia• Leucemia de células Plasmáticas• Circulación de linfocitos B monoclonales

Cambios en las proteínas del plasma	<ul style="list-style-type: none">• Hiperproteinemia 80-150 gr/l• Hipervolemia• Inmunoglobulinas monoclonales (IgG, IgD, IgA, IgM, IgE, cadenas livianas)• Amiloidosis• Estrechos puentes aniónicos• En suero la B-2-microglobulina, elevada• Disminución de albúmina en suero• Elevación en suero de Il-6 y C.R.P. (proteína C – reactiva)
Anormalidades del riñón	<ul style="list-style-type: none">• Proteinuria, leucocitosis o eritrocitosis• Disfunción tubular con acidosis y uremia

Durie Brian G.M. (22)

De los pacientes con mieloma, el 93% tienen múltiples lesiones óseas y solo el 3% tiene una lesión. Al parecer el 4% tiene solo lesiones extra-óseas que son representadas en un subgrupo de enfermedades distintas y tienen un tratamiento característico; este subgrupo no forma parte de este contexto que se analiza. (22)

Tipos de Proteínas Monoclonales (componentes - M)	Porcentajes / totales
Tipos de Suero:	
Ig G	52
Ig A	21 75%
Ig D	2
Ig E	< 0.01
Orina (solo Bence Jones) tipos K (Kappa) L (Lambda)	11%
Cadenas H solo (G o A)	< 1
2 o más paraproteínas monoclonales	< 1 2%
Paraproteínas no monoclonales	1
*IgM	12%
*IgM (raramente mieloma) típicamente asociado con macroglobulinemia Waldenströms más que mieloma.	
Origen: Datos en 1,827 pacientes con mieloma, recolectado y analizado por Pruzanski y Ogryzlo, 1970.	

El volumen del plasma se eleva, debido al alto contenido total de proteínas en suero. Esto podría ser un pseudo caso de hiponatremia (baja cantidad de sodio en suero). Altas concentraciones de proteínas en el mieloma pueden llevar a una clínica del “síndrome de hiperviscosidad”. (22)

No es común la precipitación difusa de proteínas en el mieloma a nivel de los tejidos del riñón, que al combinarse con la formación de restos empeoran la función del riñón (“mieloma del riñón”). Muchos otros factores, Ej.: infecciones, pueden resultar un empeoramiento de la función renal. Algunas veces esta enfermedad esta precedida por anomalías presentes en los riñones, por ejemplo, el síndrome de Fanconi en adultos, un selectivo defecto tubular renal. (22)

2.1.12 FORMAS CLÍNICAS ESPECIALES

2.1.12.1 MIELOMA QUIESCENTE (SMOLDE- RING MYELOMA)

Es una forma de mieloma descrita por KYLE y GREIPP en 1980 y en la que se incluyen los pacientes que presentan un componente M sérico superior a 3 g/dl y más del 10% de células plasmáticas en médula ósea, sin anemia, osteólisis, insuficiencia renal ni otras manifestaciones debidas a la gammapatía monoclonal. Probablemente se trata de una entidad más próxima a la gammapatía monoclonal idiopática (GMI) que al **Mieloma Múltiple**. De hecho, muchos pacientes con mieloma quiescente permanecen estables durante años sin requerir tratamiento citostático. (26)

2.1.12.2 LEUCEMIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

La leucemia de células plasmáticas (LCP) es una forma poco común de discrasia de células plasmáticas, que puede presentarse *de novo* (LCP primaria) o a lo largo del curso evolutivo de un **Mieloma Múltiple** (LCP secundaria). Para su diagnóstico se exige la presencia en sangre periférica de una cifra absoluta de células plasmáticas superior a 2×10^9 /L o una proporción superior al 20% en la fórmula leucocitaria. Su incidencia se sitúa entre el 1-5% del total de los casos de **Mieloma Múltiple**. Los pacientes con LCP tienen más alteraciones citogenéticas y valores más elevados de interleucina 6 (IL-6) que los enfermos con **Mieloma Múltiple** convencional. La evolución de la LCP es aguda y la respuesta al tratamiento suele ser desfavorable, por lo que el pronóstico es infausto a corto plazo. Los pacientes con LCP primaria responden mejor a la poliquimioterapia que a la asociación de melfalán y prednisona. Sin embargo, la respuesta es de corta duración. (26)

2.1.12.3 MIELOMA NO SECRETOR

En alrededor del 1% de los pacientes con **Mieloma Múltiple** no se puede detectar componente M en plasma ni en orina (mielomas no secretores). Sin embargo, en la mayoría de ellos se puede demostrar, por métodos inmunocitoquímicos o inmunofluorescencia, la presencia de la inmunoglobulina monoclonal en el citoplasma de las células plasmáticas

(mieloma “no excretor”). Se han descrito casos aislados en los que no se ha podido objetivar la producción de inmunoglobulina por parte de las células plasmáticas (mieloma “no productor” o no secretor propiamente dicho). La clínica, la respuesta al tratamiento y la supervivencia son similares a las del **Mieloma Múltiple** en general, excepto en que hay menor incidencia de insuficiencia renal. (26)

2.1.12.4 **MIELOMA OSTEOSCLERÓTICO**

El dato clínico más característico es una polineuropatía periférica de predominio motor. Las lesiones osteoscleróticas pueden ser únicas o múltiples. La proporción de células plasmáticas en médula ósea suele ser inferior al 5%. El diagnóstico se efectúa mediante biopsia de una lesión osteosclerosa. En la mayoría de los casos el componente M es de tipo IgA y la cadena ligera suele ser de tipo lambda. A diferencia de lo que ocurre en el **Mieloma Múltiple**, la cifra de hemoglobina es normal o elevada y con frecuencia existe trombocitosis, mientras que la insuficiencia renal y la hipercalcemia son raras. Su asociación con hiperpigmentación cutánea, edemas, alteraciones endocrinas (diabetes, amenorrea, impotencia), acropaquía y hepatoesplenomegalia constituye el síndrome de POEMS (polineuropatía, osteosclerosis, endocrinopatía, componente monoclonal y alteraciones cutáneas). (26)

2.1.12.5 **MIELOMA EN PACIENTES JÓVENES**

Se han descrito algunos casos de **Mieloma Múltiple** en pacientes menores de 30 años. En estos casos la enfermedad suele ser bastante atípica (afectación esquelética politópica, a veces con extensión extra-ósea, con poca infiltración plasmocelular de la médula ósea y escaso componente M). La progresión de la enfermedad suele ser lenta y la supervivencia prolongada. Sin embargo, se han descrito casos de mieloma en pacientes jóvenes con comportamiento clínico agresivo y supervivencia corta. En una amplia serie de pacientes menores de 40 años, la presentación clínica fue similar a la de los pacientes de todas las edades, aunque se registró mayor frecuencia de afectación extramedular, y en un tercio de los casos se trataba de mieloma de cadenas ligeras. Aunque la respuesta al tratamiento fue similar al de otras series, la mediana de supervivencia fue de 54 meses. (26)

2.1.12.6 PLASMOCITOMAS LOCALIZADOS

Existen plasmocitomas que se presentan en una sola localización, ya sea en la médula ósea (mieloma solitario) o en tejidos blandos (plasmocitomas extramedulares). Representan menos del 10% de todos los tumores de células plasmáticas. El diagnóstico de plasmocitoma se establece por el hallazgo de una histopatología plasmocelular monoclonal (demostrada por inmunohistoquímica), y los criterios de que el tumor está localizado son: tumor solitario (óseo o extramedular) y ausencia de infiltración de la médula ósea por células plasmáticas y de componente M sérico y urinario (o está presente en escasa cuantía y desaparece con el tratamiento). El mieloma solitario se localiza en la columna vertebral (50% de los casos) o en los huesos largos periféricos. En el 40% de los pacientes la manifestación inicial es una paraparesia o tetraparesia. La mediana de supervivencia es superior a 10 años. Sin embargo, la supervivencia libre de enfermedad a los 10 años oscila en las distintas series entre el 15 y el 42%. El resto sufre una recidiva local (12%), una nueva lesión solitaria a distancia (15%) o evoluciona a **Mieloma Múltiple** (58%). (26)

Los plasmocitomas extramedulares pueden afectar muchos órganos, pero sus localizaciones más frecuentes son las vías respiratorias superiores y la cavidad oral (80% de los casos). En el 20% se encuentran metástasis en ganglios linfáticos cervicales, que a veces constituyen la primera manifestación de la enfermedad. El 40-75% de los pacientes sobreviven libres de enfermedad a los 10 años del diagnóstico. Las recaídas suelen producirse en los 5 años que siguen al diagnóstico. La evolución a **Mieloma Múltiple** se registra entre el 8 y el 30% de los casos. (26)

2.1.13 DIAGNÓSTICO

En general, el **Mieloma Múltiple** no plantea dificultades diagnósticas, puesto que casi todos los pacientes presentan síntomas o alteraciones analíticas propias de la enfermedad junto a la siguiente tríada: componente M sérico y/o urinario, infiltración medular por células plasmáticas y lesiones osteolíticas. Las principales dificultades diagnósticas se pueden plantear con la Gammapatía Monoclonal Idiopática (GMI), la amiloidosis primaria y las metástasis óseas de neoplasias sólidas. El diagnóstico diferencial entre **Mieloma**

Múltiple y la GMI no suele resultar difícil, ya que esta última suele constituir un hallazgo casual en individuos que se encuentran asintomáticos, sin anemia, osteólisis ni insuficiencia renal y en los que el componente M y la infiltración medular por células plasmáticas son escasos. Es importante reconocer a los individuos con mieloma quiescente (infiltración medular por células plasmáticas superior al 10% y componente M superior a 3 g/dl), cuya situación clínica y biológica se halla más próxima a la de la GMI que a la del **Mieloma Múltiple**, ya que no deben tratarse hasta que existan claros signos de progresión de la enfermedad. Los límites entre el **Mieloma Múltiple** con amiloidosis asociada y la amiloidosis primaria son también arbitrarios, ya que ambos procesos forman parte del amplio espectro en el que pueden manifestarse las proliferaciones plasmocelulares malignas. (26, 37)

Sin embargo, en la amiloidosis primaria la infiltración medular por células plasmáticas suele ser inferior al 30%, no existen lesiones osteolíticas y la proteinuria de Bence-Jones no es masiva. Hay que desconfiar siempre del diagnóstico de mieloma si no hay componente M en el plasma ni en la orina. Así, por ejemplo, ante un paciente con dolores óseos y lesiones osteolíticas, sin componente M y en el que la sospecha de **Mieloma Múltiple** reside en el examen histopatológico de una biopsia, hay que pensar antes en una neoplasia metastásica, como el hipernefroma, que en el raro mieloma no secretor. Por otra parte, ante un paciente con sintomatología general y lesiones osteolíticas, con un componente M sérico pequeño y escasa plasmocitosis medular, cabe sospechar la existencia de una neoplasia metastásica con una gammapatía monoclonal asociada. (26)

En cualquier desorden como por ejemplo: desordenes tubulares renales, nefrotoxicidad por medicamentos, o lupus; existe un aumento en el catabolismo de inmunoglobulina y se produce un aumento en los niveles de las cadenas livianas. La presencia de una cadena ligera monoclonal es gran evidencia de la existencia de un proceso maligno tal como **Mieloma Múltiple**, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis y ocasionalmente malignidades epiteliales como aquellas de pulmón o intestino. En casos muy raros pueden aparecer niveles altos asociados con infección severa y con enfermedades que tienen implicación inmunológica, tal como endocarditis bacteriana subaguda. En estos casos las proteínas desaparecen hasta la resolución del proceso primario. Las cadenas livianas han sido asociadas con ciertas formas de amiloidosis. En muchos de estos casos los

depósitos del tejido amiloide consisten en proteínas que reaccionan con antisuero contra las cadenas livianas. (18)

Las 5 clases de inmunoglobulinas contienen cadenas livianas como una porción integral de la molécula total, pero hay solo 2 tipos de cadenas livianas, kappa y lambda. La porción terminal de las cadenas livianas y pesadas forman un sitio de unión antigénica con diversa especificidad. Las cadenas ligeras libres están aumentadas en una variedad de desórdenes en el metabolismo y síntesis de inmunoglobulinas, la mayoría dramáticamente en monogamapatías de tipo benigno o maligno. Las moléculas existen como monómeros o dímeros, producidas por inmunocitos o ya existentes en conjunto con inmunoglobulinas intactas. Las cadenas livianas son eliminadas y destruidas por el riñón normal; sin embargo, como en la falla renal progresiva, los niveles séricos están aumentados. El término "Proteínas de Bence Jones" es a menudo aplicado incorrectamente para todas las cadenas livianas no asociadas. De hecho, este término debería ser aplicado solamente a un gran número de pequeñas cadenas livianas urinarias que presentan termolabilidad clásica (test de Bence-Jones). Menos del 10% de todas las cadenas livianas presentes en la orina podrían reaccionar de manera clásica. Algunas cadenas urinarias livianas han sido llamadas "determinantes ocultos" que sugieren una enfermedad maligna. (18)

Es por ello que se considera al **Mieloma Múltiple** de cadena liviana como una enfermedad maligna que se caracteriza por la presencia de proteína Bence Jones en orina. Sin embargo, la identificación y el seguimiento de pacientes con mieloma también se puede realizar por medio de la búsqueda de cadenas livianas en muestras de suero. Una investigación realizada por especialistas ingleses sugiere que la detección de cadenas livianas en suero podría reemplazar al análisis de proteína Bence Jones en orina durante el seguimiento de los pacientes con mieloma. (29)

"Actualmente, el análisis de proteína Bence Jones se puede realizar por medio de electroforesis de muestras de orina. Sin embargo, estos ensayos tienen baja sensibilidad y los métodos de control de calidad indican que existe un nivel insatisfactorio de confiabilidad. Además, se debe tener en cuenta que la excreción de cadenas livianas por el riñón depende del nivel de reabsorción que se produce en los túbulos renales. Por lo tanto, las cadenas livianas de inmunoglobulinas no aparecen en orina si la masa del tumor es pequeña o si la

producción de cadenas livianas es ineficiente. Por otra parte, el procedimiento de recolección de orina de 24 horas es complicado, sobre todo en pacientes ancianos", destacó uno de los autores del trabajo, el doctor Arthur Bradwell, de la Universidad de Birmingham. (29)

Los científicos evaluaron la presencia de cadenas livianas libres (CLL) en muestras de suero por medio de un inmunoensayo que detecta cadenas lambda y kappa. El test puede detectar cadenas livianas en suero en concentraciones bajas. "El inmunoensayo en suero puede detectar cadenas livianas en concentraciones menores a 1 miligramo por litro. Por lo tanto, tiene una sensibilidad mucho mayor que los métodos de electroforesis. Este trabajo demostró que la medición en suero de CLL se puede usar para identificar y monitorear pacientes con mieloma de cadenas livianas. Además, la evaluación en suero de CLL es un marcador más preciso de la desaparición completa de la enfermedad en comparación con el test en orina. La conveniencia del suero como muestra y la mayor sensibilidad y precisión del inmunoensayo sugieren que el análisis de orina se va a necesitar en forma cada vez más escasa para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes", concluyeron los autores en su informe. (29)

2.1.14 PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN

Actualmente la mediana de supervivencia de los pacientes con **Mieloma Múltiple** es de 2 a 3 años. No obstante, la supervivencia varía mucho de unos enfermos a otros, ya que, mientras que algunos fallecen a los pocos meses del diagnóstico, otros gozan de una supervivencia superior a los 5 años. La insuficiencia renal es el factor individual con mayor influencia pronóstica desfavorable. Los principales factores pronósticos son: el grado de afectación del estado general, la función renal, la cifra de hemoglobina, la calcemia, la concentración sérica de albúmina y 2 - microglobulina y el índice de proliferación celular (*labe-llingindex*). No obstante, el factor pronóstico más importante es la sensibilidad de la clona mielomatosa al tratamiento citostático. (17, 26)

En todas las series la mediana de supervivencia de los pacientes que no responden al tratamiento es inferior a un año, mientras que en los que responden al tratamiento inicial la mediana es superior a 3 años. Sin embargo, los enfermos que teniendo un índice de

proliferación celular elevado presentan una rápida respuesta al tratamiento (menos de 3 meses) tienen muy mal pronóstico, ya que suelen recaer al poco tiempo. (26)

Los pacientes con **Mieloma Múltiple** pueden pasar por las distintas fases evolutivas. En general, los enfermos se diagnostican sin que se tenga evidencia de una fase previa asintomática. Sin embargo, algunos pueden pasar por un período asintomático, que puede durar años, bien sea en forma de mieloma quiescente o bien en forma de GMI. De hecho, muchos de los pacientes con mieloma quiescente acaban presentando un **Mieloma Múltiple** sintomático (véase más adelante). Esta progresión está marcada habitualmente por un aumento del componente M, aparición de dolores óseos, anemia, hipercalcemia o insuficiencia renal. Con la quimioterapia se alcanza una respuesta objetiva en alrededor del 50% de los pacientes (desaparición de la sintomatología y descenso del componente M), que persiste 1-2 años, al cabo de los cuales suele producirse una recaída. La respuesta al tratamiento es cada vez menos duradera y, si el paciente no fallece por complicaciones intercurrentes, básicamente infecciones e insuficiencia renal, suele instaurarse la denominada fase aguda terminal, caracterizada por el deterioro del estado general, pancitopenia con médula ósea hiper celular (intensa infiltración por células plasmáticas) y, en ocasiones, fiebre no infecciosa y aparición de plasmocitomas extramedulares de crecimiento rápido. En el 2-6% de los casos aparece una leucemia aguda secundaria al tratamiento alquilante. La infección constituye la causa más frecuente de muerte. (17, 26, 37)

2.1.15 TRATAMIENTO

La mayoría de los pacientes con **Mieloma Múltiple** tienen síntomas o alteraciones analíticas en el momento del diagnóstico, que indican enfermedad activa y, evidentemente, requieren tratamiento citostático. Sin embargo, los pacientes con mieloma quiescente deben controlarse sin administrar tratamiento citostático hasta que existan signos clínicos o biológicos de progresión de la enfermedad, ya que la mayoría de ellos pueden vivir mucho tiempo sin necesidad de quimioterapia. Por supuesto, tampoco debe tratarse a los individuos con GMI. (26, 37)

La valoración de la respuesta terapéutica en el **Mieloma Múltiple** es difícil, ya que casi nunca se consiguen remisiones completas (desaparición del componente M y de las

células plasmáticas de la médula ósea), lo cual condiciona que en la valoración de la respuesta se deban considerar distintos grados de remisión parcial. Una definición de respuesta objetiva, cuyo empleo se está extendiendo cada vez más, se basa en la disminución superior al 50% del componente M sérico y al 90% del componente M urinario, mantenidos sin fluctuaciones durante al menos 4 meses, y sin que exista evidencia clínica ni biológica de progresión de la enfermedad (fase de *plateau*). (26, 37)

2.1.15.1 RADIOTERAPIA

La radioterapia es útil en el tratamiento de fracturas patológicas, grandes lesiones líticas de huesos largos o vértebras y tumoraciones extraesqueléticas, como los plasmocitomas extradurales. Sin embargo, cabe señalar que los dolores óseos debidos a osteoporosis o a aplastamientos vertebrales responden mejor al tratamiento citostático que a la radioterapia. Una dosis de 30 Gy suele ser suficiente para el tratamiento de tumores extradurales y grandes osteólisis. (26)

En el mieloma solitario y el plasmocitoma extramedular, la radioterapia (40-55 Gy), asociada a la cirugía, constituye el tratamiento de elección. (26)

2.1.15.2 TRATAMIENTO CITOSTÁTICO

Antes de disponer de los agentes alquilantes, la mediana de supervivencia de los pacientes con **Mieloma Múltiple** era inferior a un año. El melfalán y la ciclofosfamida, aislados o combinados con prednisona, han sido los fármacos más empleados en el tratamiento. Una buena pauta terapéutica continúa siendo la diseñada por ALEXANIAN et al hace ya más de 20 años y que consiste en la asociación de melfalán (0,25 mg/kg. y día) y prednisona (60 mg/m² y día), referida a menudo con las siglas MP, durante 4 días, administrada cada 4-6 semanas. Si existe trombocitopenia o insuficiencia renal es mejor emplear ciclofosfamida que melfalán. (26)

La dosis de ciclofosfamida es de 800-1.000 mg/m² por vía intravenosa en una sola administración cada 3 o 4 semanas. La tasa de respuestas se sitúa alrededor del 50% y la mediana de supervivencia desde el inicio del tratamiento, entre 18 y 30 meses. Sin embargo,

la proporción de pacientes que viven 5 años o más es sólo del 10-20%. Por este motivo, en los últimos años se ha intentado mejorar los resultados obtenidos con la monoterapia alquilante empleando pautas poliquimioterapéuticas, que combinan el melfalán (M) y la ciclofosfamida (C) con prednisona (P), BCNU (B), vincristina (V) y/o adriamicina (A), dando lugar a las asociaciones conocidas como VCMP, VBAP y VCAP. Con la poliquimioterapia suele obtenerse mayor número de respuestas objetivas; sin embargo, el incremento de la tasa de respuestas no se traduce, en general, en una prolongación significativa de la supervivencia. Los pacientes que presentan una respuesta objetiva al tratamiento inicial, y que lo han recibido durante un período mínimo de 6-12 meses, entran en una fase quiescente del mieloma denominada *plateau* estable, en la que persiste una cantidad residual de células tumorales. La duración de esta fase es independiente de que se siga administrando o no- tratamiento citostático. En la actualidad se está investigando la influencia en esta fase de los modificadores de la respuesta biológica, como el interferón alfa (IFN - α). Si se confirma la eficacia de este agente en la prolongación de la fase de *plateau*, la terapéutica de primera línea del **Mieloma Múltiple** probablemente debería basarse en una pauta poliquimioterápica, seguida de tratamiento de mantenimiento con interferón alfa. En caso contrario, la clásica asociación MP continuaría siendo el tratamiento inicial de elección. Cabe destacar que existe en la actualidad una tendencia creciente al empleo de pautas terapéuticas aún más intensivas que la poliquimioterapia convencional, como es el melfalán a altas dosis. Con ello se consigue más de un 70% de respuestas objetivas y, en alrededor de un tercio de los casos, remisiones completas. Sin embargo, su duración sigue siendo corta. (26)

Además, estos tratamientos tienen el inconveniente de que entrañan una intensa mielotoxicidad, con una mortalidad por complicaciones infecciosas de hasta el 20%. Los enfermos menores de 50 años que dispongan de un hermano HLA idéntico pueden beneficiarse de un TMO alogénico. Los resultados referidos en estudios recientes con tratamiento intensivo seguido de TMO autógeno o de células madre de sangre periférica son prometedores, pero el seguimiento es todavía corto. En este sentido se están iniciando estudios aleatorizados con el objeto de investigar si el TMO autógeno es superior, o no, al tratamiento con quimioterapia convencional. (26)

En los pacientes resistentes al tratamiento alquilante se emplean pautas terapéuticas basadas en la asociación de BCNU y adriamicina o dosis elevadas de dexametasona. La tasa de respuestas al tratamiento de rescate no supera el 20- 30%. (26)

2.1.15.3 MEDIDAS COMPLEMENTARIAS

Las medidas terapéuticas generales, como el tratamiento antiálgico, el mantenimiento de un buen estado de hidratación mediante la ingesta de 2-3 L de líquido al día con objeto de facilitar la excreción de cadenas ligeras, la profilaxis de la nefropatía urática con alopurinol, así como el tratamiento correcto de las frecuentes complicaciones que presentan estos pacientes (infecciones, hipercalcemia, insuficiencia renal, fracturas) revisten enorme importancia. La eritropoyetina puede ser útil en el tratamiento de la anemia. Si existe síndrome clínico de hiperviscosidad, se efectuarán plasmaféresis. El diagnóstico de compresión medular debido a un plasmocitoma extradural es crucial y requiere tratamiento inmediato con radioterapia y dexametasona. Si a pesar de ello el déficit neurológico empeora, se efectuará una descompresión quirúrgica. (26)

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Mieloma Múltiple:

Se define como una proliferación maligna de un clon de células plasmáticas en la medula ósea que segrega una Ig monoclonal. El mieloma o componente “M” en el suero se reconoce como una banda ancha en el papel de electroforesis (todas las moléculas del clon son desde luego idénticas y tienen la misma movilidad) y como un arco anormal en la inmunolectroforesis con un “tope” producido por la proteína monoclonal. (56)

Dado que las células secretoras de Ig producen un exceso de cadenas ligeras, es de esperar que estén presentes las cadenas ligeras libres en el plasma de los pacientes con **Mieloma Múltiple** y desde luego se pueden reconocer en la orina y dar lugar a depósitos amieloides. Generalmente, se cree que las lesiones osteolíticas características “en sacabocados” en los huesos son debidas a la liberación de factores osteoclásticos por parte

de las células plasmáticas anormales en la medula. Si no se trata, la enfermedad es rápidamente progresiva. Con quimioterapia el tiempo de supervivencia mínimo medio desde el diagnóstico es de aproximadamente 5 años. (56)

Se encuentran bandas “M” en los sueros de diversos individuos que no tienen signos clínicos de mieloma: la rareza comparativa con la que el **Mieloma Múltiple** invasivo se desarrolla en esta población y el nivel constante de proteína monoclonal en el período de años sugiere la presencia de tumores benignos de las series celulares de células plasmáticas de los linfocitos. (56)

2.2.2 Mieloma indolente:

Es un término que se utiliza para describir enfermos que tienen una proteína monoclonal en el suero y/u orina, aumento de las células plasmáticas en la médula ósea pero no hay evidencia de destrucción activa de tejido óseo u otras manifestaciones de mieloma activo. La condición es muy similar a GMND (Gammapatía Monoclonal de significado Desconocido), pero con niveles más altos de proteína monoclonal y/o células plasmáticas, y, además, presentan la posibilidad de transformarse en un mieloma activo. (47)

2.2.3 Célula plasmática:

Las células plasmáticas normales son producidas por linfocitos B (células B), un tipo de glóbulo blanco que se produce en la médula ósea. Normalmente, algunas de las células B se convierten en células plasmáticas, produciendo anticuerpos diferentes para combatir cada tipo de bacteria o virus que entra al cuerpo, y así poder eliminar infecciones y enfermedades. En el mieloma, las células plasmáticas producen grandes cantidades de anticuerpos anormales que no tienen la capacidad de actuar como barrera bacteriana. Los anticuerpos anormales son las proteínas monoclonales como ya fueron descritos. Las células plasmáticas también producen una variedad de sustancias que dañan otros órganos como los riñones, nervios, etc. (47, 49)

2.2.4 Plasmocitoma:

Es un conjunto de células plasmáticas que se localizan en un sitio como por ejemplo, tejidos blandos y no se hallan diseminadas. (47)

2.2.5 Cadenas ligeras y pesadas:

La comparación de las secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas Ig del mieloma (Ig monoclonales de los tumores de células B) revela una característica llamativa, con importantes consecuencias genéticas. Ambas cadenas L y H tienen una secuencia extremadamente variable en sus extremos aminoterminales, pero la secuencia es fija a nivel carboxilterminal. Así, al comparar las secuencias de aminoácidos de muchas cadenas diferentes L *k* de mieloma (cada una con 220 aminoácidos de longitud aproximadamente), se observa que las mitades carboxilterminales son idénticas o muestran sólo diferencias mínimas, mientras que las aminoterminales difieren todas ellas. Así pues, las cadenas L poseen una *región constante*, de unos 110 aminoácidos de longitud, y una *región variable*, del mismo tamaño. La región variable aminoterminal de las cadenas H es también de unos 110 aminoácidos, pero la región constante de dichas cadenas H tiene aproximadamente de 330 a 440 aminoácidos, según las clases. (8)

Son los extremos aminoterminales de las cadenas L y H los que se unen para formar el sitio de unión con el antígeno, y la variabilidad con sus secuencias de aminoácidos proporciona la base estructural para la diversidad de sitios de unión antigénicos. La existencia de las regiones variable y constante en las moléculas de anticuerpo puede explicarse por la organización del gen de Ig a nivel del DNA. (8)

2.2.6 Monoclonal:

Es un término utilizado para describir las características de la proteína mielomatosa. Dado que el mieloma comienza a desarrollarse de una sola célula plasmática (monoclonal); el tipo de proteína producida es también monoclonal quiere decir que es de un solo tipo y no de muchos (policlonal). Es muy importante en la práctica ya que en la electroforesis de

proteínas aparece como un pico característico, que se usa generalmente en el diagnóstico y en el seguimiento del mieloma. (47)

2.2.7 Proteína M:

Es un término que se utiliza como sinónimo de proteína monoclonal, proteína mielomatosa, pico M (en la electroforesis) ya que todos se refieren a la proteína producida por la célula del mieloma. (47)

2.2.8 Mieloma tipo Ig G e Ig A:

Son los dos tipos de mieloma más comunes. Ig G e Ig A se refieren a los tipos de proteínas que son producidas por las células mielomatosas. La proteína del mieloma es una inmunoglobulina que contiene dos cadenas pesadas (por ejemplo tipo G) combinado con dos cadenas livianas que son kappa (k) o lambda (l). Si solamente se producen las cadenas livianas k o l se está en presencia de una enfermedad de cadenas livianas. Los términos pesada o liviana se refieren al tamaño o peso molecular de la proteína, o sea: que la proteína pesada tiene una cadena de aminoácidos más larga y más pesada que la liviana. Como las moléculas de las proteínas livianas son muy pequeñas, filtran más fácilmente por el riñón y se encuentran en la orina como proteinuria de Bence - Jones. Las proteínas del mieloma son muy diferentes de las proteínas de nuestros alimentos que necesariamente son parte de la dieta diaria y son constituyentes de los tejidos normales, músculos, piel y otros órganos. Por eso un aumento de las proteínas mielomatosas no quiere decir que se deba adoptar una dieta baja en proteínas. (47)

2.2.9 Mieloma tipo Ig D e Ig E:

Son dos tipos de mieloma similares a Ig G e Ig A, pero ocurren con menor frecuencia. (47)

2.2.10 Bence Jones:

El nombre identifica a las proteínas encontradas en la orina de los enfermos con mieloma. Las proteínas del mieloma o proteínas M tienen cadenas livianas (lambda o kappa).

La cantidad excretada en la orina se mide en 24 horas; normalmente una cantidad mínima de proteínas (<0.1g por 24 hrs.) puede estar presente en la orina, pero esto es albúmina y no Bence Jones. La presencia de proteína de Bence Jones siempre es anormal. (47)

2.2.11 Hipercalcemia en el Mieloma:

Es una elevación del calcio en la sangre. Es muy común en el paciente portador de mieloma. Generalmente, es el resultado de la destrucción del tejido óseo con liberación del calcio en el torrente sanguíneo. Muchas veces está asociado con una reducción de la función renal, ya que el calcio puede ser un tóxico renal; por esta razón la hipercalcemia es una emergencia médica. Se trata con hiperhidratación parenteral combinado con drogas para reducir la destrucción de los huesos (pamidronato, calcitonina) además del tratamiento específico para el mieloma. (47)

2.2.12 Electroforesis:

Es un análisis de laboratorio en el cual el suero del paciente es expuesto a un campo eléctrico para separar las distintas fracciones de proteínas. La movilidad está determinada por el tamaño y la carga eléctrica de la misma. Esta técnica permite determinar tanto la cantidad de la proteína monoclonal presente, como también identificar su composición. La electroforesis se utiliza tanto en el momento del diagnóstico como para el seguimiento de la enfermedad. (47)

2.2.13 Inmunofijación:

Es un método inmunológico que se usa para identificar a las proteínas monoclonales (tipo IgG, IgA, Kappa o Lambda). Es una técnica de coloración muy sensible que identifica exactamente el tipo de cadenas (pesada o liviana) de las proteínas monoclonales. (47)

2.2.14 Alogeneico:

Término utilizado para describir el tipo de trasplante en el cual la fuente de las células progenitoras hematopoyéticas es de un familiar con HLA idéntico. HLA se refiere a los antígenos celulares utilizados para confirmar la histocompatibilidad con el dador. (47)

2.2.15 Autólogo:

Término utilizado para describir el tipo de trasplante en el cual la fuente de las células progenitoras hematopoyéticas de la sangre periférica o de la médula ósea pertenece al mismo paciente. (47)

2.2.16 Interferón:

Es una citoquina (u hormona) que el cuerpo produce normalmente en respuesta a una infección viral. Se fabrica artificialmente por ingeniería genética. El interferón sintético se administra como tratamiento para el mieloma y se usa primordialmente para el mantenimiento (en la fase de meseta). (47)

2.2.17 Terapia de inducción:

Así se llama al tratamiento inicial que se administra para lograr una remisión en un paciente recientemente diagnosticado con **Mieloma Múltiple**. (47)

2.2.18 Enfermedad estable:

Es un término que se utiliza para definir pacientes que tienen una respuesta positiva al tratamiento, pero la reducción de la proteína monoclonal es menor del 50%. El tener una enfermedad estable no es indeseable, siempre que el mieloma esté estabilizado y no progrese. Una remisión aceptable (quiere decir meses o años en remisión) no es necesariamente proporcional al porcentaje de la respuesta. Un paciente con un mieloma estable puede llegar a vivir muchos años. (47)

2.2.19 Nefelometría:

Es el método más usado en el laboratorio para determinar la cantidad de proteínas M en la sangre (ver inmunofijación que identifica el tipo de proteína M). El método se diferencia de la electroforesis ya que se mide la intensidad de difusión de la luz producida por una proteína mielomatosas. La nefelometría es un método práctico automatizado y eficiente para medir los niveles de las proteínas M una vez que fueron identificadas por el método electroforético; Sin embargo, para asegurar la exactitud de los datos, es necesario chequearlo con la electroforesis. (47)

III. ANTECEDENTES

En la actualidad se van realizando diferentes trabajos de investigación, en los cuales se hacen estudios de distintas pruebas de laboratorio que permiten orientar con mayor certeza el diagnóstico en pacientes con **Mieloma Múltiple**.

De todos estos trabajos realizados, se tienen aquellos que por un lado determinaron los componentes monoclonales tanto en orina como en suero; basados principalmente en el descubrimiento de un componente monoclonal (producto de las inmunoglobulinas de un clon de las células plasmáticas) en suero y/u orina como una parte importante en la evaluación de laboratorio, en pacientes con enfermedades proliferativas de células plasmáticas de linfocitos B. Usualmente, cantidades grandes de componentes monoclonales están presentes en el suero de pacientes con **Mieloma Múltiple** o macroglobulinemia de Waldenström. Cantidades pequeñas de componentes monoclonales en suero pueden ser significativos en enfermedades de cadenas livianas, linfomas o leucemias de linfocitos B, amiloide AL (amiloidosis asociada con cadenas livianas de inmunoglobulinas), neuropatías, o la predisposición del desarrollo de malignidad de células del plasma / linfocitos B con desordenes proliferativos en pacientes que no presentan una evidencia clínica común (gammapatía monoclonal de significado indeterminado-MGIS). Acerca de un 25% de los individuos que entran dentro de la categoría MGIS desarrollan mieloma o desordenes proliferativos relacionados con linfocitos B después de 20 a 35 años. En ellos debería hacerse un seguimiento anual prudente, pacientes que relativamente presentan componentes pequeños monoclonales en suero. (35)

En otro trabajo realizado, se evaluó un nuevo gel de agarosa de sulfato dodecil de sodio utilizado en electroforesis (SDS-AGE), para los análisis de una proteína urinaria en pacientes con **Mieloma Múltiple** (MM; número de pacientes = 47, entre una edad comprendida de 62 ± 2 años, promedio \pm SE). Los mismos tenían una proteinuria anormal (promedio = 1872 ± 360 mg/24hrs) esto se presentaba en una 95% de las muestras; 75% de los pacientes tenían algún signo de una disfunción renal (glomerular y/o tubular) de acuerdo con el patrón SDS-AGE. Una banda sugería proteinuria de Bence Jones (PBJ) que fue

detectada en 40 pacientes versus 33, por una corrida rutinaria de electroforesis en agarosa. (64)

Por inmunofijación se identificó la PBJ en 38 pacientes; calculándose una sensibilidad del SDS-AGE para PBJ de un 97%. Se estableció una correlación excelente ($P < 0,0001$) que se obtuvo con una corrida de rutina de electroforesis en agarosa ($r = 0,994$) y por inmunonefelometría ($r = 0,963$) para la cuantificación de las cadenas livianas. La electroforesis en agarosa de sulfato dodecil de sodio determina con facilidad la evaluación de una disfunción renal y muestra que tiene una alta sensibilidad para la detección de la proteína de Bence Jones. En un laboratorio especializado, esto es utilizado para un seguimiento progresivo en pacientes con **Mieloma Múltiple** a través de la semicuantificación de la proteína de Bence Jones. (64)

En el departamento de patología de la universidad de Louisville, se incrementó la sensibilidad de la técnica de inmunofijación por electroforesis (IFE), la cual estaba por encima de los anteriores métodos de electroforesis, los mismos han renovado el interés en el estudio de cadenas livianas libres. En este trabajo, se discutieron los problemas asociados con la identificación monoclonal de cadenas livianas libres (Proteínas de Bence Jones) en orina. Por otra parte examinando la naturaleza de las muestras analizadas y los ensayos empleados, discutieron la fisiología, bioquímica, genética y las propiedades inmunológicas de estas moléculas. Directamente las mediciones de los radios kappa / lambda serían útilmente empleadas; pero todos los métodos comerciales no disponen actualmente de una suficiente sensibilidad. La inmunofijación por electroforesis (IFE) es un método de preferencia por su sensibilidad y por la facilidad que presenta en su interpretación. Sin embargo, se presentan dificultades asociadas con la interpretación en los patrones de IFE para muestras de orina, debido a que la técnica no incluye un mecanismo intrínseco por tratamiento con ditiotritol del anticuerpo-antígeno y por la ausencia de una considerable sensibilidad en su cuantificación. Estos problemas en la interpretación, están siendo discutidos. (44)

Se determinó en el servicio de Hematología del Hospital de Montpellier, que la sangre periférica de pacientes con **Mieloma Múltiple (MM)** contiene un número pequeño de células plasmáticas relacionadas a células tumorales de la médula ósea por las inmunoglobulinas citoplasmáticas (Ig), en estas células la expresión del antígeno de membrana y/o otros genes

están reestructurados; pero la producción monoclonal de Ig (IgM) en circulación no ha sido reportada. Se utiliza el ensayo llamado ELISPOT, donde las Ig de células secretadas (Ig-CSs) se detectaron en sangre de 28 pacientes con **MM** y 5 pacientes con macroglobulinemia de Waldenström (**MW**). El número de células que espontáneamente producen el isotipo Ig es similar al de IgM en suero y ello es importante para las Ig-CSs. Los pacientes con **MM** presentan un exceso en la circulación de cadenas pesadas α o γ Ig-CSs (0,38%), con cadenas livianas κ o λ (0,48%) comparado con el número de células secretadas de otras pesadas (0,02%) y los isotipos de cadenas livianas (0,03%). En pacientes con **MW** solo presentan números altos de células secretadas del isotipo de cadena pesada α (0,66%). Las Ig sintetizadas *in vitro* son caracterizadas como monoclonal, y la Ig M secretada en sangre periférica es similar a la observada por Ig-CSs de la activación policlonal de células B *in vivo*. El número de estas células monoclonales tiene un significado en cuanto a su incremento en pacientes en un estado avanzado de **MM** (I/II vs. III, $P < 0,001$) y su correlación en suero de la concentración de la beta-2 microglobulina ($r = 0,69$; $P < 0,0003$). El número de Ig-CSs M en pacientes con **MM** puede ser un marcador útil para evaluar la progresión en el **Mieloma Múltiple**. (16)

De acuerdo con la bibliografía revisada se tienen datos importantes acerca de todas las pruebas de laboratorio que se realizan en las universidades de Medicina de Michigan, Tennessee y Louisville (USA) y Farmacia de Dakar (Senegal), las mismas están relacionadas con la innovación de pruebas más modernas, aprovechando el avance de la tecnología; lo cual permite dar una nueva visión a las pruebas empleadas para el diagnóstico del **Mieloma Múltiple**. (21, 36)

Por otro lado, se llevaron a cabo diferentes estudios en pacientes con gammopatías monoclonales, en los cuales se realizaron distintas pruebas de laboratorio; los mismos permitieron dar una orientación más precisa al diagnóstico. Es así, que se incluye como una prueba de rutina la cuantificación de cadenas livianas kappa y lambda tanto en orina como en suero, donde también se establecieron rangos de referencia, los mismos se expresan en concentraciones (microgramos/ml). Los cuales son 1,2 microgramos/ml en suero y 4,9 microgramos/ml en orina. (7)

También se han realizado estudios importantes en cuanto a la obtención de anticuerpos monoclonales, en ratones inmunizados con cadenas livianas humanas kappa y lambda. Este estudio principalmente analizó la relación de los valores obtenidos por las cadenas livianas libres tanto kappa y lambda en suero y orina, para establecer diferencias. (1, 7, 36)

Dentro de estos importantes estudios, se ha determinado que los anticuerpos monoclonales de ratones K-1-21; solo tienen especificidad por las cadenas libres, en relación con las cadenas kappa que pueden ser utilizadas para el desarrollo de la inhibición del inmunoensayo enzimático y así cuantificar las cadenas kappa libres en suero y orina. Se ha establecido que en suero y orina se encuentran valores promedio de 1,2 y 4,9 microgramos/ml normalmente, utilizando este sistema de ensayo. La importancia de una rápida cuantificación de cadenas livianas en suero se ha demostrado en un paciente, con la ausencia de cadenas kappa libres en la orina a pesar de que presentaba niveles elevados de cadenas kappa en suero; mientras que la caída significativa de los niveles de las cadenas kappa libres en suero ha sido observada en los pacientes que siguen el tratamiento con quimioterapia. (36)

Por otro lado, en el departamento de Medicina de la universidad de Knoxville (USA); se ha estudiado que la medición exacta de las concentraciones de las cadenas livianas libres en suero y orina tienen un significado único para establecer la síntesis de inmunoglobulinas por células B en salud y enfermedad, tal información es importante para el diagnóstico e implicaciones terapéuticas. Se han obtenido anticuerpos monoclonales con diferencias entre cadenas libres y unidas a cadenas pesadas, a partir de inmunizaciones a ratones con cadenas livianas humanas kappa y lambda de tipo monoclonal (proteína de Bence Jones). Esta alta especificidad de anticuerpos monoclonales fue medida por ELISA, la concentración de cadenas livianas libres se determinó en el suero de 22 individuos normales y en orina de 16 de estos sujetos. Los resultados obtenidos establecieron un promedio en suero de cadenas livianas libres kappa y lambda en una concentración de 16,6 +/- 6,1 microgramos/ml y 33,8 +/- 14,8 microgramos/ml, respectivamente. En contraste, los valores de cadenas livianas libres kappa y lambda en orina fueron 2,96 +/- 1,84 microgramos/ml y 1,07 +/- 0,69 microgramos/ml, respectivamente. En cada caso estudiado, el radio en suero kappa: lambda

es consistentemente menor al de la orina (los valores promedios, en suero son aproximadamente 1:2 y en orina aproximadamente 3:1) (1)

Esta cuantificación también es útil para el diagnóstico de otras enfermedades de células plasmáticas, como la amiloidosis. En tal caso, se determinó que el radio de cadenas kappa y lambda en orina dio un valor mayor al radio en suero. Otras 6 muestras de orina de un grupo de pacientes con proteinuria de Bence Jones, también exhibieron radios kappa / lambda con varias diferencias, sobre todo en las muestras correspondientes al suero. En otros 7 pacientes con proteinuria generalizada sin relación con discrasia de células plasmáticas, los radios kappa / lambda fueron similares tanto en suero y orina. Es por ello, que la diferencia entre el radio kappa / lambda de suero y orina puede ser expresado como un índice de kappa / lambda. (45)

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PREGUNTA PROBLÉMICA

*¿El desarrollo de un método inmunoenzimático para la dosificación de cadenas ligeras kappa y lambda podrá contribuir al diagnóstico y seguimiento de los casos de **Mieloma Múltiple**?*

Actualmente todas las enfermedades relacionadas con el cáncer, son de mucha importancia en nuestro medio desde el punto de vista de la Salud Pública; tal es el caso del **Mieloma Múltiple** enfermedad que puede afectar a personas jóvenes, adultas o personas de la tercera edad.

Es de nuestro conocimiento que los diferentes tipos de cáncer no tienen una cura definitiva y en la mayoría de los casos, el diagnóstico se lo realiza después de que el cáncer ha avanzado; donde las perspectivas de vida se acortan para los pacientes, y no hay mucho que hacer por ellos. Es así, que nosotros los bioquímicos, cumplimos un papel importante dentro del área de salud, por que podemos aportar en la implementación, realización y elaboración de diferentes pruebas de diagnóstico que puedan contribuir por un lado, a dar diversas opciones a los médicos en la elección de dichas pruebas; y por otro lado, exista la posibilidad de realizar un diagnóstico temprano; lo cual beneficiaría exclusivamente a los pacientes. De esta forma, al hacer la elección de tales pruebas de laboratorio lo imprescindible es que dichas pruebas tengan la mayor sensibilidad posible y sobre todo un costo accesible para los pacientes que cuentan con bajos recursos económicos.

Las pruebas de laboratorio con las que se cuenta actualmente para establecer el diagnóstico del **Mieloma Múltiple**, son pocas y rutinarias. Además, es importante destacar que los médicos no cuentan con pruebas específicas y determinantes, que les permita establecer y confirmar su diagnóstico. Las pruebas que solicitan simplemente van de apoyo a la parte clínica establecida.

Considerando que el **Mieloma Múltiple** es una enfermedad de importancia en nuestro medio, debemos tomar en cuenta que las pruebas de laboratorio son de igual manera; determinantes e importantes, porque permitirán confirmar su diagnóstico; conjuntamente con los datos clínicos, y además poder ofrecer la posibilidad de hacer un seguimiento en el tratamiento de los pacientes.

Tomando en cuenta que en nuestro país se van incrementando cada vez más los trabajos de investigación en salud, con el presente trabajo se pretende de alguna manera contribuir al diagnóstico y a la evaluación del tratamiento de los casos de **Mieloma Múltiple**, implementando una nueva técnica con la cuantificación de cadenas kappa y lambda.

V. JUSTIFICACIÓN

Dentro de una de las principales enfermedades se encuentra el cáncer, que se constituye en un problema de tipo mundial y que también afecta a nuestro país, así; es el caso del **Mieloma Múltiple** que es uno de los tantos tipos de cáncer; y es de nuestro interés poder ofrecer métodos y técnicas de laboratorio que apoyen al diagnóstico a tiempo y así como en el seguimiento de la quimioterapia que se aplica en estos pacientes.

De acuerdo a la bibliografía revisada, a parte de las pruebas de rutina, se incluye la cuantificación de cadenas livianas kappa y lambda que son características del **Mieloma Múltiple**; se han establecido inclusive valores de referencia para kappa y lambda tanto en orina como en suero. Los mismos han aportado de una manera significativa al diagnóstico del **Mieloma Múltiple**. (1, 7, 21, 36, 45)

El presente trabajo pretende llevar a cabo la estandarización de una técnica inmunoenzimática que determine la presencia de cadenas livianas kappa y lambda, apoyando al diagnóstico juntamente con todas las demás pruebas rutinarias y las manifestaciones clínicas, permitiendo además evaluar el tratamiento establecido en cada paciente.

Es un trabajo que servirá para todas las personas dirigidas al área de la Salud que deseen hacer un diagnóstico, por un lado, más concreto y certero y, por otro lado, determinar un diagnóstico temprano; así también contribuirá de gran manera a evaluar el tratamiento de quimioterapia que se sigue rutinariamente a los pacientes con **Mieloma Múltiple**.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Contribuir al diagnóstico y seguimiento de pacientes con **Mieloma Múltiple** a través del desarrollo de una técnica inmunoenzimática que pueda evaluar la presencia de cadenas livianas kappa y lambda.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener cadenas kappa (κ) y lambda (λ) libres a partir de inmunoglobulinas séricas, por medio de la estandarización de la técnica de reducción de puentes disulfuro.
- Estandarizar el método inmunoenzimático para la dosificación de las cadenas livianas kappa y lambda en sueros normales y patológicos.

VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo dentro del grupo de los diferentes tipos de investigación, corresponde a un estudio: **SERIE DE CASOS**; que es un estudio epidemiológico, descriptivo, que se limita a la simple identificación y descripción de un conjunto de casos clínicos que han aparecido en un intervalo de tiempo. (20)

7.1 POBLACIÓN

La población en estudio estuvo conformada por dos grupos, el grupo de las personas aparentemente sanas y el grupo de pacientes con **Mieloma Múltiple**.

7.2 LUGAR

El trabajo de investigación fue realizado en el Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), solamente en la Unidad de Hematología del Hospital Obrero perteneciente a la Caja Nacional de Salud; se tomaron las muestras de sangre y se recolectaron las muestras de orina de 24 horas de los pacientes diagnosticados con **Mieloma Múltiple**.

- PERSONAS APARENTEMENTE SANAS:

Se incluyeron cinco personas aparentemente sanas entre 25 y 29 años, personal de SELADIS (internos y residentes); las mismas fueron elegidas en función a la disponibilidad de contar en cualquier momento con las muestras de suero, debido a que esas muestras nos sirvieron como controles para la estandarización de las pruebas en estudio. Si bien la selección de personas aparentemente sanas no tienen criterios de comparación con los pacientes de **Mieloma Múltiple** como ser edad, o que pertenezcan al mismo hospital; lo importante era contar con un grupo que nos permita tener un grupo de referencia o grupo de control, y de esta manera confrontar los resultados entre ambos grupos estudiados.

- **PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE:**

Se incluyeron a cinco pacientes con diagnóstico establecido de **Mieloma Múltiple**, de los cuales; cuatro estaban en tratamiento desde la fecha de su diagnóstico con quimioterapia y uno de ellos con diagnóstico recientemente establecido (no recibió ningún tratamiento hasta el momento de la toma de muestra). Las edades oscilaron entre 39 y 73 años (con una media de 58 años). Estos pacientes pertenecían a la Caja Nacional de Salud (Unidad de Hematología del Hospital Obrero), las muestras de suero y orina fueron recolectadas en forma individual y en diferentes fechas; debido a que los pacientes eran ambulatorios y solamente se los podía encontrar en el hospital cuando les tocaba su sesión de quimioterapia; razón por la cual es importante destacar que no fue posible conseguir que uno de los pacientes con **Mieloma Múltiple** recolectara la muestra de orina de 24 horas. Para ello se contó con la colaboración del Dr. Abel Berrios.

Finalmente para realizar el análisis de los resultados y elaborar un estudio mas completo y comparativo, se elaboró un cuestionario de preguntas que incluían los datos más importantes de los pacientes, resultados de las primeras pruebas de laboratorio, tiempo de tratamiento y otras; lamentablemente, solo fue posible conseguir cuatro historias clínicas de los pacientes; las mismas eran incompletas y los datos conseguidos fueron sobre todo de tipo informativo. (*ver anexos*)

7.3 MATERIAL Y METODOS

Primeramente haremos una síntesis de toda la metodología empleada en el presente trabajo:

7.3.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

Como el grupo control, es decir; el grupo de **PERSONAS APARENTEMENTE SANAS** estaba conformado por el personal de SELADIS (internos y residentes), ello facilitaba la posibilidad de contar en cualquier momento con las muestras de suero; razón por la cual, siempre se trabajó con muestras de suero fresco para cada determinación. Inicialmente, una vez que se tomaron las muestras de suero se procedió a realizar la determinación de proteínas y a partir de ello se procedió a la estandarización y optimización de la reducción de cadenas pesadas de inmunoglobulinas totales, una vez logrado este objetivo se procedió a la estandarización del método ensayo inmunoenzimático tipo sándwich.

Es importante destacar que se trabajó con dos muestras de orina de 24 horas, solamente en la determinación del método ensayo inmunoenzimático tipo sándwich como control negativo; y simplemente con fines comparativos, las mismas correspondían a muestras de orina de 24 horas de pacientes del SELADIS con resultados normales en los exámenes solicitados, debido a que no fue posible poder contar con la orina de 24 horas del grupo de Personas Aparentemente Sanas.

En el caso de los **PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE** la situación fue diferente, debido a que los pacientes eran ambulatorios; se recolectó una sola vez tanto, las muestras de suero como la de orina de 24 horas. Esta recolección se la realizó en diferentes fechas, es importante destacar que uno de los pacientes no pudo lograr recolectar la muestra de orina de 24 horas, razón por la cual se trabajó con solo cuatro muestras de orina; como así también, dos de los pacientes recolectaron la orina de 24 horas después de haberles tomado la muestra de sangre.

Una vez que se lograba obtener el suero de cada paciente se procedió inmediatamente a la determinación de proteínas totales y posterior a ello, a la reducción de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas totales. Luego se hizo la identificación correspondiente, con nombre y fecha y se llevó a 4° C, hasta lograr reunir las cinco muestras de los pacientes con **Mieloma Múltiple**.

En cambio, una vez que se contaba con las muestras de orina de 24 horas se procesaba inmediatamente las pruebas de: proteinuria y la determinación de proteínas de Bence Jones. Y otra parte de la orina fue conservada a 4° C hasta la valoración por el método ensayo inmunoenzimático tipo sándwich y por la técnica de inmunodifusión radial.

Cuando se logró reunir las cinco muestras de los pacientes con **Mieloma Múltiple** se hizo la valoración por el método ensayo inmunoenzimático tipo sándwich con las muestras de suero, orina y los sueros de los Pacientes Aparentemente Sanos; finalmente se valoraron los sueros de ambos grupos por la técnica de inmunodifusión radial.

7.3.2 REDUCCIÓN DE PUENTES DISULFURO

Para la reducción de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas y con ello lograr la obtención de cadenas ligeras kappa y lambda libres, se estandarizó y se optimizó la técnica de reducción de puentes disulfuro, con la evaluación de diferentes parámetros; los mismos se resumen de la siguiente manera:

7.3.2.1 Diálisis de las muestras de suero

Se llevó a cabo el procedimiento según lo recomendado por la referencia bibliográfica, (32) con algunas variaciones; entre ellas: la dialización se realizó por membranas de diálisis, se trabajó con el suero total, no solo con la Ig G como en la técnica, variamos los tiempos de incubación, no se empleo la bomba al vacío, ni el burbujeo con nitrógeno como sugiere la referencia bibliográfica (32) y en lugar de utilizar el 2 – mercaptoetanol se utilizó el Ditiotritol en diferentes concentraciones. Primeramente se dializaron los sueros contra tampón Tris – HCl 0,15 M pH 8,2 (*ver anexos*) y se dejó en el agitador sobre hielo aproximadamente 3 horas, posteriormente se llevó a 4° C por 18 – 24 horas. La finalidad de la diálisis es de alcalinizar el suero que contiene todas las inmunoglobulinas y como las mismas tienen un pH neutro y al estar sumergidas en el tampón, hay un intercambio de iones y a medida que se van mezclando este intercambio es mayor.

7.3.2.2 Determinación de la concentración aproximada de Ditiotritol:

Una vez que se obtuvieron los sueros dializados, se llevaron a una concentración de proteínas de 30 mg/ml, cuya concentración se sugiere en la técnica de referencia. (32)

Para ajustar la concentración de proteínas a 30 mg/ml, las unidades de las proteínas totales nos dieron valores en g/dl, los mismos fueron llevados a mg/ml; este valor se lo dividió entre 30; por que al llegar a esta concentración estandarizada y establecida, las muestras de suero no se gelifican. Con este resultado se hizo la dilución respectiva con cada muestra de suero, para lo cual como diluyente se utilizó solución salina al 0,85 % (ver anexos).

Se utilizaron diferentes concentraciones de Ditiotritol; se hicieron dos variaciones importantes del reactivo, primero para llegar a una concentración de 0,2 M de Ditiotritol se hicieron los cálculos respectivos y se lo utilizó en forma sólida. Por otro lado, se preparó el Ditiotritol en una concentración de 2 M y a partir del mismo se hicieron diluciones 1/10 y 1/100 con agua destilada, para así llegar a una concentración de 0,2 M y 0,02 M respectivamente y se dejó una hora a temperatura ambiente. Se hizo una evaluación de las tres diferentes concentraciones del Ditiotritol, el mismo en menor proporción es oxidado por el oxígeno atmosférico; y la ventaja de utilizarlo es que es menos susceptible a la oxidación.

7.3.2.3 Utilización de Iodoacetamida y Trietanolamida

Después de la hora de incubación, se llegó a una concentración final de 0,75 M con Iodoacetamida, para lo cual se hicieron los cálculos respectivos; este procedimiento se lo realizó sobre hielo.

También se dejó una hora a temperatura ambiente, al medir el pH de las soluciones, las mismas tenían un pH ácido; para ello en esta prueba, también se hizo el ajuste del pH utilizándose Trietanolamida, en este ajuste se determinó que era conveniente utilizar Trietanolamida en forma diluida; porque al utilizarlo por vez primera en forma pura, hizo que el pH de las muestras preparadas se alcalinizaran demasiado. Para ello, el Trietanolamida fue diluido en solución salina 1/5 y se fue añadiendo poco a poco a las muestras preparadas

y en cada paso se fue midiendo con papel indicador hasta lograr el pH próximo a 8 y así evitar una mayor alcalinización.

Una vez que se logró el ajuste del pH deseado, se centrifugaron las muestras a 3000 r.p.m. por 15 minutos y se separó el sobrenadante, el mismo se guardó hasta su procesamiento.

El objetivo de utilizar Iodoacetamida y Trietanolamida, era para prevenir la reasociación de los puentes disulfuro intercatenarios reducidos, a través de la alquilación de los grupos sulhidrilos liberados.

7.3.2.4 Determinación de la cinética de reacción:

Se llevó a cabo el procedimiento anterior pero en este caso se varió tanto la concentración del Ditiotritol como los tiempos de incubación. Es decir, se utilizaron tres concentraciones, la primera fue de 0,2 M a partir del Ditiotritol sólido. Luego se llegó a 0,02 M y 0,002 M a partir del Ditiotritol 0,2 M.

Se determinó la concentración del Ditiotritol, porque inicialmente se utilizó la concentración que la técnica de referencia (32) recomendaba (0,02 M), pero al no obtener los resultados esperados se decidió variar la concentración; lo que permitió estandarizar nuestra técnica con diferentes concentraciones.

Este procedimiento se hizo por duplicado. Una de las baterías se incubó exactamente una hora a temperatura ambiente. Mientras que la otra se incubó por dos horas.

Los demás pasos fueron los mismos que en la anterior determinación.

Finalmente una vez estandarizada la técnica, se procedió a la reducción de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas totales que se hallaban presentes en las

diez muestras de suero; tanto de los pacientes aparentemente sanos como de aquellos con **Mieloma Múltiple**.

7.3.2.5 Inmunoelectroforesis

Los sueros reducidos se sometieron a la técnica de inmunoelectroforesis, se utilizaron anticuerpos o antisueros anti cadenas kappa y anti lambda, así como también anti Ig G.

Preparamos agarosa (de alta electroendósmosis) al 1% (*ver anexos*), se añadió azida de sodio y con esta agarosa se prepararon las placas correspondientes, el objetivo de añadir la azida de sodio es para evitar que las placas se contaminen y poder conservarlas en forma indefinida.

Una vez que se hicieron los orificios en la placa con sacabocados (*ver Pág.72*), se sembraron las muestras en un volumen de 5 µl. Posterior a ello se llevaron las placas a la cámara electroforética que contenía el Tampón Michaelis dilución 1/3, (*ver anexos*) a 200 voltios y 7 miliamperajes por cada placa, que son los condicionantes que debe tener la cámara electroforética para llevar a cabo la corrida. El tiempo de corrida fue de cuatro horas aproximadamente.

Luego del tiempo de corrida se hizo la horadación central y se sembró 100 µl. de los antisueros: anti cadenas kappa, anti lambda y anti Ig G. Se dejaron las placas en cámara húmeda por 48 horas, para después observar la formación de bandas de precipitado correspondientes a anti kappa, anti lambda y anti Ig G.

7.3.2.6 Tinción de las placas de inmunoelectroforesis

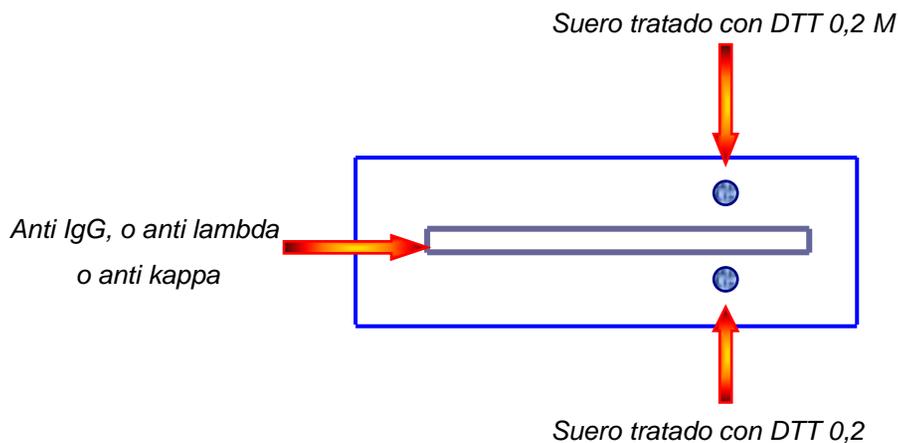
Una vez observadas las placas, se procedió a colorearlas con la tinción Rojo Ponceau para lo cual; primero fueron lavadas con solución salina (*ver anexos*) cada ocho horas por cuatro veces, repitiéndose el procedimiento pero esta vez con agua destilada; es decir, también cada ocho horas por cuatro veces.

Después del último lavado se colocaron las placas en la estufa para su deshidratación, por 24 horas y a 37 °C. Finalmente se colorearon las placas de acuerdo al siguiente protocolo:

- Rojo Ponceau al 1% por un tiempo de 10 min. (*ver anexos*)
- Ácido acético al 1% por 10 min. (*ver anexos*)
- Ácido acético al 2% por 10 min. (*ver anexos*)

Luego se dejaron secar las placas al medio ambiente. Se las guardó a temperatura ambiente. A continuación se observa un modelo de placa y los lugares donde se sembraron las muestras:

MODELO DE UNA PLACA



7.3.3 MÉTODO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO SÁNDWICH

FUNDAMENTO

La técnica ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un

inmunoensayo ideal: es versátil, rápido, exacto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. (68)

Uno de los tipos de ensayo ELISA, es el ELISA “sándwich” (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. (68)

Es de nuestro conocimiento que para la estandarización de una nueva técnica se requiere de muchas pruebas, en las que se necesita variar la concentración de los reactivos, hacer o no diluciones de las muestras tanto de suero como de orina, tiempos de incubación, veces de lavados, etc.; y una vez logrado el objetivo se procede a optimizar la técnica ya estandarizada.

TÉCNICA

Como primera etapa, se procedió a la estandarización de la técnica de ELISA tipo sándwich con todas las características anteriormente mencionadas; para tal estandarización se utilizaron los sueros dializados de los pacientes aparentemente sanos y las muestras de orina de 24 horas, que nos sirvió tanto como control negativo y a la vez como controles de calidad, para el control positivo se empleó un suero de un paciente diagnosticado con **Mieloma Múltiple** (que no corresponde al grupo de pacientes en estudio); para ver la reproducibilidad de los resultados se hicieron correr las muestras por duplicado.

Una vez que se logró la estandarización de la prueba se procedió a la adecuación y evaluación del método EIA sándwich con las muestras de pacientes con **Mieloma Múltiple**

en dos corridas diferentes, para lo cual se utilizaron nuevamente los sueros de personas aparentemente sanas y los sueros de pacientes diagnosticados con **Mieloma Múltiple**.

Se dispensaron 100 μ l. de la dilución de cada anticuerpo monoclonal (anticuerpo anti kappa y anticuerpo anti lambda) de acuerdo a la recomendación del fabricante (19) 1/100 con tampón Carbonato – Bicarbonato (*ver anexos*) y se incubó a 37 °C por 30 min.

Se lavó una vez con PBS 0,1 M pH 7,2 (*ver anexos*) con un volumen de 250 μ l. por pozo.

Se dispensaron 200 μ l. de leche descremada al 5% en PBS (*ver anexos*) y se dejó a temperatura ambiente por una hora, se añade la leche descremada con el objetivo de saturar todos los sitios reactivos, debido a que las placas al tener tanta afinidad por las proteínas entre ellas las inmunoglobulinas, las mismas podrían quedarse adheridas en forma inespecífica. Para evitar ello, se utiliza una proteína que no tenga que ver con el sistema con el que se trabaja; es ahí donde actúa la proteína de la leche que es la caseína, esta proteína se pega a la placa y de esta forma no interfiere con el sistema.

Se lavó cuatro veces con PBS – Tween (*ver anexos*) con un volumen de 250 μ l por pozo, con el objetivo de eliminar todo el resto de proteínas que no lograron adherirse a la placa.

Se hizo una dilución $\frac{1}{2}$ de las muestras de suero con solución salina. Mientras que las muestras de orina de 24 horas, se las utilizó sin diluir. Dispensamos 50 μ l de cada suero diluido y de las muestras de orina en los pozos respectivos, y se incubó a 37 °C por 30 min.

Se lavó cuatro veces con 250 μ l de PBS – Tween y se dispense 100 μ l del conjugado, previamente diluido a título 1/20.000 con PBS – Tween, (el mismo corresponde a anti Lambda free light chains y anti Kappa free light chains respectivamente) y se incubó a 37 °C por 30 min. Se repitieron los lavados de la misma forma que en el paso anterior, luego se preparó el sustrato (*ver anexos*) y se dispensaron 100 μ l del mismo. A los 10 min. se paró la reacción, añadiendo 50 μ l de ácido sulfúrico 2 N. Finalmente se hizo la lectura en el lector de ELISA usando filtro de 492 nm y como filtro diferencial 600 nm, el filtro diferencial se utiliza

para descartar el efecto de la placa, sus irregularidades y el hecho que también absorbe cierta cantidad de luz.

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN

Los rangos normales se establecen por el índice entre kappa / lambda, para obtener tal índice; dividimos el promedio de las absorbancias que obtuvimos de kappa y de lambda, ello determinó nuestro índice tanto en suero como en orina de 24 horas.

Ejemplo:

Promedio kappa: 0,613

Promedio Lambda: 0,634

$0,613 \div 0,634 = 1,0$ que corresponde a índice k/λ

Los resultados obtenidos de los índices, fueron interpretados comparándolos con los valores de referencia estandarizados y establecidos de acuerdo a la bibliografía revisada; y son los siguientes:

Cadenas ligeras kappa / lambda: 0,61 – 1,37 (en suero)

Cadenas ligeras kappa / lambda: 0,61 – 1,37 (en orina)

Nivel Alto: En un tipo especial de mieloma: de cadenas ligeras (12)

7.3.4 TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)

FUNDAMENTO

El propósito de la inmunodifusión es detectar la reacción de antígeno y anticuerpo, mediante la reacción de precipitación. La inmunodifusión radial (IDR) se basa en el principio de que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de antígeno colocado en un pozo cortado en la placa de agar con anticuerpo, y el anillo de precipitación que resulta; la formación de complejos antígeno-anticuerpo en un medio semisólido como agar, depende de los electrolitos del amortiguador, el pH y la temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo. (61)

La IDR es una técnica ya estandarizada y nos sirvió como técnica de referencia para la comparación de los resultados obtenidos por el método ensayo inmunoenzimático sándwich, técnica estandarizada en el presente trabajo.

TÉCNICA

Para realizar este procedimiento se dejaron a temperatura ambiente las placas conteniendo el antisuero kappa y lambda, luego se hicieron las diluciones respectivas de los calibradores y los controles de acuerdo a instrucciones del kit comercial.

Se sembraron las muestras de suero tanto de las personas aparentemente sanas como los que fueron diagnosticados con **Mieloma Múltiple**, las muestras de orina de 24 horas; los calibradores y los controles. El volumen de siembra para los sueros, calibradores y controles fue de 5 μ l, las muestras de orina se sembraron en un volumen de 20 μ l. y se dejó a temperatura ambiente por 48 horas.

Después de este tiempo, se procedió a hacer las lecturas respectivas de todos los halos formados. Y con ello se construyó la recta y en la misma se interpolaron las muestras de suero y orina.

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN

Como la técnica de inmunodifusión radial (IDR) se la realizó con un kit comercial, los resultados obtenidos; simplemente fueron interpretados al ser comparados con los valores de referencia del kit y son los siguientes:

Cadenas livianas Kappa: 3 130 – 13 243 mg/l

Cadenas livianas Lambda: 3 512 – 6 625 mg/l

7.3.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó la determinación de proteínas totales en suero por el método de Biuret, para ello se tomó 1,5 ml del reactivo de Biuret más 25 μ l de la muestra de suero; para el

blanco reactivo en lugar de suero se colocó agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min., y finalmente se efectuó la lectura a 550 nm en espectrofotómetro frente al blanco reactivo. Para obtener los resultados, se utilizó como factor 5 g/dl; que nos permite el cálculo de las proteínas totales en unidades de g/dl, este factor fue determinado en la Unidad de Bioquímica Clínica. (Los resultados fueron obtenidos por la Unidad de Bioquímica Clínica de SELADIS).

7.3.6 DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA

Se determinó la presencia de proteínas en orina de 24 horas por dos métodos, el primer método fue el de Rojo Ponceau y el segundo el de Pirogalol.

Para el método de Rojo Ponceau se colocó 1 ml del reactivo de Rojo Ponceau más 200 µl de la muestra de orina de 24 horas, se mezcló y se llevó a centrifugar 15 min. a 3.500 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y solo se trabajó con el pelet (donde se encuentran las proteínas); el mismo se lo diluyó con hidróxido de sodio 0,2 N.

Se realizó la lectura frente a agua destilada a 550 nm. Los resultados finales fueron calculados con el factor 80 y con el volumen total de orina de 24 horas. Este factor permite hacer los cálculos correspondientes para obtener los resultados en g/24 horas, el mismo fue determinado en la Unidad de Bioquímica Clínica de SELADIS.

Para el método de Pirogalol se añadió 3 ml del reactivo Pirogalol, que fue preincubado a 37 °C por 3 min. Posteriormente se añadieron 50 µl de la muestra de orina de 24 horas, para el blanco reactivo en lugar de orina se colocó agua destilada y se llevo a incubar por 10 min. Finalmente se llevó a leer al espectrofotómetro frente blanco reactivo a 550 nm. Los resultados se obtuvieron con el factor 100 y con el volumen total de orina de 24 horas, cuyo factor al igual que el anterior permite obtener resultados en g/24 horas. (Los resultados fueron obtenidos por la Unidad de Bioquímica Clínica de SELADIS)

CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN

Los resultados obtenidos para la determinación de proteinuria fueron comparados con el rango de referencia: 0,02 – 0,07 g/24 hrs.

7.3.7 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE BENGE JONES

Se consideró también importante la determinación de la presencia de las proteínas de Bence Jones en orina de 24 horas, debido a que dicha prueba se constituye en una prueba de rutina en el diagnóstico de pacientes con **Mieloma Múltiple** y además como su nombre lo indica es capaz de identificar a las proteínas del mieloma o proteínas M (conocidas como proteínas de Bence Jones) que tienen cadenas livianas lambda o kappa encontradas en la orina de 24 horas. (47)

Para ello, centrifugamos 10 ml de la orina de 24 horas a 2000 r.p.m. por 10 minutos y se tomó 5 ml del sobrenadante más 0,5 ml de ácido sulfasalícílico al 5%. (*ver anexos*); cuando se observó la presencia de precipitado en la muestra (turbidez), se consideró inicialmente positivo y se continuó con los pasos sucesivos; en caso contrario se consideró a la muestra negativa, para Proteínas de Bence Jones.

En caso positivo se confirmó, tomando 5 ml del sobrenadante más 0,5 ml de Ácido Tricloro Acético (ATA) al 50% (*ver anexos*), centrifugamos 10 minutos a 2500 r.p.m. Se desechó el sobrenadante y se secaron las paredes del tubo con papel filtro. El precipitado obtenido fue resuspendido y se disolvió con 3 gotas de NH_4OH 27%, se absorbió la suspensión con papel filtro y secamos en la estufa a 37 °C durante 10 minutos. Una vez que estuvo seco el papel filtro se lo colocó en un tubo, al cual se le agregó 1,5 ml de solución amortiguadora de acetatos (*ver anexos*) y colocamos el tubo a baño maría 80 – 90 °C por 10 minutos y sacamos el papel con varilla de vidrio. Sé centrífugo a 5 minutos a 2000 r.p.m.

La solución anterior centrifugada corresponde al eluido de acetatos, que podrían contener las proteínas de Bence Jones, para ello se añadieron 3 gotas de ácido sulfasalícílico al 20%. (*ver anexos*) y se observó turbidez o la presencia de un precipitado, y ello confirmaría que la prueba es positiva.

VIII. RESULTADOS

8.1 REDUCCIÓN DE PUENTES DISULFURO

La estandarización de la técnica de reducción de puentes disulfuro, requirió de la evaluación de diferentes pruebas en las que se variaron las concentraciones de los reactivos, los modos de empleo de los reactivos (sólidos o diluidos), los tiempos de incubación, etc.; hasta obtener la reducción de cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas y con ello lograr la separación y obtención de las cadenas ligeras kappa y lambda libres.

8.1.1 Evaluación de los parámetros establecidos para la reducción de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas:

Se determinó que la concentración ideal para la reducción de cadenas livianas kappa y lambda era de 0,2 M de Ditiotritol (basándose en el resultado de la inmunoelectroforesis I.E.F.), los tiempos de incubación no afectaban mucho y se estableció que el mejor tiempo era de una hora. También se observó que lo más conveniente era utilizar el reactivo Trietanolamida diluido, para el ajuste del pH.

8.1.2 Análisis de los resultados de la reducción de puentes disulfuro por el método de inmunoelectroforésis (I.E.F.):

Para cada prueba de estandarización de la técnica de reducción de cadenas livianas tanto kappa y lambda se procedió a la técnica de inmunoelectroforesis, que nos permitía confirmar si realmente habíamos logrado la separación de las cadenas; para lo cual se hicieron correr las muestras por este método. Una vez concluida la corrida se procedió a teñir todas las placas, para lo cual empleamos la tinción de Rojo Ponceau.

En la **determinación de la concentración aproximada de Ditiotritol** para la concentración 0,2 M, se observó la formación de bandas de precipitado correspondientes a anti Ig G, anti lambda y kappa; las que se hicieron más evidentes luego de la tinción con

Rojo Ponceau. (Fig. 1a) En cambio, para las concentraciones de Ditiotritol 0,02 M (Fig. 1b) y 0,002 M (Fig. 1c); se observó la presencia de las bandas de precipitado para anti Ig G; sin embargo, las bandas para anti lambda y anti kappa no pudieron ser observadas; aún después de la tinción con Rojo Ponceau.

Figura 1a

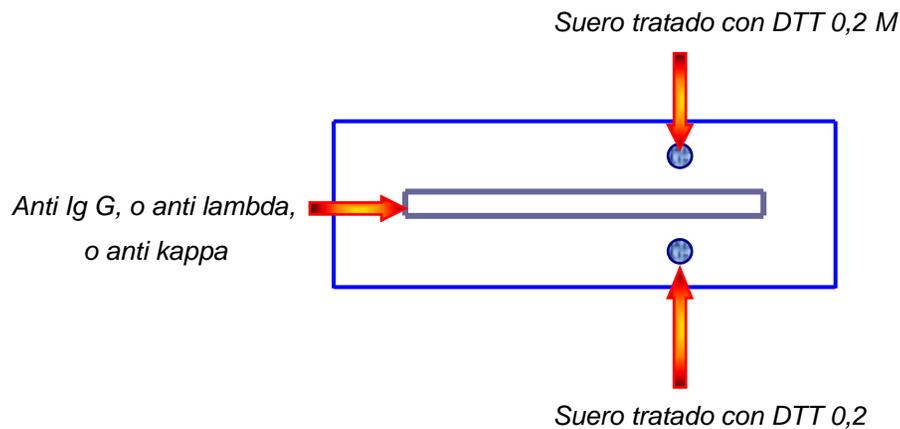


Figura 1b

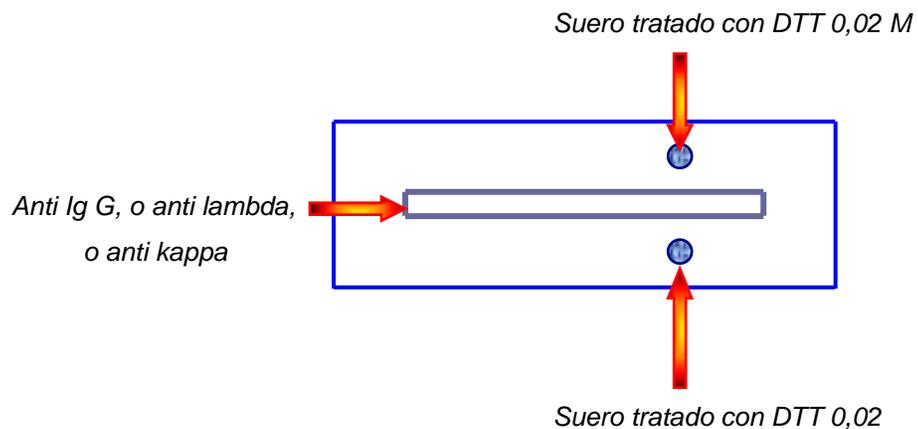


Figura 1c

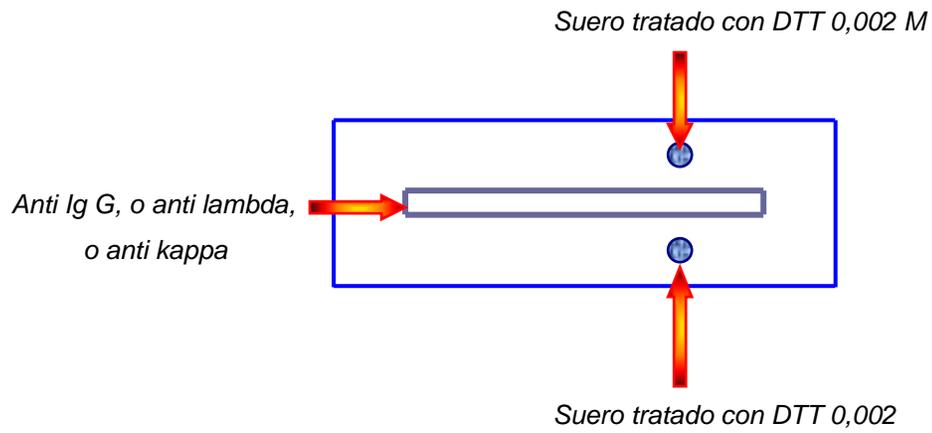
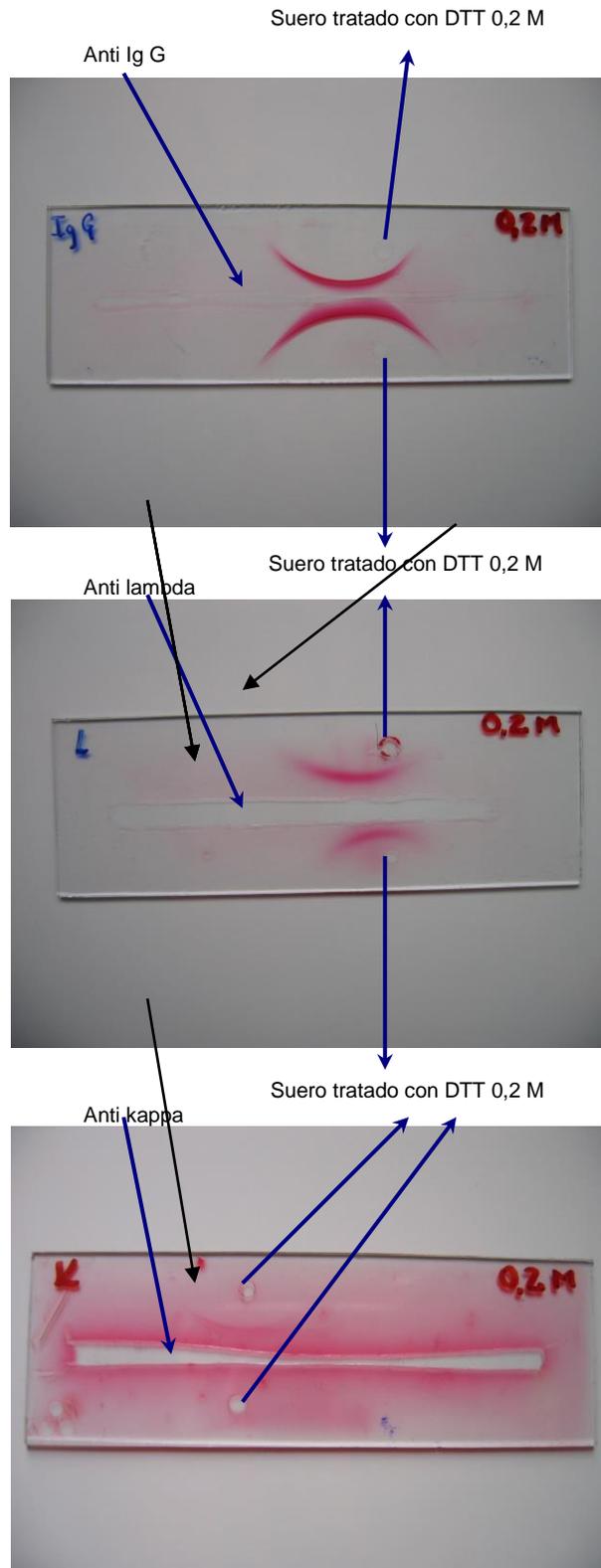
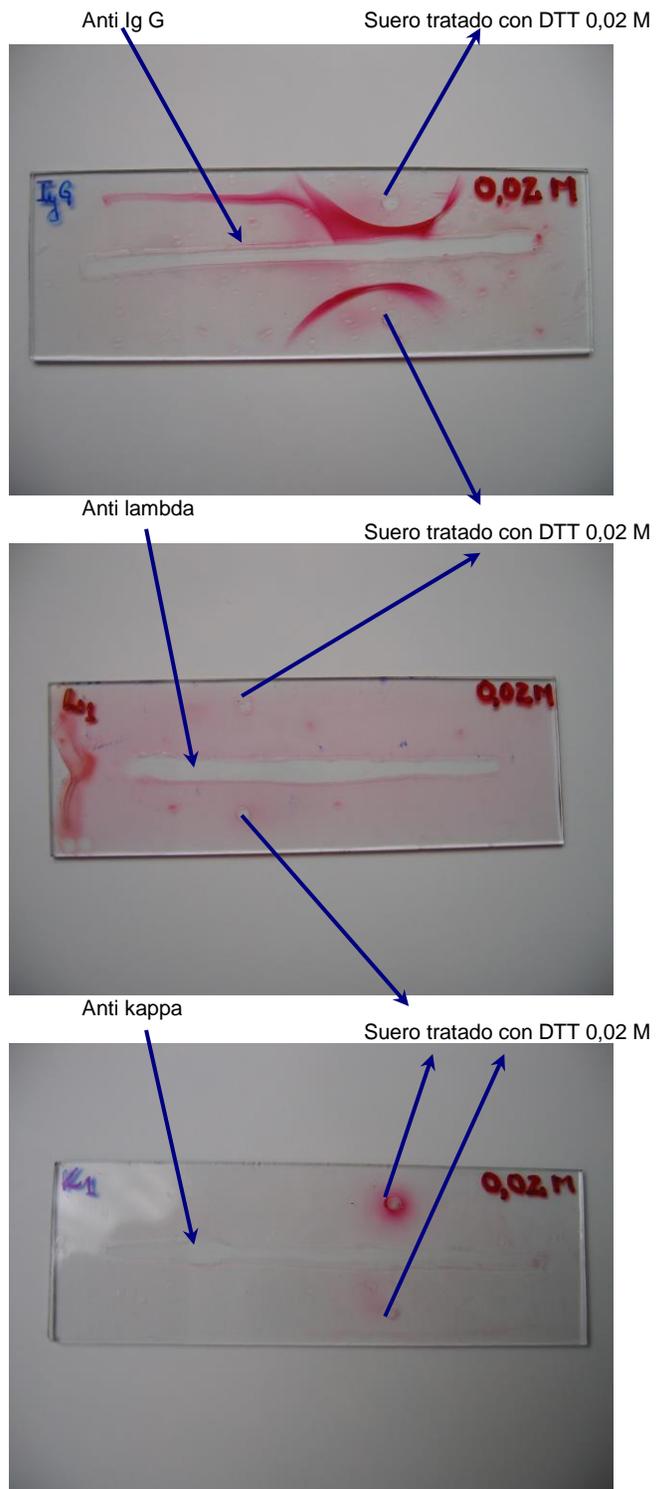


Figura 1a



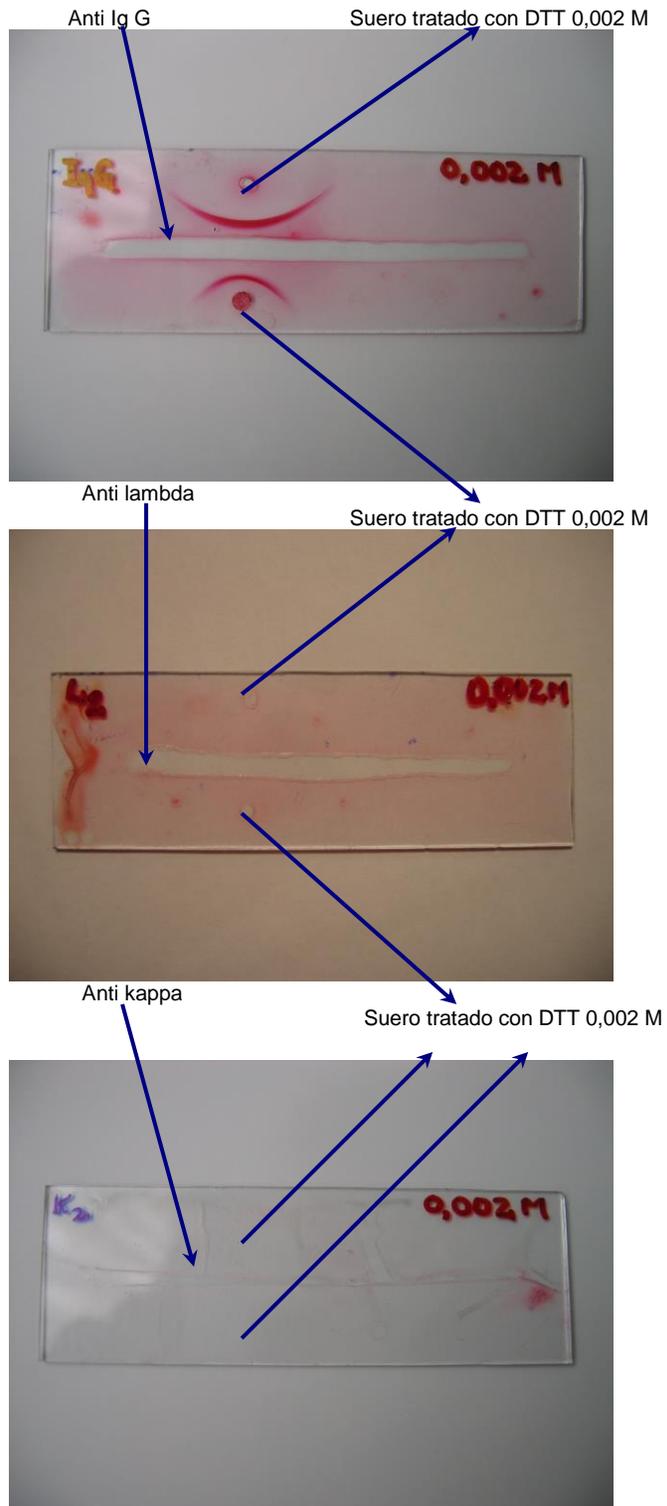
A una concentración de DTT 0,2 M, se observan las bandas de precipitado para anti Ig G, anti lambda y anti kappa.

Figura 1b



Al trabajar con la concentración de DTT 0,02 M, solamente se observó la formación de las bandas de precipitación para anti Ig G; mientras que no se formaron bandas de precipitado para anti lambda y anti kappa, como se observa en las fotografías.

Figura 1c



De la misma forma, al trabajar con la concentración de DTT 0,002 M, solamente se observó la formación de las bandas de precipitación para anti Ig G; mientras que no se formaron bandas de precipitado para anti lambda y anti kappa, como se observa en las fotografías.

Una vez que se hicieron correr las muestras por inmunolectroforesis para la **determinación de la cinética de reacción**, se observó que no existe ninguna diferencia importante en cuanto a los tiempos de incubación; por ello se determinó que lo conveniente sería trabajar con un tiempo de incubación de 1 hora.

8.2 **MÉTODO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO SÁNDWICH**

En la primera etapa de estandarización del método ensayo inmunoenzimático sándwich, se observó que no se presentaban cambios importantes de los resultados al variar diluciones, tiempos de incubación, veces de lavados y otros; de esta forma fue mucho más fácil su estandarización. Al estandarizar la técnica con las muestras de sueros dializados y las muestras de orina de 24 horas de los pacientes aparentemente sanos conjuntamente con el suero dializado del control positivo, se pudo observar la reproducibilidad de las absorbancias en cada corrida que se realizaba.

Al ser analizadas las muestras de suero y las cuatro muestras de orina de 24 horas de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, como así también las muestras de suero y orina de los pacientes aparentemente sanos; por el método ensayo inmunoenzimático sándwich, en las dos corridas evaluadas, se observó nuevamente la reproducibilidad de las absorbancias, y con tales datos se hizo la evaluación correspondiente.

El análisis por el método inmunoensayo enzimático de los pacientes aparentemente sanos determinó que los rangos para la relación kappa / lambda fueron de **0,8** como el valor más bajo y **1,3** como el valor más alto, estos resultados son algo similares a los obtenidos en otros estudios; donde el índice k/λ lo denominan también radio kappa / lambda y en suero fue aproximadamente 1:2, es decir; 0,5 (1)

Las muestras de suero de los pacientes con **Mieloma Múltiple** registraron valores también dentro de los rangos normales o rangos de referencia, como se indican a continuación; a excepción de un caso de un paciente que dio un valor por encima del rango normal: Índice kappa y lambda k/λ 2,5.

Con relación a las muestras de orina de 24 horas, los resultados obtenidos para ambos grupos; se pudo registrar valores normales y no tuvieron mayor significado. Es así, que en el siguiente cuadro se hace un resumen de dichos resultados. (Gráfico 1 y 2)

RANGOS NORMALES O RANGOS DE REFERENCIA:

Cadenas ligeras kappa/lambda: 0,61 – 1,37 (en suero)

Cadenas ligeras kappa/lambda: 0,61 – 1,37 (en orina)

Nivel Alto: En un tipo especial de mieloma: de cadenas ligeras (12)

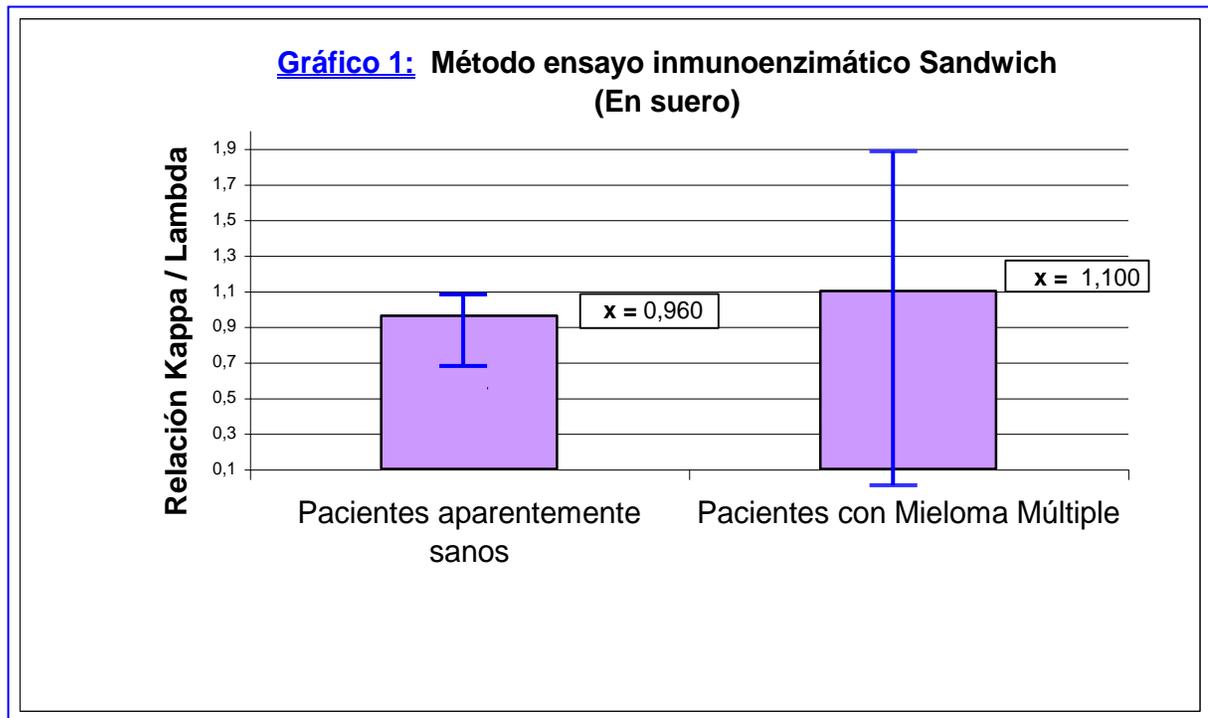


Gráfico 1: En todos los casos el índice kappa : lambda resultó normal, a excepción del caso de un paciente con M.M., que dio un índice kappa : lambda de 2,5.

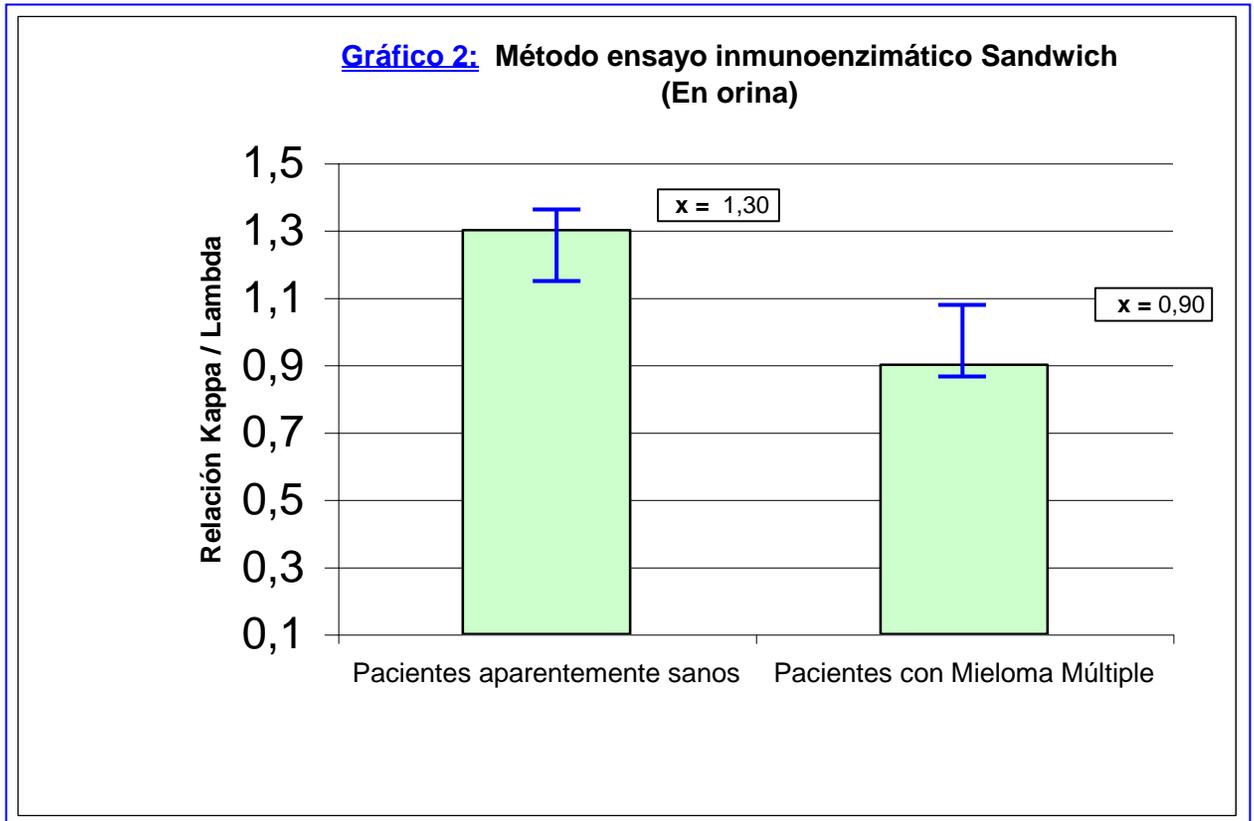


Gráfico 2: Los resultados del índice kappa : lambda en orina en ambos grupos de estudio, dieron valores dentro de los rangos normales establecidos.

8.3 TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)

La técnica de inmunodifusión radial (IDR) se basó en el uso de un kit comercial, la misma determina en forma independiente las cadenas livianas kappa y lambda. Las muestras de suero y orina fueron analizadas por este método.

En la determinación de cadenas livianas kappa en suero por IDR se observó que en las personas aparentemente sanas el promedio dio un valor de **5 656 mg/l (0,5656 g/dl)**, mientras que el promedio de los pacientes con **Mieloma Múltiple** fue de **23 872 mg/l (2,3872**

g/dl). Para la determinación de cadenas livianas kappa en orina de 24 horas, en el caso de las personas aparentemente sanas no se obtuvieron resultados, debido a la ausencia de los halos que se forman en el gel de agarosa. Mientras que el promedio de los valores obtenidos para cadenas livianas kappa en orina de 24 horas de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, fue de **1 930 mg/l (0,193 g/dl)**.

Con relación a las cadenas livianas lambda en suero analizadas por IDR, se pudo determinar que el promedio de las personas aparentemente sanas fue de **3 356 mg/l (0,3356 g/dl)**, y de los pacientes con **Mieloma Múltiple** el promedio obtenido fue de **3 076 mg/l (0,3076 g/dl)**; en cuanto a los resultados de la IDR en las muestras de orina de 24 horas, en el grupo de las personas aparentemente sanas no se logró observar los halos correspondientes, ello indicaría una ausencia de dichas cadenas. En los pacientes con **Mieloma Múltiple** los valores obtenidos fueron bajos por lo que no pudieron ser graficados debido a que no entraban en la recta. (Gráfico 3, 4, 5 y 6)

RANGOS NORMALES O RANGOS DE REFERENCIA: (Establecidos por el kit comercial)

Cadenas livianas Kappa: 3 130 – 13 243 mg/l

Cadenas livianas Lambda: 3 512 – 6 625 mg/l

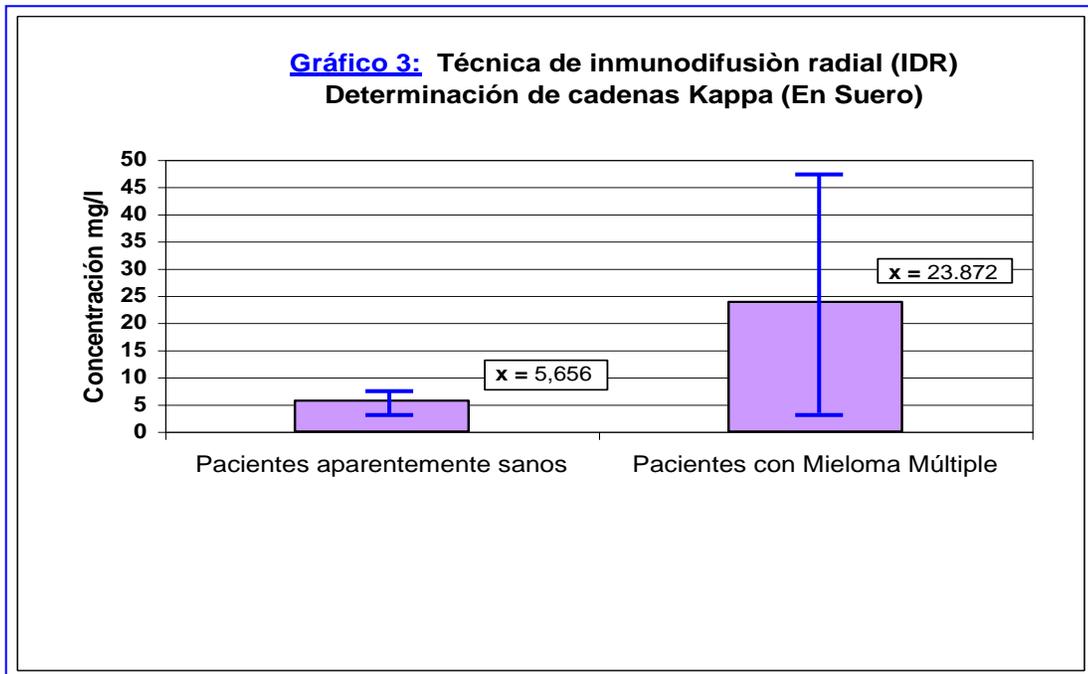


Gráfico 3: Los valores de cadenas kappa en suero por IDR en dos pacientes con M.M., dieron valores por encima del rango normal, (**51.800 mg/l**).

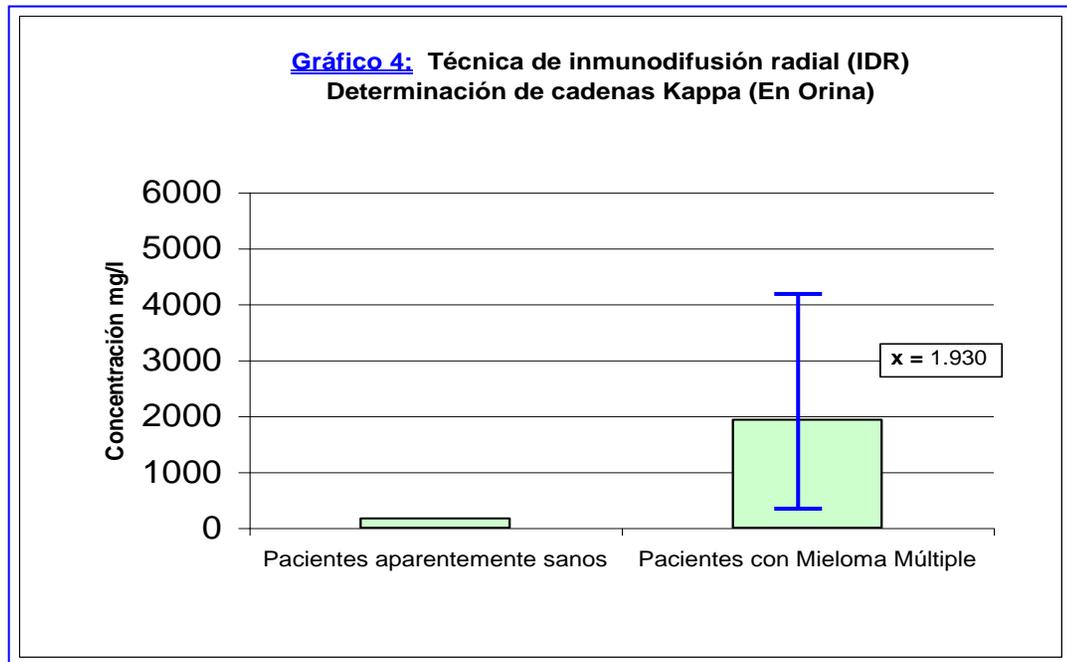


Gráfico 4: Los valores de cadenas kappa en orina por IDR dieron valores por muy debajo del rango normal.

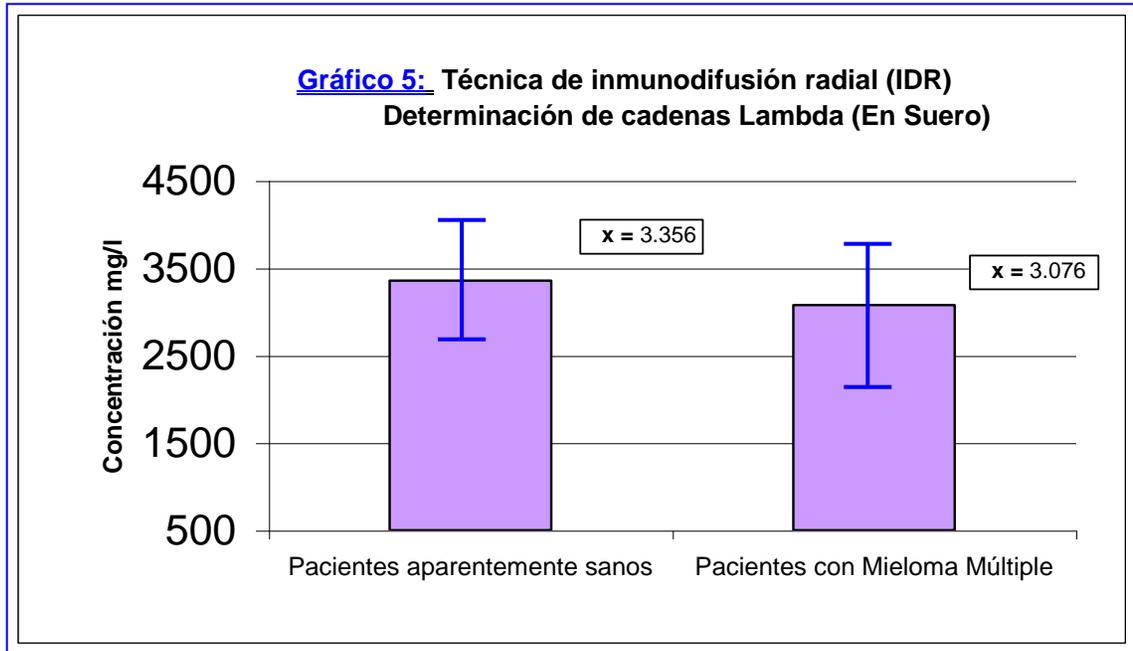


Gráfico 5: La inmunodifusión radial para cadenas lambda en ambos grupos de estudio, dieron valores por debajo del rango normal.

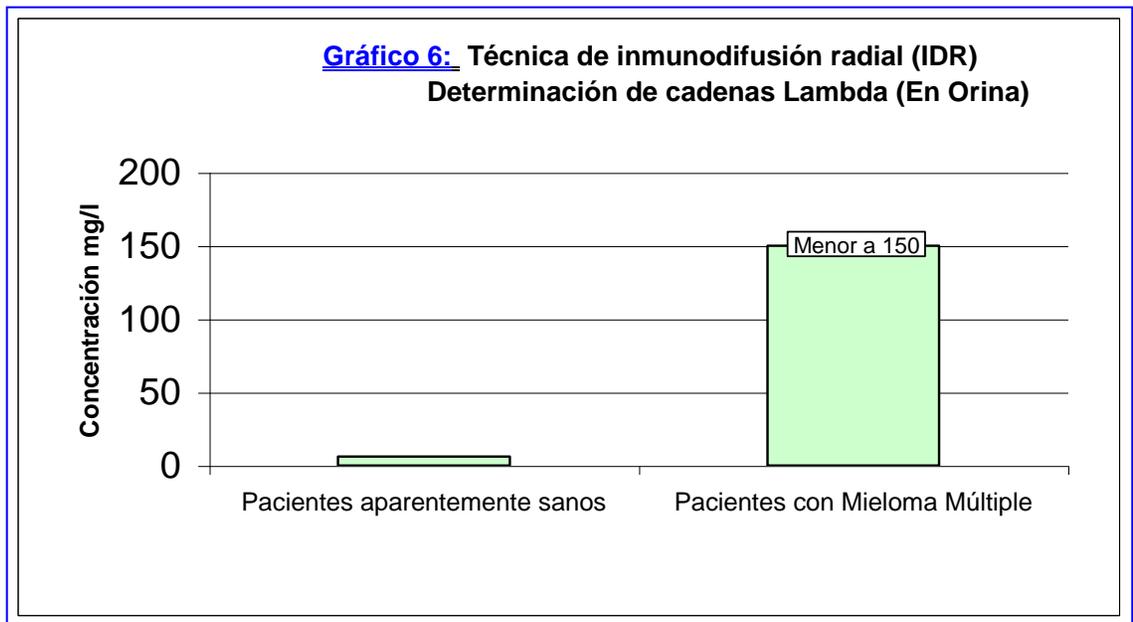


Gráfico 6: Los valores de cadenas lambda en orina para ambos grupos de estudio, dieron resultados extremadamente bajos.

8.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinaron las proteínas en suero por el método de Biuret, de las personas aparentemente sanas y de los pacientes con **Mieloma Múltiple**. El valor más bajo de todas las determinaciones fue de 3,8 g/dl que correspondía al de un paciente con **Mieloma Múltiple**, mientras que el valor más alto fue de 9,4 g/dl, resultado que correspondía al de una persona aparentemente sana. El promedio de las muestras de las personas aparentemente sanas fue de **8,16 g/dl (8.160 mg/dl)**, y el valor promedio en la determinación de proteínas de los pacientes con **Mieloma Múltiple** fue de **6,56 g/dl (6.560 mg/dl)**. (Gráfico 7)

RANGO DE REFERENCIA:

6,2 – 8,5 g/dl

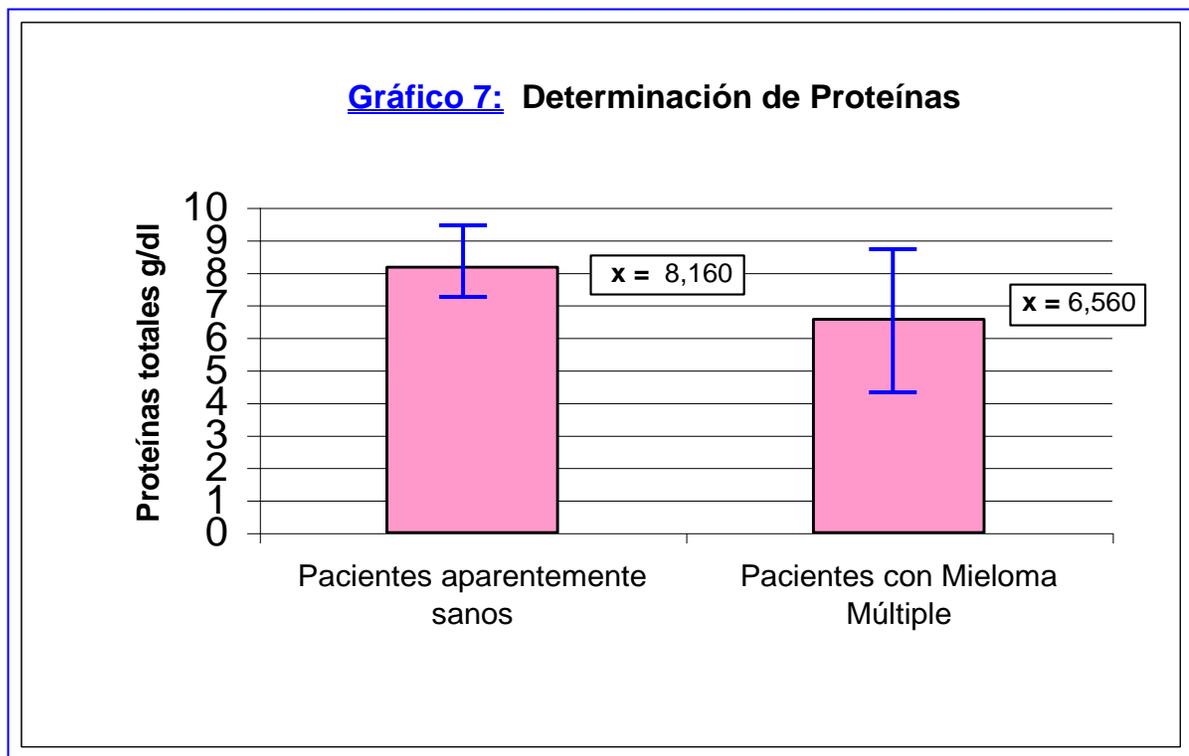


Gráfico 7: Los resultados de las proteínas de las personas aparentemente sanas se encontraban dentro de los rangos de referencia, a excepción de dos muestras, una con un valor elevado de (9,4 g/dl) y el otro ligeramente elevado de (8,8 g/dl). En cambio, de los pacientes con (M.M.) uno dio un valor muy bajo de (3,8 g/dl) y el otro ligeramente elevado de (8,8 g/dl).

8.5 DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA

La determinación de proteinuria, se realizó en cuatro muestras de orina de 24 horas de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, el valor más bajo fue de 0,071 g/24 horas y los valores más altos fueron de 0,107 y 0,263 g/24 horas; la media de estas determinaciones fue de **0,161 g/24 horas**. Los resultados obtenidos, fueron comparados con los valores establecidos en un trabajo de tesis anterior. (15) (Gráfico 8)

RANGO DE REFERENCIA: 0,02 – 0,07 g/24 hrs.

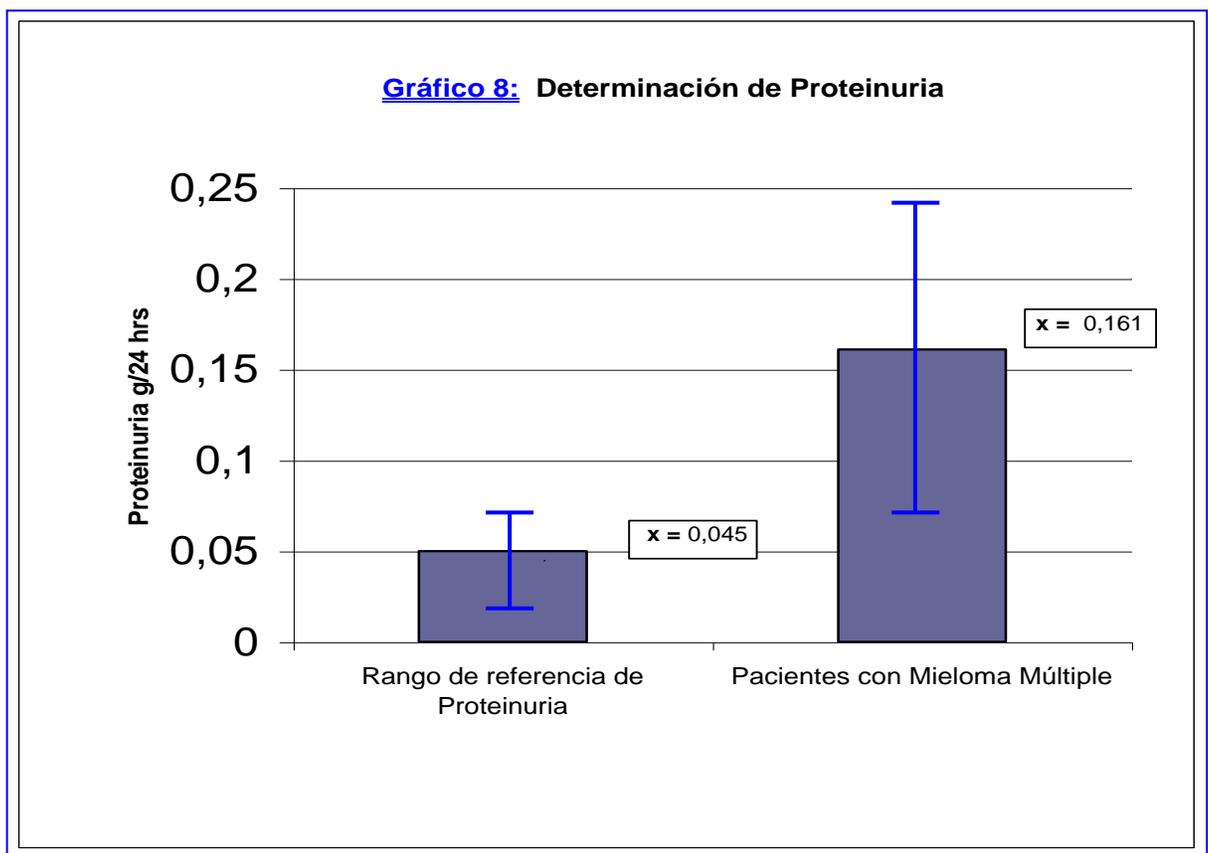


Gráfico 8: En la prueba de proteinuria, se observó que el promedio de los valores de pacientes con Mieloma Múltiple es mayor al rango de referencia obtenido en nuestro medio. (15)

8.6 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE BENCE JONES

La prueba de proteínas de Bence Jones se realizó con las cuatro muestras de orina de 24 horas de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, de las cuatro; tres de ellas dieron resultado negativo y una dio resultado positivo.

<u>PACIENTES</u>	<u>PROTEÍNAS DE BENCE JONES</u>
Paciente N° 1	Negativo
Paciente N° 2	Negativo
Paciente N° 3	Negativo
Paciente N° 4	Positivo

IX. DISCUSIÓN

En aquellos pacientes con sospecha de una discrasia de células plasmáticas (por ejemplo, el **Mieloma Múltiple**, macroglobulinemia de Waldenstrom, gammapatía monoclonal de significado desconocido, se utilizan diferentes métodos de diagnóstico; principalmente la electroforesis de inmunofijación, nefelometría, EIA, mediciones de cadenas ligeras libres en suero y otros. (5, 6)

La Guía Clínica de ARUP'S (Associated Regional and University Pathologists), indica que las proteínas monoclonales se encuentran en suero y/u orina en un 99% de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, sin embargo; un número pequeño de pacientes puede también excretar en su orina cadenas livianas libres kappa o lambda, lo que se conoce como proteinuria de Bence Jones. En pacientes que solo presentan la enfermedad de cadenas livianas, la proteinuria de Bence Jones puede ser detectable. (5, 6)

Sin embargo, la proteinuria de cadenas livianas no siempre es sinónimo de un proceso maligno; puesto que algunos pacientes MGUS (Gammapatía Monoclonal de Significado Desconocido) solo excretan pequeñas cantidades. La proteína total urinaria y las cadenas livianas de Bence Jones son determinadas nefelométricamente con adición de albúmina. Pero estos valores de proteínas totales son diferentes cuando se determinan por métodos químicos, y los mismos se caracterizan por tener una baja estimación para las cadenas livianas urinarias. (5)

En esta guía se menciona, también, el uso de la electroforesis por inmunofijación (IFE), es un método muy sensible que permite detectar, confirmar y caracterizar la presencia de gammapatías monoclonales identificadas por una electroforesis de proteínas en suero (SPEP) en pacientes sospechosos de discrasias de células plasmáticas; (Ej.: **Mieloma Múltiple**, macroglobulinemia Waldenstrom's, MGUS, enfermedad de cadenas livianas o pesadas) u otros procesos linfoproliferativos. La IFE es particularmente utilizada en identificar proteínas monoclonales menores, componentes de cadenas livianas de proteínas monoclonales, y las bandas ocultas observadas en SPEP. (5, 6)

Es así, que para la determinación de cadenas livianas libres kappa y lambda en orina (Proteína de Bence Jones), los métodos que se emplean son: electroforesis por inmunofijación cuantitativa y nefelometría. La información obtenida se correlaciona con los resultados obtenidos en la electroforesis de proteínas en suero, la cuantificación de inmunoglobulinas y la información clínica; con todos estos datos se interpretan los resultados que incluye: 1) evaluación del test como positivo o negativo por la presencia de proteínas Bence Jones y 2) determinación de la proteína de Bence Jones específica. (5)

En los Servicios de Hematología y Patología del Hospital Santojanni de la ciudad de Buenos Aires, se ha presentado un caso de **Mieloma Múltiple** estadio II A y cáncer de mama con antecedentes de cáncer de endometrio 10 años antes, en una paciente de sexo femenino de 77 años de edad con hipertensión arterial, diabetes tipo II, internada por astenia y dolores óseos. (57)

Lo cual llevó a analizar que la ocurrencia de múltiples enfermedades neoplásicas es más frecuente en pacientes mayores de 65 años de edad, lo que llamó la atención fue la combinación poco frecuente de cáncer de mama y **Mieloma Múltiple** simultáneos, y una tercera neoplasia, cáncer de endometrio. Dentro de todas las pruebas de laboratorio realizadas se incluyó la determinación de cadenas livianas kappa positivas en orina. No se completó el estudio genético por fallecimiento de la paciente. Se concluyó que es posible la presentación simultánea de **Mieloma Múltiple** y Cáncer de mama. A pesar de la tendencia de los mastólogos a adjudicar siempre la patología ósea a metástasis y la paraproteína a manifestación paraneoplásica, debe pensarse en la asociación. En nuestro caso ambas citologías, la del mieloma y la del tumor de mama, fueron de características morfológicas distintas, cada una con su identidad propia. (57)

En el Instituto Clínico Kinast & Asociados se han desarrollado técnicas clínicas para afrontar al **Mieloma Múltiple**, y para establecer su diagnóstico se emplean pruebas de laboratorio; como ser, la determinación de proteína M en suero y/u orina; principalmente se identifica la cadena pesada y liviana de la proteína M, mediante inmunoelectroforesis o inmunofijación. (13, 14)

En la mayoría de los pacientes con mieloma, el glomérulo renal funciona normalmente, permitiéndole solo a aquellas proteínas de peso molecular pequeño, tales

como la albúmina y las cadenas livianas, filtrarse en la orina. En los túbulos la concentración de proteínas aumenta según el agua es reabsorbida, esto lleva a la precipitación de proteínas y a la formación de desechos tubulares, que podrían ocasionar daños a las células tubulares. Con las lesiones tubulares, los patrones típicos de electroforesis muestran un máximo de albúmina pequeño y un máximo de cadena liviana más grande en la región globulina; este patrón tubular es el que usualmente se encuentra en los pacientes con mieloma. (14)

Pero cuando existen lesiones glomerulares, tales como aquellas que resultan de los depósitos glomerulares de amiloide, o enfermedad de depósitos de cadena ligera, dan como resultado el escape no selectivo de todas las proteínas sericas hacia la orina; y el patrón de electroforesis de esta orina semeja el patrón serico. (14)

Finalmente el Instituto Clínico Kinast & Asociados ha establecido que estos estudios iniciales deberían ser comparados con valores subsecuentes mas luego, cuando sea necesario decidir si la enfermedad es estable o progresiva, y si responde al tratamiento o empeora. (14)

En el presente trabajo se obtuvieron resultados importantes en relación con las pruebas estandarizadas. La primera técnica estandarizada fue la de reducción de puentes disulfuro que permitió la obtención de cadenas livianas kappa y lambda libres. Se recolectaron las muestras de suero de los pacientes aparentemente sanos y de los pacientes con **Mieloma Múltiple**.

Es importante destacar que de los cinco casos positivos (con diagnóstico de mieloma confirmado), cuatro de los pacientes se encontraban en tratamiento con quimioterapia desde hace más de un año, y solo uno de los pacientes; fue diagnosticado recientemente, se le tomó la muestra de sangre y recolectó su muestra de orina antes de que iniciara su tratamiento con quimioterapia.

Los sueros procesados en esta primera fase fueron almacenados y una vez que se contaba con todas las muestras, se procedió a la realización del método ensayo inmunoenzimático sándwich (EIA) ya estandarizado.

La técnica de inmunodifusión radial (IDR) nos sirvió como método de referencia, por que permitió hacer la comparación respectiva de los resultados obtenidos por la técnica de EIA estandarizada. Por otro lado la determinación de proteínas totales, proteinuria y la determinación de proteínas de Bence Jones que se utilizan como pruebas de rutina para el diagnóstico de **Mieloma Múltiple**, en nuestro caso nos sirvió de apoyo para confrontar los resultados obtenidos tanto en las muestras de personas aparentemente sanas como de aquellas personas con un diagnóstico establecido. (4, 8, 11, 14, 21, 24, 26, 28, 37, 48, 53, 66)

Los métodos empleados para la estandarización de las técnicas de reducción de puentes disulfuro para la obtención de cadenas livianas kappa y lambda y el ensayo enzimático sándwich, requirieron de mucho tiempo y de varias pruebas preliminares hasta la optimización de los dos métodos. Finalmente fueron evaluados y comparados con kits comerciales.

En la intención de ofrecer un método confiable para poder determinar la presencia de cadenas livianas y poder establecer su proporción y que, además, tengan un precio asequible a la población de escasos recursos económicos; nos llevó a plantear la estandarización de tales métodos.

En la reducción de cadenas livianas kappa y lambda fue necesario hacer una evaluación minuciosa para lo cual se requirió de otras pruebas adicionales como la inmunoelectroforesis y la tinción con Rojo Ponceau. Una vez separadas las cadenas kappa y lambda (solo en suero), se analizaron las muestras de suero y orina por el método ensayo enzimático sándwich; se observó que de los pacientes aparentemente sanos los resultados obtenidos entran dentro de los valores normales.

De los pacientes con **Mieloma Múltiple**, cuatro muestras de suero al ser analizadas por el método ensayo inmunoenzimático sándwich; dieron valores similares a los del grupo de pacientes aparentemente sanos; los mismos recibían tratamiento con quimioterapia hace más de un año y clínicamente, estos pacientes se encontraban en buenas condiciones. Mientras que al último paciente, se le tomó la muestra antes de iniciar su tratamiento. El ensayo inmunoenzimático tipo sándwich sólo detecto un valor alto del índice kappa / lambda

(2,5); tratándose de un paciente que también recibía tratamiento con quimioterapia desde 1997.

En el método ensayo enzimático sándwich para el control negativo y sobre todo con fines comparativos se emplearon solo dos muestras de orina de 24 horas de pacientes aparentemente sanos, los resultados obtenidos; dieron valores dentro de lo normal al igual que de las cuatro muestras de orina de 24 horas de los pacientes con **Mieloma Múltiple**.

En el caso de la técnica de inmunodifusión radial (IDR), para la determinación de cadenas livianas tanto kappa como lambda en suero; se utilizaron kits comerciales y en ambos casos se hizo la determinación por separado; la inmunodifusión radial se utilizó como método de referencia para el desarrollo de la técnica estandarizada de ensayo inmunoenzimático tipo sándwich (EIA). Los resultados de las cinco muestras de suero de las personas aparentemente sanas, dieron resultados normales dentro de los rangos esperados; tanto en la determinación de cadenas kappa como lambda.

De los resultados obtenidos de los sueros de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, tres dieron resultados dentro de los rangos normales tanto para kappa y lambda; pero en la determinación de cadenas kappa, dos muestras de sueros dieron resultados por encima de lo normal; en ambos casos se registró un resultado de **51.800 mg/l**. Estos resultados correspondían a un paciente con tratamiento con quimioterapia, cuyo resultado coincide con el detectado por el método ensayo inmunoenzimático tipo sándwich en el que también dio un índice kappa/ lambda elevado y el otro caso se trataba del paciente que aún no había recibido ningún tratamiento.

En las determinaciones de orina por inmunodifusión radial (IDR), en el caso del control de pacientes aparentemente sanos, no se observó la formación de los halos de precipitado; porque normalmente en orina no existe la presencia de cadenas livianas kappa ni lambda, mientras que en las muestras de orina de los pacientes con **Mieloma Múltiple** se pudo determinar la formación de los halos, se presentaron dos casos de dos pacientes con valores altos de cadenas kappa; mientras que los demás dieron valores bajos al igual que para las cadenas lambda a excepción de un solo caso de un paciente en el que no se formó el halo correspondiente.

En la determinación de proteínas totales en suero de los pacientes aparentemente sanos, se debe resaltar que de las cinco muestras, una de ellas dio un valor por encima de lo normal (9,4 g/dl). De los pacientes con **Mieloma Múltiple**, tres de ellos dieron valores que entraban dentro de los rangos de referencia, uno de ellos dio un valor muy bajo (3,8 g/dl) mientras que de los dos pacientes en los que se registró un valor alto para las cadenas kappa por IDR; los valores de proteínas totales del paciente que recientemente fue diagnosticado dio un valor de proteínas ligeramente elevado (8,8 g/dl); mientras que del otro paciente que recibía tratamiento con quimioterapia dio un valor normal (6,2 g/dl).

La determinación de proteinuria es una prueba característica para la evaluación de pacientes con **Mieloma Múltiple**, en la que tres de los pacientes dieron resultados de proteinuria elevados (0,203 – 0,263 – 0,107 g/24 horas); y solo uno de ellos dio un resultado que se encontraba en el límite superior (0,071 g/24 horas). En esta determinación es importante destacar que no fue posible contar con las cinco muestras de orina de 24 horas, debido a que una paciente no pudo recolectar la orina de 24 horas.

La prueba de proteínas de Bence Jones, aunque es una prueba semicuantitativa, contribuye de alguna manera en el diagnóstico. Es por ello que de las muestras de orina de 24 horas, tres dieron un resultado negativo y solo el caso del paciente recientemente diagnosticado dio un resultado positivo.

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo va más allá de estandarizar técnicas que permitan ampliar el espectro de las pruebas de laboratorio que se ofrecen para el diagnóstico del **Mieloma Múltiple**. En nuestro grupo de pacientes aparentemente sanos, todos los resultados obtenidos de las distintas pruebas y técnicas realizadas; dieron valores dentro de los rangos de referencia, a excepción del caso de un paciente varón que presentó un valor de proteínas totales elevado. Es por ello, que el examen de las proteínas del plasma puede proporcionar información que refleje estados patológicos en muchos sistemas orgánicos. La medición más frecuentemente practicada, la de las proteínas totales, suele hacerse en suero, que no tiene fibrinógeno ni ningún anticoagulante que pueda diluir ligeramente las proteínas en plasma. Aunque la determinación de proteínas totales proporciona al médico alguna información acerca del

estado general del paciente con relación a su nutrición en alguna enfermedad orgánica grave (como en los estados con pérdida de proteínas), otros fraccionamientos dan información clínicamente mucho más útil. (8, 26)

De acuerdo con la bibliografía revisada, las causas más frecuentes para que se produzca una elevación de las proteínas totales podrían ser: deshidratación, ejercicios severos, infecciones y cáncer. En el caso de una deshidratación o la realización de ejercicios severos lo que ocurre es una pérdida de los fluidos corporales, donde se incrementa la concentración de las fracciones proteicas ya sea en forma relativa o en su totalidad. En los casos de infección por microorganismos, la elevación puede deberse a un incremento de la fracción de gamma globulinas; pero los anticuerpos formados comienzan el ataque a tales microorganismos. El incremento de proteínas totales también se presenta en varios tipos de cáncer, frecuentemente reflejan una síntesis anormal de proteínas por el tumor (un ejemplo incluye el antígeno carcinoembrionario y la alfafetoproteína). (8, 26)

Por otro lado, analizando los resultados de los pacientes con **Mieloma Múltiple**; la primera paciente era una mujer de 73 años, se estableció su diagnóstico en 1999 y recibía tratamiento con quimioterapia. Las pruebas realizadas fueron solamente en suero, debido a que la paciente no logró recolectar la muestra de orina de 24 horas, dentro de los resultados obtenidos se tiene que los valores de proteínas totales entran dentro de los rangos normales (7,4 g/dl), el valor del índice kappa y lambda por la técnica de EIA estandarizada dio un valor de 1,0 que se considera normal. Por IDR tanto las cadenas kappa (7.480 mg/l) y lambda (3.750 mg/l) dieron valores dentro de los rangos de referencia en ambos casos. Con estos escasos datos pero significativos, nos indicaría que el tratamiento de quimioterapia para la paciente esta dando buenos resultados; debido a que no presenta valores elevados dentro de los parámetros evaluados, pero; aún así, es de importancia hacer un seguimiento tanto clínico como de laboratorio después de cada sesión de quimioterapia.

El segundo paciente se trataba de un varón de 39 años, su diagnóstico se estableció en el 2001 y recibía tratamiento con quimioterapia. Las pruebas realizadas fueron en suero y en orina, el valor del índice kappa y lambda en suero por la técnica de EIA estandarizada dio un valor de 0,8 y en orina de 1,0; se considera normal para ambos casos. Por IDR, la determinación de cadenas kappa en suero dio un valor dentro del rango normal (3.100 mg/l)

mientras que la medición de las cadenas lambda en suero dio un valor por debajo del rango normal (2.410 mg/l); lo cual no se considera significativo desde el punto de vista clínico. En cambio la IDR en orina de 24 horas para las cadenas kappa dio un valor (5.180 mg/l), mientras que para las cadenas lambda no hubo la formación del halo respectivo. En la medición de las proteínas totales se registró un valor que entra dentro de los rangos normales (6,6 g/dl), en la determinación de las proteínas de Bence Jones el resultado fue negativo y en la prueba de proteinuria el valor se encontraba por encima de lo normal (0,203 g/24 horas). En este caso, lo que llama la atención es el valor de la proteinuria y el de las cadenas kappa en orina; lo cual nos indicaría que el paciente pese al tratamiento aún esta eliminando cadenas kappa y proteínas por orina. Por tanto, sería conveniente hacer una evaluación más minuciosa después de cada tratamiento; como lo sugieren los científicos de la Universidad de Birmingham que dicen: "Nuestro trabajo demuestra que la medición en suero de Cadenas Livianas Libres (CLL) se puede usar para identificar y monitorear pacientes con mieloma de cadenas livianas. Además, la evaluación en suero de CLL es un marcador más preciso de la desaparición completa de la enfermedad en comparación con el test en orina". (29)

Tercer paciente, varón de 68 años; se estableció su diagnóstico en 1998 y recibía tratamiento con quimioterapia. Las pruebas realizadas fueron en suero y en orina, el valor del índice kappa y lambda en suero por la técnica de EIA estandarizada dio un valor de 0,5 y en orina de 0,9; se considera normal para ambos casos. Por IDR, los resultados obtenidos en la determinación de cadenas kappa (5.180 mg/l) y lambda (3.750 mg/l) dieron valores dentro de los rangos normales; en cambio los valores en orina de kappa y lambda fueron (130 mg/l) y (577 mg/l) respectivamente. En la medición de las proteínas totales se registró un valor que esta por debajo del rango normal (3,8 g/dl), mientras que en la determinación de las proteínas de Bence Jones el resultado fue negativo y en la prueba de proteinuria el valor se encontraba en el límite superior del rango normal (0,071 g/24 horas). Los datos que llaman la atención en este caso, son los que se relacionan con la orina de 24 horas; por un lado el valor de proteinuria se encuentra en el límite superior y en la misma orina encontramos cantidades aunque bajas de kappa y lambda, ello podría deberse a que aún existe algún compromiso renal, lo cual es bastante frecuente en los pacientes con **Mieloma Múltiple**. Por otro lado, las proteínas totales medidas en suero se encuentran muy bajas, las causas

podrían ser: cáncer gastrointestinal, enfermedades del hígado, una mala nutrición, cantidades bajas de tiamina, glomerulonefritis. (8)

El cuarto paciente de 52 años fue diagnosticado en 1997 y recibía tratamiento con quimioterapia, sólo en este caso; el valor del índice kappa y lambda en suero por la técnica de EIA estandarizada dio un valor elevado de 2,5; mientras que en la orina el valor fue de 1,0; los valores de kappa evaluados por IDR en suero dieron un valor también elevado (51.800 mg/l), en cambio para lambda también en suero, el resultado se encontraba por debajo del rango normal (3.060 mg/l). Sus proteínas totales se encontraban normales (6,2 g/dl), las proteínas de Bence Jones dieron un resultado negativo; pero en la determinación de proteinuria se registró un valor por encima del rango normal (0,107 g/24 horas).

De acuerdo con la bibliografía revisada se tiene que en aproximadamente el 40 % de los pacientes con mieloma de diagnóstico reciente y que reciben tratamiento con quimioterapia, puede producirse una remisión de la enfermedad. La duración promedio de la remisión es de aproximadamente 2 años y la tasa media de supervivencia es de aproximadamente 3 años. Menos del 10 % de los pacientes viven más de 10 años y no existen evidencias de cura ni incluso en un pequeño subgrupo de pacientes. Por lo tanto, el problema principal es la resistencia al tratamiento, con una baja frecuencia de remisión completa y la recidiva inevitable a menos que ocurra la muerte del paciente por otra enfermedad no relacionada o una leucemia secundaria. (4)

El caso de este paciente podría incluirse dentro de este 40%, debido a que presenta problemas en cuanto a la eliminación de proteínas por la orina; y como consecuencia de ello, se encontraron cadenas kappa en suero por las dos técnicas evaluadas.

El último paciente, varón de 61 años; recientemente diagnosticado y hasta el momento en que se le tomó la muestra de sangre y se recolectó la orina de 24 horas, no había recibido tratamiento alguno. Por la técnica de EIA los valores del índice kappa y lambda en suero y orina entraron dentro del rango normal 0,7 y 0,8 respectivamente, en cambio, por IDR la determinación de las cadenas kappa registraron un valor muy elevado (51.800 mg/l) pero el valor de las cadenas lambda se encontraban por debajo del rango normal (2.410 mg/l); los valores en la orina también dieron valores altos para kappa (1.960 mg/l) y no así, para lambda (370 mg/l).

En la medición de las proteínas totales, el valor se encontraba ligeramente elevado con relación al rango normal (8,8 g/dl); fue el único caso en la prueba de proteínas de Bence Jones que dio un resultado positivo. Finalmente la prueba de proteinuria dio un valor por encima del límite superior del rango de referencia (0,263 g/24 horas).

En este caso, existen diferencias marcadas de los resultados obtenidos por EIA y por IDR, es aceptable que las cadenas kappa se encuentren demasiado elevadas en suero; tratándose de un paciente recientemente diagnosticado. De la misma forma la prueba característica de los pacientes con **Mieloma Múltiple**, presentan resultados positivos para proteínas de Bence Jones y por lo tanto su valor de proteinuria también será alto. La razón posible por la que no se registró un valor elevado del índice kappa y lambda por EIA, se deba al proceso de congelación después de la reducción de cadenas por las que paso la muestra.

En resumen analizando los resultados en forma global, cuatro de los pacientes fueron diagnosticados con **Mieloma Múltiple** desde hace más de tres años; y solo un paciente fue recientemente diagnosticado, los resultados obtenidos por el método de EIA estandarizado son valores que entran dentro de un rango de referencia; debido a que son pacientes controlados por el tratamiento con quimioterapia y acuden a una evaluación médica cada cierto tiempo, con el fin de poder controlarlos. Ello podría corroborarse con los datos obtenidos con la técnica de comparación IDR donde la determinación de cadenas kappa y lambda presentaron resultados también normales.

Lo que sí, es importante destacar que por ambas técnicas en muestras de orina de 24 horas, pudo detectarse la presencia de cadenas kappa y lambda. Ello correlacionaría a los valores obtenidos en la prueba de proteinuria, donde tres pacientes presentaron resultados por encima del rango normal. Clínicamente se debe a que el riñón es afectado aproximadamente en la mitad de los pacientes con **Mieloma Múltiple** en algún periodo de su evolución y un 25 – 30 % tiene insuficiencia renal en el momento del diagnóstico y en el resto la insuficiencia renal aparece en el curso de la enfermedad. Es por ello, que la mayoría de los pacientes con insuficiencia renal presentan proteinuria de cadenas ligeras. (1)

Los resultados que discrepan por ambas técnicas son: por EIA estandarizada solo fue posible determinar un índice kappa / lambda elevado en suero, de un paciente diagnosticado

con **Mieloma Múltiple** desde 1.997 y que recibía tratamiento con quimioterapia. Aunque los valores de proteínas totales y de proteínas de Bence Jones no fueron significativos, a excepción de su proteinuria que dio un valor también elevado; clínicamente se debe a que los pacientes aun en tratamiento, suelen presentar momentos de decaimiento sobre todo por complicaciones renales y es donde nuevamente eliminan cadenas kappa y lambda por orina y en este caso es posible detectarlas también en suero. Es por ello que los controles médicos que se aplican en otros países después de cada sesión de quimioterapia, incluyen distintas pruebas de laboratorio que permiten evaluar el estado del paciente y de esta manera poder controlar la enfermedad.

En cambio, por la técnica de IDR comercial fue posible detectar solo valores muy elevados de cadenas livianas kappa en dos casos de pacientes; uno de ellos coincide con la técnica de EIA, mientras que el otro caso que no pudo ser detectado por EIA es del paciente que recientemente fue diagnosticado y que no había recibido ningún tratamiento hasta el momento en que se le tomó la muestra de sangre y orina. Ello tendría correlación con las otras pruebas realizadas; donde dio valores por encima de los rangos normales para proteínas totales, proteinuria y fue el único caso que dio proteínas de Bence Jones positivo.

De acuerdo con otros trabajos de investigación se tienen datos muy importantes con relación al presente trabajo, donde principalmente se analiza que en pacientes con **Mieloma Múltiple** se presenta un exceso en la circulación de cadenas pesadas como alfa (α) o gamma (γ) en un 0,38% y las cadenas livianas kappa (κ) o lambda (λ) en un 0,48%. Por ambas técnicas evaluadas en el presente trabajo, se pudo determinar que en dos casos de los pacientes con **Mieloma Múltiple**; existe un incremento de las cadenas livianas, particularmente de las cadenas kappa. (16)

Existen varios estudios acerca de la medición exacta de las concentraciones de las cadenas livianas libres en suero y orina, debido a que dichos resultados son muy importantes para el diagnóstico y para las implicaciones terapéuticas que podrían presentarse. Los distintos trabajos de investigación le dieron mayor relevancia a la obtención de anticuerpos monoclonales en ratones inmunizados donde dieron resultados sorprendentes al ser medidos por ELISA, por este método se obtuvieron valores en

concentraciones de cadenas kappa y lambda en suero y orina, es decir, en (microgramos/ml) y al mismo tiempo se obtuvieron los datos del radio (kappa: lambda) en suero y orina. (1, 7)

De dichos estudios, en las diferentes pruebas realizadas para la cuantificación de cadenas livianas kappa y lambda libres tanto en orina como en suero; se han empleado anticuerpos monoclonales basado en el inmunoensayo enzimático – enlazado. De estos estudios se obtuvieron preliminarmente resultados expresados en (microgramos/ml), así también se tienen datos del índice kappa y lambda también en forma preliminar. Del mismo modo el presente trabajo ha obtenido datos en forma preliminar y una vez que se optimice el método de inmunoensayo sándwich, tomando en cuenta un mayor número de pacientes aparentemente sanos, se podría establecer los rangos de referencia para nuestro medio. (7)

Al hacer el análisis correspondiente de la técnica de EIA estandarizada que no pudo detectar el caso del paciente recientemente diagnosticado y sin tratamiento, se concluye que la posible causa se deba a la gran cantidad de inmunoglobulinas que se hallaban presentes en el suero del paciente y las mismas al ser tratadas con reactivos como el Ditiotritol, Iodoacetamida, Trietanolamida y por ser congeladas hasta su evaluación, ello posiblemente haya ocasionado la pérdida de las cadenas livianas tanto kappa como lambda; porque de acuerdo a la referencia bibliográfica, se recomienda trabajar con muestras de suero fresco y/o las mismas no deben ser congeladas. (52)

El presente trabajo es un estudio preliminar con resultados interesantes y relevantes, sin embargo; como cualquier trabajo de investigación se constituye en la base para la realización de posteriores trabajos con distintos objetivos y perspectivas. Por ello, cuando se estandariza una nueva técnica a partir de los propios recursos con los que se cuenta, siempre se busca lograr una técnica óptima y rápida para el diagnóstico en este caso de pacientes con **Mieloma Múltiple**, quizás en un futuro se pueda optimizar mejor esta técnica utilizando anticuerpos monoclonales elaborados por uno mismo y de esta forma mejorar el método; o hacer distintas pruebas en la técnica como ser: variación de reactivos, periodos de incubación y otros.

La determinación del índice kappa / lambda por el método ensayo inmunoenzimático tipo sándwich (EIA) estandarizado en el presente trabajo, podría ser incorporada dentro de

los exámenes de rutina debido a su utilidad sobre todo para la evaluación del seguimiento terapéutico. Es así, que la técnica estandarizada aportaría en la valoración del tratamiento de los pacientes con **Mieloma Múltiple**; es decir, después de cada quimioterapia, realizar como examen de rutina la determinación del índice kappa / lambda previa reducción de cadenas livianas y luego EIA; con lo que se evaluaría el estado del paciente y al mismo tiempo la evolución de la enfermedad.

X. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron las cadenas kappa (κ) y lambda (λ) libres a partir de inmunoglobulinas séricas, por medio de la estandarización de la técnica de reducción de puentes disulfuro.
- Se estandarizó el método inmunoenzimático sándwich (EIA) para la evaluación de las cadenas livianas kappa y lambda en sueros normales y patológicos.
- En los pacientes que inicialmente son diagnosticados con **Mieloma Múltiple** los niveles de cadenas kappa y lambda se encuentran elevados.
- En los pacientes con **Mieloma Múltiple** que se encuentran en tratamiento, los valores de la relación kappa y lambda varían de acuerdo al tiempo de tratamiento con quimioterapia, así; como a la respuesta de cada individuo.

XI. RECOMENDACIÓN

- Es importante tomar en cuenta que para la determinación de cadenas livianas libres kappa y lambda se debe trabajar con muestras de suero fresco y no deben ser congeladas, porque ello podría afectar en su determinación.
- Sería importante hacer seguimiento de los pacientes con **Mieloma Múltiple** que reciben tratamiento con quimioterapia a través de una evaluación laboratorial.
- Es importante realizar un estudio de Test Diagnóstico, para validar la técnica estandarizada del método inmunoenzimático tipo sándwich.
- Para la continuación del presente trabajo recomendaría establecer los rangos de referencia en nuestro medio del índice kappa / lambda.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. ABE M., GOTO T. and et al. **Differences in kappa to lambda (kappa: lambda) ratios of serum and urinary free light chains.** Clin. Exp. Immunol Feb; 111 (2): 457 - 62. Knoxville (USA). 1998. <http://www.immunology.org/>
2. AEBERSOLD R. and et al. **Microisolation of DABITC - derivatized protein by gel electrophoresis: application to the purification of antibody heavy and light chains.** Anal Biochem Feb; 136 (2): 465 - 9. 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. Aetna Inc. Coverage Policy Bulletins. **High Dose Chemotherapy Bone Marrow or Peripheral Stem Cell Transplant for Multiple Myeloma.** 2002. <http://www.aetna.com/index.htm>.
4. ALEXANIAN Raymond, DIMÓPOULOS Meletios. **De la Prensa Médica Extranjera: El tratamiento del Mieloma Múltiple.** Rev. Cubana Méd. 34 (2). 1998. <http://www.scielo.sld.cu/revistas/med/eaboutj.htm>
5. ARUP's Guide to Clinical Laboratory Testing (CLT). **Immunofixation Electrophoresis, Quantitative.** U.S.A. 2001. <http://www.arup-lab.com/>
6. ARUP's Guide to Clinical Laboratory Testing (CLT). **Kappa/Lambda Light Chain Ratio.** U.S.A. 1996. <http://www.arup-lab.com/>
7. AXIAK SM and et al. **Quantitation of free kappa light chains in serum and urine a monoclonal antibody based inhibition enzyme - linked immunoassay.** J. Immunol Methods May; 4; 99 (1): 141 - 7. 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. BERNARD JOHN, M.D. **Diagnóstico y tratamientos clínicos.** 9 ed. México DF. Ed. Científicas y Técnicas S.A. 1997.
9. BOUX HA and et al. **The surface expression of a tumor - associated antigen on human kappa myeloma cells.** Eur. J. Immunol Mar; 14 (3): 216 - 22. 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

10. BROSTOFF Jonathan y otros. **Casos clínicos en:** Inmunología. 1 ed. Madrid (España). Ed. Mosby/Doyma. 1996.
11. CANAL SALUD. **Guía de Enfermedades: Mieloma Múltiple.** 2000 - 2001. <http://www.canalsalud.com/>
12. Canal Salud. **Valores Clínicos: En Suero y en Orina.** Telemedicine World (TmW), S.L. Madrid, España. <http://www.canalsalud.com/>
13. CENTRO DE MEDICINA BIOLÓGICA INSTITUTO CLÍNICO KINAST & ASOCIADOS - MIELOMA MÚLTIPLE. **Mieloma Múltiple - Generalidades:** ¿ Que es el Mieloma Múltiple o neoplasma de células plasmáticas ?. Tratamiento actual del neoplasma de células plasmáticas. (Documento informativo para pacientes del Centro de Medicina Biológica Instituto Clínico Kinast & Asociados). Santiago (Chile). 1999. <http://members.fortunecity.com/kinast/index.htm>
14. CENTRO DE MEDICINA BIOLÓGICA INSTITUTO CLÍNICO KINAST & ASOCIADOS - UNIDAD DE ODONTOESTOMATOLOGIA. **Mieloma múltiple - Técnicas clínicas para afrontarlo - Indicaciones para el clínico (sólo uso profesional).** Santiago (Chile). 2000. <http://members.fortunecity.com/kinast/index.htm>
15. CONDORI Marcelina. **Determinación de Rangos de Referencia de Creatinina, Depuración de Creatinina y Proteínas en orina de 24 horas como indicadores de alteración renal.** La Paz (Bolivia). 2002.
16. CORDOBA Franck and et al. **Spontaneous monoclonal immunoglobulin - secreting peripheral blood mononuclear cells as a marker of disease severity in multiple myeloma.** British Journal of Haematology 108 (3), 549 - 558. Montpellier (France). 2001. <http://www.blackwell-sinergy.com/>
17. COTRAN Ramzi S. **Robbins: Patología Estructural y Funcional.** 5 ed. Madrid (España). Ed. McGraw - Hill - Interamericana.1995.
18. Clínica Las Américas. **Secciones Inmunodiagnóstico.** 2003. <http://www.lablasamericas.com.co/>

19. Dako Corporation. **Anti - Human / Humain**. Lambda Free Light Chains and Kappa Free Light Chains. Dako A/S, Denmark.
20. De Wikipedia, la enciclopedia libre. **Estudio de serie de casos**. Octubre 2004. http://es.wikipedia.org/wiki/Estudio_de_serie_de_casos
21. DIOP PA and et al. **Laboratory diagnosis of monoclonal gammopathies**. Prospective study of 14 cases in Dakar, Senegal. Senegal. 1998. <http://www.pathexo.fr/pdf/1998n3/Diop.pdf>
22. DURIE Brian G.M., MD. **Multiple myeloma**: A concise review of the disease and treatment options. Published by: International Myeloma Foundation. North Hollywood, CA. 1996. <http://www.myeloma.org/imfis.html>
23. **EL MANUAL**. (12). Septiembre a Febrero. Bolivia. 1999 - 2000.
24. Enfermedad de la sangre. **Mieloma Múltiple**. Información suministrada por: **Fundaleu**. Programa Santa Clara S.A. Argentina. 1998 – 2001. <http://www.contenidos.com/ciencias/leucemias/03mieloma/03mieloma.htm>.
25. FAIR DS and et al. **Studies on IgA and IgA monoclonal proteins derived from a single patient. Evidence for identical light chains and variable regions of the heavy chain**. Biochemistry. Dec. 30; 14 (26): 5561 - 8. 1975. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
26. FARRERAS ROZMAN, Ciril. **Medicina Interna**. 13 ed. Barcelona (España). Ed. Iberoamericana. 1998.
27. Foro de la industria Nuclear Española. **Estudio Epidemiológico del Instituto Carlos III**. 3ra Revisión. España. Enero. 2000. http://www.foronuclear.org/p_inf.htm
28. FUNDALEU, Fundación para combatir la Leucemia. Centro de Internación e Investigación Clínica "Angélica Ocampo". **Mieloma Múltiple**: Información para pacientes. Buenos Aires (Argentina). 2001. <http://www.fundaleu.org/>
29. Fundación Bioquímica Argentina (Bionoticias). **Proponen un estudio en suero para investigar el mieloma Bence Jones**. Argentina. Febrero. 2003. <http://www.fba.org.ar/bionoticias52.asp#>

30. González G. Juan Carlos. **Diseños básicos en investigación clínica.** Estudios observacionales. <http://www.encolombia.com/orto/10296disenos.htm>
31. HENSKENS Yvonne and et al. **Enzymes and Protein Markers:** Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. American Association for Clinical Chemistry, Inc. 44:6, 1184 - 1190. 1998. <http://www.clinchem.org/>
32. HUDSON Leslie and HAY Frank C. **Practical Immunology.** 3 ed. Blackwell Scientific Publications. Osney Mead, Oxford. 1989.
33. HUNT JC, FISH WW and MARCHALONIS JJ. **Rapid molecular weight estimation and separation of selected immunoglobulin chains by high speed gel filtration.** J. Immunol Methods Dec. 16;65 (1-2):199-205. 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
34. KARASUMA Nijo and KYOTO Nakagyo - ku. Nacalai Tesque Inc. **Product specification sheet.** Japan. 1999. <http://www.nacalai.co.jp/en/company/index.html>
35. KEREN David F. **Detection and Characterization of Monoclonal Components in Serum and Urine.** Department of Pathology, The University of Michigan Medical School. Clinical Chemistry 44: 1143 -1145. Michigan (U.S.A.).1998. <http://www.clinchem.org/cgi/content/full/47/1/110>
36. KEREN DF and et al. **Strategy to diagnose monoclonal gammopathies in serum: high - resolution electrophoresis, immunofixation, and kappa / lambda quantification.** Michigan (U.S.A.). 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
37. KRUPP, Marcus A. y CHATTON, Milton J. **Diagnóstico Clínico y Tratamiento.** 12 ed. México DF. Ed. Manual Moderno. 1977.
38. La estructura básica de un anticuerpo. Reproducido de Ciencia Hoy, 11: 38 - 39. 1991. <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/indice.htm>
39. LABORATORIUM KLINIK. **Cadenas Ligeras kappa / lambda en orina.** Código BC: 1550. 2000. <http://www.pramita.co.id/>
40. LABORATORIUM KLINIK. **Cadenas Ligeras kappa / lambda en suero.** Código BC: 551. 2000. <http://www.pramita.co.id/>

41. LAGO Hernán, GRINBERG Alejandro. **Polineuritis, Hepatoesplenomegalia, Hipotiroidismo y Raynaud.** Reunión anatomoclínica efectuada en el Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Volumen 56 - Nº 5/1. Buenos Aires (Argentina). 1996. <http://www.aasfc.org.ar/lanari/idimlanari/>
42. LE BRICON Thierry and et al. **Enzymes and Protein Markers: Sodium dodecyl sulfate - agarose gel electrophoresis of urinary proteins: application to multiple myeloma.** Clinical Chemistry 44:6, 1191 - 1197. 1998. <http://www.clinchem.org/>
43. LEE - YUNG Shih and et al. **Lack of BCL10 mutations in multiple myeloma and plasma cell leukemia.** Genes, Chromosomes and Cancer. Volume 30, Pages: 402 - 406. 2001. <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1045-2257>
44. LEVINSON SS, Keren DF. **Free light chains of immunoglobulins: clinical laboratory analysis.** Clin. Chem. Oct. 40 (10): 1869 - 78. DF. Department of Pathology, University of Louisville, KY. 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
45. LEVINSON SS. **Kappa / lambda index for confirming urinary free light chain in amyloidosis AL and other plasma cell dyscrasias.** Louisville. 1991. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
46. MIELOMA MÚLTIPLE. **Foto del mes de septiembre.** 2001. http://www.intermedicina.com/foto_del_mes.htm.
47. MIELOMA MÚLTIPLE. **Guía para el paciente:** Primera y Segunda Parte. International Myeloma Foundation. North Hollywood, C.A. 2001. <http://www.myeloma.org/main.jsp>
48. MONTI G. and et al. **Therapy of multiple myeloma. Study of hospital patients: 81 cases in 16 years' observation.** Minerva Med. Feb 11; 74 (5): 155 - 63. Pub Med - Medline. Italian. 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
49. National Cancer Institute. **Información general sobre el mieloma múltiple y otras neoplasias de células plasmáticas.** Mayo 2005. <http://www.cancer.gov/>
50. News Release. **Acercas del Mieloma Múltiple.** Europe. February 2003. <http://www.prnewswire.com/media/>

51. Normas Vancouver. Colaboraciones especiales. **Requisitos de uniformidad para manuscritos presentados a revistas biomédicas**. Revista Española de Salud Pública. Marzo-Abril 1997. <http://www.msc.es/revistas/resp/199702/indiceesp.htm>
52. Parámetros importantes de Laboratorio Clínico. Cartagena - Colombia. (www). 2001.
53. QUEVEDO L. Iván y LLANOS C. Cecilia. **Artritis Reumatoidea asociada a Mieloma Múltiple**. Sección Reumatología, Servicio de Medicina Interna Hospital Regional Concepción. Revista de Medicina Interna Concepción. Vol. 2. Nº 1. Concepción (Chile). 1998. <http://www.udec.cl/~ofem/remedica/VOL2/conten.htm>
54. RAMACCIOTTI PG and et al. **Evaluation of the relations between serum proteins electrophoresis and other laboratory tests in monoclonal gammopathies (author's transl)**. Quad Sclavo Diagn Mar; 12 (1): 60 - 6. Pub Med - Medline. Italian. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
55. Reina Manuel. Métodos en Biología Celular. **ELISA**. Septiembre 2003. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm#Tipos de ensayos ELISA>
56. ROITT, Iván. **Inmunología Esencial**. 6 ed. Barcelona (España). Ed. Jims. 1988.
57. RUDOY Silvia y otros. **Mieloma múltiple y cáncer de mama**. Servicios de Hematología y Patología del Hospital Santojanni. Buenos Aires (Argentina). 2001. <http://www.santojanni.org/hemoterapia/trabajos.htm>.
58. SAMANIEGO Agustín, AFANI Alejandro. **Utilidad clínica de la Ig IV en enfermedades autoinmunes e inflamatorias**. Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile. 1996. <http://uchile.cl/>
59. SCOBLE JA and SCOPES RK. **Structure of the IgG - binding ligand of the T - gel**. J. Mol Recognit Winter; 11(1-6): 119 - 20. School of Biochemistry, La Trobe University, Bundoora, Victoria (Australia). 1998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
60. SPECIALTY LABORATORIES. **Kappa & Lambda Light Chain Urine Random. Kappa & Lambda Light Chain Quantitative 24 hour Urine**. E.U.A. 2002. <http://www.specialtylabs.com/default.htm>

61. STITES P. Daniel y ABBA I. Terr. **Inmunología básica y clínica**. 7 ed. México DF. Ed. Manual Moderno. 1993.
62. TANGO. **Mieloma múltiple - Información general**. 2001. <http://www.drtango.com/>
63. TANGO. **Mieloma múltiple - Tratamiento**. 2001. <http://www.drtango.com/>
64. THIERRY and et al. **Sodium dodecyl sulfate - agarose gel electrophoresis of urinary proteins: application to multiple myeloma**. Clinical Chemistry 44:1191-1197. Paris (Francia). 1998. <http://www.clinchen.org/>
65. TINDALL Bob and et al. **The Myeloma Alphabet Soup Handbook Immunoglobulins. Inmunoglobulinas**. (www). 1999.
66. Universidad de Chile. Sede Oriente. **Enfermedades Plasmocelulares** (Mieloma y Macroglobulinemias). 1999. <http://uchile.cl/>
67. University of Iowa. Department of Pathology. Laboratory services handbook. **Kappa / Lambda Light Chain Ratio**. Iowa (E.U.A). 2000. http://www.medicine.uiowa.edu/Path_Handbook/handbook/test1117.html.
68. University of Utah Health Sciences Center. **Las Enfermedades de los Huesos: El Mieloma de Hueso / Mieloma Múltiple**. 2001. <http://hsc.utah.edu/>
69. University Texas A&M - Kingsville. **Antibody Structure**. Texas (E.U.A). 1998. <http://ntri.tamuk.edu/bio/natural-tox.html>
70. Universidad de Chile. **Aumentan casos de cáncer a la médula ósea**. Chile. Julio 2002. <http://www.bibliotecas.uchile.cl/unoticias/Unoticias.htm>

ANEXOS

PREPARACION DE REACTIVOS

◆ **ÁCIDO ACÉTICO 1%**

Ácido Acético Glacial	0,25 ml
Agua Destilada	25 ml

◆ **ÁCIDO ACÉTICO 2%**

Ácido Acético Glacial	0,5 ml
Agua Destilada	25 ml

◆ **ÁCIDO SULFASALICILICO 5 %**

Ácido sulfasalícilico	0,5 g
Agua destilada	10 ml

◆ **ÁCIDO SULFASALICÍLICO 20 %**

Ácido sulfasalícilico	2 g
Agua destilada	10 ml

◆ **ÁCIDO TRICLOROACÉTICO 50 % (ATA)**

ATA	5 g
Agua Destilada	10 ml

◆ **AGAROSA 1 %**

Agarosa (de alta electroendósmosis)	0,1 g
Tampón Michaelis	10 ml
Azida de Na	1 pizca

◆ **DITIOTRITOL 2 M**

Ditiotritol	3,08 g
Agua Destilada	10 ml

◆ **LECHE DESCREMADA**

Leche descremada	1 g
PBS 0,1 M pH 7,2	20 ml

◆ **PBS – TWEEN**

PBS 0,1 M pH 7,2	100 ml
Tween	0,05 ml

◆ **ROJO PONCEAU 1%**

Rojo Ponceau	0,25 g
Agua Destilada	25 ml

◆ **SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA 0,85 % o SALINA NORMAL**

Cloruro de Na	8,5 g
Agua Destilada	1000 ml

◆ **SOLUCION AMORTIGUADORA DE ACETATOS**

Acetato de sodio 0,1 M	0,685 g
Ácido acético 0,1 M	0,32 ml
Agua destilada	100 ml

◆ SUSTRATO

OPD	25 mg
Tampón Citrato – Fosfato	10 ml
Peróxido de hidrógeno	0,007 ml

◆ TAMPON FOSFATO - SALINA 0.15 M pH 7,2 (PBS)

Fosfato Monobásico de sodio anhidro	8,09 g
Fosfato Dibásico de Sodio	2,15 g
Cloruro de Sodio	4,38 g
Agua destilada	1000 ml

◆ TAMPÓN MICHAELIS

Barbital sódico	29,42 g
Acetato de sodio	19,42 g
Azida de sodio 10 %	1 ml
Agua destilada	1000 ml
H Cl	Para ajustar el pH

◆ TAMPÓN CARBONATO – BICARBONATO

Na H C O ₃	0,336 g
Na ₂ C O ₃	0,424 g
Agua Destilada	20 ml

◆ **TAMPÓN FOSFATO CITRATO**

Na ₂ H P O ₄	0,568 g
Ácido cítrico	0,384 g
Agua Destilada	20 ml

◆ **TRIS – H Cl 0,15 M pH 7,2**

Tris o Tris Base	15 ml
Agua Destilada	85 ml