Premio Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas 2012

PERFIL DE LAS ISOENZIMAS DE LDH EN LINFOMA NO HODGKIN: CORRELACIÓN CON MARCADORES TUMORALES.

Priva Zabner de Oziel[1], Rosa Somoza[1], Valentina Wallis[1], Claudia Galicia[1], Jean Desenne[1], Ana Monzón de Orozco[1], Marina Gonzalez[1], Gretta Acquatella[1], Marisela Morales[1], Yasmin Ordoñez[1], María Alejandra Torres[1], Antonieta Natale[1], Aixa Müller[1].
[1]Dirección: Instituto de Oncología y Hematología (IOH). Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Universidad Central de Venezuela (UCV).
Recibido para publicación junio 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:
Introducción: La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) está conformada por cinco isoenzimas y es un importante factor pronóstico en pacientes con Linfoma No Hodgkin (LNH). Nuestro objetivo fue estudiar el patrón de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH y su correlación con marcadores tumorales clínico-patológicos y biológicos. *Métodos:* Se evaluaron 67 pacientes de primera consulta con diagnóstico de LNH confirmados clínica e histopatológicamente, sin tratamiento previo,VIH negativo y sin presentar otras enfermedades, durante el período 1999-2004, siendo el tiempo promedio de seguimiento de 30 meses (rango 3-48 meses), edad promedio 55 años (rango 18-79), Índice Pronóstico Internacional (IPI) 60(90%) bajo riesgo y 7(10%) alto riesgo.Se recolectaron muestras de sangre, para la obtención de suero y sangre total para la determinación de LDH, Isoenzimas de LDH, enzimas (AST, ALT, fosfatasa alcalina), Beta 2 Microglobulina, CA125,IL-6,sRαIL-2, Proteína C Reactiva, Albúmina sérica y VSG. Se procesaron muestras de suero de controles sanos para establecer los valores de referencia de las isoenzimas de LDH. *Resultados:* Los niveles séricos de la LDH y los valores absolutos de las isoenzimas de LDH fueron significativamente superiores en los pacientes respecto al grupo control (p<0,001). Las frecuencias de las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5 resultaron con niveles absolutos significativamente elevados en 25 (37%), 29 (43%), 32 (48%), 20 (39%) y 11 (16%) de los casos respectivamente. La asociación y correlación de la actividad de LDH1 con los factores clínico-patológicos adversos, IPI alto riesgo y marcadores biológicos alterados, sugieren su expresión como un indicador de recambio celular y actividad de la enfermedad. Los cambios en el patrón de la LDH2 reflejaron su asociación y correlación con factores clínico-patológicos y biológicos indicadores de la progresión de la enfermedad, la actividad proliferativa del tumor, un IPI adverso y la respuesta del paciente frente a la enfermedad. La LDH3 fue la de mayor frecuencia con niveles elevados y su actividad se asoció con factores pronósticos clínico-patológicos y biológicos adversos que reflejan la respuesta del paciente frente al tumor, actividad inflamatoria y la propensión a la extensión de la enfermedad. Su correlación con el IPI de alto riesgo y marcadores biológicos alterados, sugiere ser un indicador de la actividad proliferativa del tumor y la afectación del paciente. Los niveles incrementados de LDH4 y su patrón de distribución, se asociaron y correlacionaron con la respuesta del paciente frente al tumor, un IPI de alto riesgo y la progresión y diseminación de la enfermedad, expresándose como marcador de actividad celular y de adaptación a un metabolismo anaeróbico. La alteración de los niveles de la LDH5 reflejó su asociación y correlación con el deterioro del estado general del paciente y su respuesta frente a la enfermedad, la actividad proliferativa y el potencial invasivo del tumor. Los cambios en la distribución del patrón sugieren una actividad adaptada al metabolismo anaeróbico en los tejidos tumorales. *Conclusiones:* Las alteraciones del patrón de las isoenzimas de LDH expresadas como marcadores de recambio y actividad proliferativa celular, adaptación metabólica y actividad de la enfermedad, permitirían afinar la información aportada por la LDH sérica total en los pacientes con LNH y profundizar sobre la biología del tumor.

Palabras claves: LDH, Isoenzimas de LDH, Linfoma No Hodgkin.

PROFILES OF LDH ISOENZYMES IN NON- HODKING`S LYMPHOMA: CORRELATION WITH TUMOR MARKERS.

SUMMARY
Introduction: Lactate dehydrogenase (LDH) consists of five isoenzymes and is an important prognostic factor in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients. Our objective was to study the pattern of LDH isoenzymes in patients with NHL and its correlation with clinical pathological and biological tumor markers. *Methods:* We evaluated 67 newly diagnosed NHL patients clinically and histologically confirmed,previously untreated, HIV-negative and free from other diseases, during the period 1999-2004, the average follow-up time of 30 months (range 3-48), median age of 55 years (range 18-79), the International Prognostic Index (IPI) 60 (90%) of low risk and 7 (10%) of high risk. Serum and whole blood samples were collected for the determination of LDH, LDH isoenzymes, enzymes (AST, ALT, phosphatase alkaline), Beta 2 Microglobulin, CA125, and IL-6, sRαIL-2, C Reactive protein, serum albumin and ESR. Serum samples were processed from healthy controls in order to set reference values of LDH isoenzymes. *Results:* Serum levels of LDH and absolute values of LDH isoenzymes were significantly higher in patients compared to controls (p<0.001). Frequencies of high absolute values of LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 and LDH5 isoenzymes were significantly elevated in 25 (37%), 29 (43%), 32 (48%), 20 (39%) and 11 (16%) of cases, respectively. LDH1 activity associated and correlated with adverse clinical pathological, biological factors and high risk IPI, suggets that it is an indicator of cell turnover and disease activity. LDH2 changes reflected its association and correlation with clinical pathological and biological factors which are indicators of disease progression, tumor proliferative activity, adverse IPI and the patient's response to the illness. LDH3 was elevated with greater frecuency and its activity was associated with clinical pathological and biological prognostic factors reflecting the patient's response against the tumor, as well as inflammatory activity and disease extension. Its correlation with a high-risk IPI and altered biomarkers, suggested an indicator of tumor proliferative activity and patient involvement. Increased levels of LDH4 and the distribution pattern were associated and correlated with patient response against the tumor, high-risk IPI and the progression and spread of the disease,being expressed as a marker of cellular activity and anaerobic metabolism adaptation. Altered levels of LDH5 were associated and correlated with the patient's overall deterioration, their response to the disease, and the tumor`s proliferative activity and invasive potential; changes in the distribution of its activity suggests an adapted pattern to anaerobic metabolism in tumor tissues. *Conclusions:* Alterations in the pattern of LDH isoenzymes expressed as turnover markers and cell proliferative activity, metabolic adaptation and disease activity, would refine the information provided by the total serum LDH in patients with NHL and deepen our knowledge about tumor biology.

Keywords: LDH, LDH isoenzymes, Non Hodkgin Lymphoma.

Solicitar copia a: Priva Zabner de Oziel (privaoziel@hotmail.com)

Introducción

Los Linfomas No Hodgkin (LNH) comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides histológica y biológicamente diferentes que presentan una diversidad de cuadros clínicos y diferentes respuestas al tratamiento (1,2).

La enzima lactatodeshidrogenasa constituye uno de los componentes del Indice Pronòstico Internacional (IPI) en LNH y es considerada como un factor pronóstico adverso de la sobrevida en pacientes con esta patología (3-9).

Si bien la LDH total sérica es un factor pronóstico en LNH, existe poca información respecto al contenido sérico de las isoenzimas de LDH o sobre la significancia de sus alteraciones en esta malignidad.

Las deshidrogenasas de LDH comprenden una familia de 2-hidroxiácido-oxidoreductasas que simultánea, esteroespecíficamente y de forma reversible, interconvierten piruvato a lactato y NADH a NAD+. Esta reacción conocida como fermentación homoláctica anaeróbica, constituye un medio importante de regeneración de NAD+, permitiendo la continuación de la glicólisis. La LDH es una enzima esencial en la vía glicolítica de Embden –Meyerhof para la utilización de la glucosa, por lo que está presente prácticamente en todos los tejidos humanos donde ocurre la glicólisis, permitiendo generar un déficit temporal de oxígeno por acumulación de lactato, el cual es oxidado a piruvato cuando el oxígeno se hace accesible. Los niveles tisulares de la LDH son aproximadamente 500 veces mayor que los niveles séricos, por lo cual aun un pequeño daño tisular, puede determinar un incremento detectable de la LDH total en sangre; la técnica más específica para localizar el daño tisular es mediante el estudio de las isoenzimas de LDH (10-15).

La LDH es una molécula tetramérica compuesta por dos subunidades o isoformas polipeptídicas inmunológicamente distintas, conocidas como el monómero M ó A (abundante en músculo) y el monómero H ó B (abundante en corazón), también se ha identificado un tercer tipo, la forma X, restringida a los testículos. La isoforma M corresponde al gen A humano, localizado en el cromosoma 11p15.4 y está presente predominantemente en los tejidos anaeróbicos , tales como el músculo esquelético e hígado y la forma H corresponde al gen B humano, localizado en el cromosoma 12p12.2p12.1, predominante en tejidos aeróbicos tal como el músculo cardíaco. La combinación de las diferentes subunidades en tetrámeros híbridos o mezclados conforman las cinco isoenzimas de LDH: H4, MH3, M2H2, M3H y M4 presentando una estructura altamente conservada y se designan respectivamente LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5, de acuerdo a su movilidad electroforética de ánodo a cátodo (11-15).

Si bien, la enzima LDH sérica es considerada un marcador pronóstico de gran utilidad en malignidades hematológicas tales como LNH y mieloma múltiple (3,10,16,17), la información respecto a las modificaciones y alteraciones séricas del perfil de isoenzimas es escasa.

Los estudios de Paule y col. (18) sobre la actividad de las isoenzimas de LDH en malignidades hematológicas reportaron en LNH una disminución de la LDH1 y un incremento de LDH2, como un signo de evolución clínica hacia una fase más agresiva de la enfermedad o la ausencia de remisión clínica, aún sin observar variaciones significativas de la LDH total sérica y en los casos de leucemia linfocítica crónica y linfoma de Hodgkin no reportaron cambios significativos.

Por su parte Rotenberg y col. (19) reportaron niveles elevados de LDH sérica con predominio de las isoenzimas LDH2 y LDH3 como único signo y, además, de aparición más temprana en linfoma maligno oculto.

El grupo de Ricerca y col (20) analizaron el patrón sérico de las isoenzimas de LDH en un grupo de pacientes con LNH, al momento del diagnóstico, en recaída y remisión completa y su relación con el estadio clínico, el subtipo histológico y los síntomas generales. Los autores reportaron disminución de la LDH1 y aumento de las isoenzimas 3 y 4 respecto al grupo normal. Tanto la LDH total como las isoenzimas 1 y 4 se vieron influenciadas por el estadio clínico, grupo histológico y la presencia de síntomas generales. La isoenzima LDH3 se mantuvo elevada independientemente del estadio clínico, la histología y la presencia de síntomas generales, sugiriendo ser un marcador confiable de la presencia de enfermedad, mientras que la LDH total estaría más relacionada con la expansión del linfoma.

Otros trabajos reportan la aplicación de las isoenzimas de LDH como marcador predictivo de metástasis, con utilidad pronóstica e importancia para el monitoreo terapéutico. En tal sentido Dumontet y col. (21) evaluaron los perfiles y el valor pronóstico de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH. Los pacientes con incrementos de LDH sérica al momento del diagnóstico presentaron porcentajes y valores absolutos significativamente elevados de LDH2 y LDH3 respectivamente. Los

valores absolutos de LDH3 correlacionaron con el estado funcional alterado, estadio clínico avanzado e histología agresiva, mientras que, los porcentajes elevados de LDH2 solo correlacionaron con el estado funcional alterado.

Recientemente Bouafia y col. (22) analizaron el perfil de las isoenzimas de LDH y su valor pronóstico en pacientes con malignidades hematológicas. Sus resultados mostraron niveles elevados de la isoenzima LDH3 y porcentajes de LDH2 como factores pronósticos de una menor sobrevida global en los pacientes con LNH. Según el análisis univariado de la sobrevida, los valores elevados de LDH3, los altos porcentajes de LDH2, la LDH total, el estadio clínico y la agresividad del tumor, fueron variables pronósticas de la sobrevida.

Una serie de investigaciones han mostrado la actividad de las isoenzimas de LDH como indicador de alteraciones celulares y metabólicas, así como de marcador pronóstico (21-26). Jurisic y col. (27-30) reportaron cambios en la actividad intracelular de la LDH y sus isotipos (H y M) asociados con la inducción de apoptosis y alteración de la membrana celular en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con linfoma.

El gran interés en profundizar el conocimiento sobre los biomarcadores pronósticos, se origina de la heterogeneidad pronóstica observada dentro de los grupos de riesgo del IPI y del mejor entendimiento de la biología de los linfomas, lo cual es crítico para determinar el pronóstico de la enfermedad.

La evaluación y aplicación de las isoenzimas de LDH y el de una serie de marcadores tumorales en el estudio del LNH, es importante como expresión del comportamiento biológico de esta enfermedad. Profundizar el estudio del patrón de las isoenzimas de LDH en pacientes con Linfoma No Hodgkin, su asociación y correlación con otros marcadores tumorales,. contribuiría a afinar y complementar la información del IPI, los parámetros clínico-patológicos y biológicos de la enfermedad, además de estudiar su comportamiento en poblaciòn venezolana.

Métodos

Pacientes

Se evaluaron 67 pacientes con diagnóstico de LNH confirmados clínica e histopatológicamente, quienes asistieron a la Consulta de la Comisión de Linfoma en el Instituto de Oncología y Hematología (IOH), MPPS-UCV, durante el periodo 1999-2004, siendo el tiempo promedio del seguimiento de la enfermedad de 30 meses (rango 3-48 meses). Se incluyeron pacientes que no recibieron tratamiento previo para la enfermedad, con serología negativa para VIH, excluyéndose los pacientes con LNH con enfermedades asociadas tipo diabetes, insuficiencia renal u otras. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del IOH.

Las características clínico-patológicas consideradas como factores pronósticos comprendieron: sexo, edad, histología del tumor (Clasificación OMS) (31), estadio clínico (Clasificación ANN ARBOR modificada en Costwolds) (32), presencia de síntomas B (fiebre,sudoración nocturna y pèrdida de peso), estado funcional escala Karnofsky (33), número de regiones ganglionares, afectación extraganglionar, enfermedad voluminosa, compromiso de médula ósea, compromiso abdominal. De acuerdo al IPI (3) se clasificaron en grupos de riesgo: Bajo riesgo (bajo riesgo e intermedio bajo) y Alto riesgo (riesgo intermedio alto y alto riesgo). En la pràctica clínica con fines pronósticos los LNH se clasificaron en las categorías de linfomas indolentes y agresivos (2).

Estrategia de tratamiento y evolución clínica.

Los pacientes se trataron con esquemas de primera línea establecidos internacionalmente para LNH (32) y el seguimiento clínico de los pacientes se evaluó de acuerdo a los siguientes criterios:

- Remisión completa (RC): Se define como la desaparición de todas las manifestaciones clínicas y signos de la enfermedad, con normalización de las alteraciones radiológicas y de los datos bioquímicos que fueron anormales antes de iniciar la quimioterapia. Una vez finalizado el tratamiento, la respuesta se mantendrá, al menos 3 meses. En caso de infiltración de la médula ósea, la desaparición de la enfermedad morfológica/histológica, deberá ir unida a normalización de las cifras hematológicas periféricas (> 12 g/dl de Hemoglobina, > 100.000 plaquetas /mm3 y >1.500 granulocitos/mm3).
- Remisión completa incierta (RCi): Se define como la desaparición de todos los síntomas y casi todas las masas medibles en dos diámetros (reducción en más del 75% por TAC) pero con persistencia de anomalías radiológicas por ese método (radiología o tomografía). Sin embargo, la Gammagrafía por Galio o el PET-scan deberán ser negativos.
- Remisión parcial (RP>50%): Remisión parcial se define como una reducción del 50% o más de la enfermedad medible durante al menos 1 mes. Debe haber ausencia de citopenias periféricas.

- Enfermedad estable (EE): Regresión en términos de enfermedad medible inferior al 50%, sin nuevas manifestaciones y si hay progresión, esta será menor del 25%.
- Fracaso y/o progresión (F): Aumento en la frecuencia o en la severidad de los síntomas, o aparición de nuevas áreas afectadas, o progresión de más de un 25% en las localizaciones tumorales iniciales.
- No respuesta: No variación de las manifestaciones clínicas y signos de la enfermedad inicial con el tratamiento aplicado.
- Sobrevida global (SG): Es el tiempo transcurrido desde que se hace el diagnóstico y se inicia o no un tratamiento hasta la muerte ocasionada por la enfermedad inicial que se está evaluando o hasta la fecha del último control.
- Sobrevida libre de enfermedad (SLE): Es el tiempo transcurrido entre la fecha de RC y la nueva aparición de síntomas y signos de enfermedad (recaída).
- Sobrevida libre de falla al tratamiento: Es el tiempo transcurrido desde que se inicia el tratamiento hasta la recaída o muerte.

Grupo Control

Para la determinación de los valores de referencia de la LDH total sérica e isoenzimas de LDH en la población venezolana se procesaron 122 muestras de controles provenientes de donantes de Banco de Sangre e individuos aparentemente sanos, con edades comprendidas entre 18-74 años, de los cuales 60(49%) fueron de sexo femenino y 62(51%) de sexo masculino.

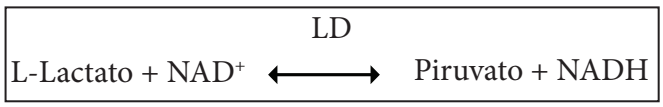
Muestras

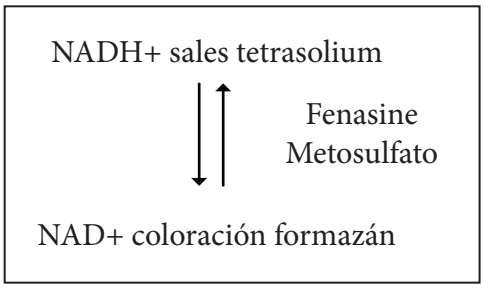
Las muestras de sangre se recolectaron por punción venosa, para obtener suero y sangre total, una sola toma de muestra por paciente al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento. Las muestras de suero se separaron a partir de las muestras de sangre, recolectada en tubos sin anticoagulante, por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos a 20°C. Los sueros se procesaron inmediatamente para la determinación de las enzimas hepáticas y las isoenzimas de LDH. Para la determinación de la LDH total e isoenzimas de LDH, los sueros se conservaron a la temperatura de 15-30°C ó 2-6°C hasta 48 horas, dada la inestabilidad de las fracciones y la sensibilidad de las mismas a la temperatura de congelación. Para la determinación de los otros marcadores biológicos séricos las muestras de suero se congelaron a –70°C, repartidas en fracciones de 0.5 ml. Para la obtención de sangre total se obtuvieron las muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA para la determinación de los marcadores hematológicos y la velocidad de sedimentación globular (VSG).

Determinación de Marcadores Biológicos:

Isoenzimas de LDH: Se realizó la determinación cualitativa y cuantitativa de las isoenzimas de LDH aplicando el método de electroforesis en gel de agarosa, según el procedimiento del sistema Helena Titan Gel (Helena Laboratorios Catálogo N° 3043). Este método provee mayor información que otros, porque permite la separación de las cinco fracciones de LDH sin riesgo de superposición de las mismas. El medio de soporte utilizado incluyó acetato de celulosa, agar agarosa y geles de acrilamida.

- El fundamento de la determinación de las isoenzimas de LDH se basó en la separación de acuerdo a su movilidad electroforética en gel de agarosa. Posteriormente cada isoenzima se detectó colorimétricamente, mediante la reducción de la sal tetrazolium con la formación de una coloración formazán.





Reactivos: Placas Titán Gel LD Isoenzimas (Placas de agarosa en buffer Barbital), Reactivo Titan Gel LD Isoenzima(conteniendo NAD Lithium lactato, NBT y PMS reconstituido en 1 ml de diluente),Titan Gel Isoenzima diluente (Buffer AMP, Bicina, Barbital, Aspartato y Azida de Na),. Buffer Titan Gel LD Isoenzima: AMPD, Bicina, Barbital y Aspartato, Azida de Na, pH 8.1-8.3.

Procedimiento: Se preparó la cámara de electroforesis añadiendo 35 ml del buffer diluido en cada canal interno de la cámara y una cámara húmeda a 45°. Se aplicaron 3µl de la muestra en cada pozo del gel de agarosa, previa colocación de la plantilla. Se colocó la placa portadora del gel en la cámara electroforética y se realizó la corrida a 100

voltios por 15 minutos. El reactivo de isoenzimas LD se preparó cinco minutos antes de culminar la corrida electroforética. Para la visualización de las bandas se colocó la placa de la corrida sobre una lámina de vidrio, se vertió el reactivo LD sobre el gel en el extremo anódico y se extendió con una pipeta serológica a lo largo de toda la superficie de la placa. Luego de 15 segundos se corrió la pipeta en sentido contrario para eliminar el exceso del reactivo. Se colocó la placa en la cámara de incubación e incubó a 45ºC por 25 minutos. Al final de este período, se lavó la placa en ácido acético al 10% por 2 minutos, luego de remover la placa y colocarla sobre una superficie de vidrio y cubrir el gel con papel de filtro humedecido en ácido acético al 10 % y tres toallas de papel se colocó en una prensa para someterlo a presión por 3 a 5 minutos. Posteriormente, eliminado el papel de filtro y las toallas de papel, se lavó la placa con ácido acético al 10% por un minuto y secó a 60ºC por cinco minutos. La evaluación cualitativa se realizó mediante la visualización de las bandas y la evaluación cuantitativa mediante la lectura de la placa e integración de las bandas en un densitómetro a 590 nm. (Densitómetro Helena Scan 2 (Cat N° 1260), para lo cual se introdujo el valor de LDH total para calcular los valores absolutos y porcentuales de las isoenzimas. La interpretación del patrón de isoenzimas de LDH se realizó en conjunto con el valor de la actividad de LDH total sérica.

Valores de referencia: En el grupo control (n=122) se determinaron los rangos referenciales de las isoenzimas de LDH expresados en valores absolutos y porcentuales. **LDH1:** 18.4-71.7 U/l , 18.6-47.7% ; **LDH2:** 28.1-90.1U/L , 26.2-47.9%; **LDH3:** 14-47.5 U/L , 11.6-27.2% ; **LDH4:** 3.1-19.2U/L, 2.8-13.5%; **LDH5:** 2.3- 17.2 U/L, 2.0-12.5%. El criterio de corte o cut off correspondió al límite superior del rango de referencia establecido para cada isoenzima.

- **Lactato deshidrogenasa (LDH):** Método LDH-L cinético UV (Invelab Catálogo N° 89289). Valores de referencia: 80-285 U/L
- **Aspartato amino transferesa (AST):** Método cinético UV (Roche Catálogo 851121). Valores de referencia: ≤38 U/L
- **Alanino amino transfereasa (ALT):** Método cinético UV (Roche Catálogo 851132). Valores de referencia: ≤ 41 U/L
- **Fosfatasa alcalina (F. ALC):** Método cinético colorimétrico (Roche Catálogo 816388). Valores de referencia: ≤ 290 U/L
- **Albúmina sérica:** Método Verde Bromocresol (Colorimétrico).Autoanalizador Hitachi modelo 704 (Roche). Valores de referencia: 3.4-4.8 g/l
- **Antígeno de Cáncer CA 125:** Se determinó mediante la tecnología de inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA) empleando el sistema IMX (Abbott Laboratorios Catálogo N° 69-4123/R3). Valores de referencia: ≤35 u/ml
- **B2 microglobulina (B2M):** Se determinó aplicando la tecnología de inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA) empleando el sistema IMX (Abbott Laboratorios Catálogo N° 69-2197/R11). Valores de referencia: ≤ 3.4 mg/l.
- **Interleuquina-6 (IL-6):** Se empleó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) método sándwich, (Quantikine Catálogo N° D6050 RD Systems). Valores de referencia: 0 – 1.99 pg/ml (34).
- **Receptor alfa soluble de Interleuquina 2 (sRα IL-2):** Se aplicò el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA) tipo sándwich, (Quantikine Catálogo N° DR2A00 RD Systems). Valores de referencia: 320-2000 pg/ml (35).
- **Proteína C Reactiva (PCR):** Se utilizó la prueba de aglutinación látex directo en placa, semicuantitativo. Valores de referencia: ≤6 mg/l. (Wiener LAB Catalogo N° 1683152).
- **Marcadores hematológicos:** Hematologia completa. Analizador Cell Dyn 1.400 (Laboratorios Abbott).- VSG. Método: Wintrobe 1 hora. Valores de referencia: 0-15 mm

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas Statgraphics Statistical, Graphics Systems Version 6, y Graphpad Software V2 05ª Basic Statistics, Inc.

Se aplicaron las siguientes pruebas estadísticas con un nivel de significancia p=0.05

- Análisis exploratorio de los datos (EDA): Histograma de frecuencia para evaluar la distribución de la normalidad de los datos, análisis de componentes principales para la representación gráfica de la correlación multifactorial de las variables biológicas.
- Análisis no paramétrico: Prueba de U Mann Whitney para comparar el comportamiento de una variable entre dos grupos, expresado por el valor de la mediana (M) y la prueba de Spearman para determinar la correlación entre dos variables diferentes expresada por el Coeficiente de Correlación (r) de Spearman.

Resultados

Características clínico-patológicas y biológicas de los pacientes con LNH: La Tabla I presenta las características clínico-patológicas de los pacientes al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento. Se evaluaron 67 pacientes con edades comprendidas entre 18 a 79 años (Mediana 55 años), siendo el tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad de 30 meses (rango 3-48 meses). Tomando en cuenta los factores pronósticos adversos, el 58% incidió en el sexo masculino y el 31% en pacientes mayores de 60 años. Según la clasificación de la OMS, el 60% de los linfomas correspondió al tipo histológico difuso de células grandes tipo B (LDCGB) y el 12% de los pacientes presentaron el tipo folicular. De acuerdo a las categorías pronósticas, el 73% de los pacientes presentaron LNH agresivos, que comprenden histológicamente a los linfomas de intermedio y alto grado de malignidad, con mayor tendencia al crecimiento y diseminación (difuso de células grandes tipo B, células del manto, parecido al Burkitt, células grandes anaplásicas T, células T periféricas e inmunoblástico) y el 27% correspondió a LNH indolentes, histológicamente de bajo grado de malignidad y crecimiento lento (folicular, linfocítico pequeño, tipo maltoma y micosis fungoides).

El 60% de los pacientes presentaron estadio clínico III - IV (enfermedad avanzada) y el 9% estado funcional alterado (Karnosfky <70%). El 66% de los pacientes presentaron enfermedad extranodal en más de un área y enfermedad voluminosa mayor de 10 cm., el 30% presentó más de 4 áreas ganglionares. La presencia de síntomas B, el compromiso de médula ósea y la enfermedad abdominal se detectaron en el 43%, 21% y 59% de los pacientes respectivamente. De acuerdo al Índice Pronóstico Internacional (IPI), el 90% de los linfomas fueron de bajo riesgo, incluyendo los de bajo riesgo y riesgo intermedio bajo, mientras que el 10% de los linfomas fueron de alto riesgo, agrupando a los de riesgo intermedio alto y alto riesgo.

En relación a los marcadores biológicos, 17(25%), 8(12%), 8(12%), 11(16%), 16(24%) y 30(45%) de los pacientes presentaron respectivamente valores elevados de B2M, AST, ALT, FALC, CA125, PCR y 16 (24%) de los pacientes cursaron con concentraciones disminuidas de albúmina sérica. Respecto a la LDH, 9(13%) presentaron valores anormales, siendo el criterio de anormalidad los valores de la actividad enzimática por encima del 100% del límite superior del rango de referencia, de acuerdo a lo establecido en el IPI (3). Se determinaron niveles elevados de IL-6 y sRα IL-2 en 38(66%) y 25(58%) de los casos respectivamente, habiendo 6 y 24 muestras respectivamente con valores desconocidos por no cumplir con las condiciones adecuadas de almacenamiento. Los valores de VSG resultaron aumentados en 30(79%) del grupo evaluado, habiendo 29 muestras con valores desconocidos de este parámetro.

Comparación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH en pacientes con LNH y controles sanos: La Tabla II presenta los niveles séricos de la actividad de LDH total e isoenzimas de LDH de los pacientes comparados con el grupo control de individuos sanos. Los pacientes con LNH al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento, presentaron niveles de LDH total significativamente superiores a los del grupo control ($p<0.001$). Los niveles séricos de las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5, expresados en valores absolutos, resultaron significativamente elevados en los pacientes respecto al grupo control ($p<0.001$).

El análisis comparativo de los valores de la mediana expresado en porcentaje del valor de la LDH total, muestra la actividad de LDH1 significativamente inferior en los pacientes respecto a los controles ($p= 0.02$). Por el contrario, se obtuvieron porcentajes significativamente elevados de LDH2 ($p=0.04$), LDH3 ($p<0.01$) y LDH5 ($p=0.045$) en los pacientes respecto al grupo control y no se obtuvieron diferencias respecto a LDH4.

Niveles séricos de LDH total y perfil de Isoenzimas de LDH en pacientes con LNH: De los 67 pacientes evaluados 9(13%) presentaron niveles séricos de LDH total significativamente elevados y 58(87%) presentaron niveles por debajo del criterio de corte ($p<0.001$) (Tabla III). Respecto a las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5, la distribución en valores absolutos indicó niveles significativamente elevados ($p<0.0001$) en el 37%, 43%, 48%, 39% y 16% de los casos respectivamente. La distribución porcentual del perfil de isoenzimas reveló valores elevados de LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5 en el 1%, 4%, 10%, 4% y 4% respectivamente. Si bien el análisis comparativo de las medianas de los valores en porcentajes resultó significativo, la distribución de los valores se basa en grupos disímiles no comparables entre sí respecto al tamaño de la muestra (datos no mostrados).

En relación al grupo de pacientes con niveles elevados de LDH total (n=9; 13%), la incidencia de los niveles elevados de las isoenzimas de LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5, en este grupo

Tabla I. Características clínico-patológicas de los pacientes con LNH

Características		N=67	%(100)
Edad (mediana 55, rango 18-79 años)	≤ 60 años	46	(67)
	> 60 años	21	(33)
Sexo	Masculino	39	(42)
	Femenino	28	(58)
Clasificación Histológica	Difuso de células grandes	40	(60)
	Células del manto	1	(1)
	Parecido Burkitt	1	(1)
	Células grandes anaplásicas T	3	(5)
	Células T periféricas	2	(3)
	Inmunoblástico	2	(3)
	Folicular	8	(12)
	Linfocitico pequeño	6	(9)
	Tipo maltoma	2	(3)
	Micosis fungoide	2	(3)
Categorías pronósticas	Agresivos	49	(73)
	Indolentes	18	(27)
Estadio Clínico	I-II	27	(40)
	III-IV	40	(60)
Estado funcional Karnosfky	< 70%	6	(9)
	≥ 70%	61	(91)
Enfermedad extraganglionar	≤ 1	23	(34)
	> 1	44	(66)
Síntomas B	No	38	(57)
	Si	29	(43)
Nº regiones ganglionares	0-4	47	(70)
	>4	20	(30)
Enfermedad voluminosa	≤10 cm	23	(34)
	> 10 cm	44	(66)
Compromiso de médula ósea	No	53	(79)
	Si	14	(21)
Enfermedad abdominal	No	27	(41)
	Si	40	(59)
IPI	Bajo riesgo	60	(90)
	Alto riesgo	7	(10)

IPI: Índice Pronóstico Internacional Bajo riesgo (bajo e intermedio bajo) Alto riesgo (intermedio alto y muy alto riesgo)

correspondió a 7(78%), 9(100%), 9(100%), 8(89%) y 5(56%) respectivamente (datos no mostrados).

Asociación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH con las características clínico-patológicas de los pacientes con LNH: Las Tablas IV y V muestran el perfil de isoenzimas de LDH expresado en valores absolutos y porcentajes, relacionado con las características clínico-patológicas de los pacientes. De acuerdo a los grupos etarios, no se obtuvieron modificaciones en la actividad de LDH total y del patrón de isoenzimas de LDH. Observamos niveles absolutos significativamente superiores de LDH1 ($p<0.0001$) y LDH2 ($p=0.02$) en el grupo de pacientes con estadio clínico III - IV respecto al grupo con estadio clínico I y II, de modo que éstas isoenzimas son las que influirían sobre la significancia de la LDH total ($p=0.018$) entre los grupos comparados; por el contrario no se observaron variaciones en los niveles absolutos de

Tabla II. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH en pacientes con LNH y controles sanos

Variables		Pacientes (n=67)		Controles (n=122)		
		(M)	Rango Referencia	(M)	Rango Referencia	p*
LDHT	U/L	204	(83-1371)	131	(80-285)	<0.001
LDH1	U/L	55.4	(4.5-596)	36.3	(18.4-71.7)	<0.001
	%	25.0	(8.0 - 54)	27.8	(18.6-47.7)	0.02
LDH2	U/L	78.1	(24.1-535.5)	50.5	(28.1-90.1)	<0.001
	%	39.4	(22.2-50.2)	37.6	(26.2-47.9)	0.04
LDH3	U/L	44.1	(16.1-394.2)	28.8	(14-47.5)	<0.001
	%	21.9	(4.6-118.8)	14.0	(11.6-27.2)	<0.001
LDH4	U/L	16.0	(4.2-260.6)	8.4	(3.1-19.2)	<0.001
	%	6.7	(2.8-21.4)	6.4	(2.8-13.5)	0.47
LDH5	U/L	9.3	(4.0-86.5)	6.2	(2.3-17.2)	<0.001
	%	4.6	(1.0-26.8)	3.9	(2.0-12.9)	0.045

LDH: lactato deshidrogenasa LNH: Linfoma No Hodgkin p significativa = 0,05
p *: U Mann-Whitney. M= Mediana

LDH3, LDH4 y LDH5 asociadas con la progresión de la enfermedad. El análisis porcentual reveló valores significativamente elevados de LDH4 y LDH5 ($p<0.0001$) asociados al grupo de pacientes con estadio clínico III – IV.

La actividad de la LDH total y de las cinco isoenzimas en valores absolutos resultó significativamente aumentada ($p \leq 0.05$) en los pacientes con estado funcional alterado comparado con el grupo de pacientes con estado funcional normal, siendo la de menor significancia la isoenzima LDH5. El análisis de los valores en porcentaje no arrojó resultados significativos.

La asociación de la actividad de la LDH total e isoenzimas de LDH con la enfermedad extraganglionar no arrojó resultados significativos en valores absolutos. Sin embargo, los porcentajes de las fracciones de las isoenzimas de LDH3 y LDH4 fueron significativamente superiores ($p=0.05$) en los pacientes que presentaron más de una región extranodal. No se observaron variaciones asociadas a esta condición para las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH5 .

Los pacientes que presentaron síntomas B, expresaron niveles absolutos significativamente elevados de LDH total ($p=0.001$), LDH1 ($p=0.05$), LDH2 ($p=0.02$), LDH3 ($p=0.05$) y LDH4 ($p<0.0001$), respecto a los pacientes con ausencia de síntomas B; no se detectaron diferencias entre ambos grupos relacionadas con LDH5 y la distribución en porcentajes no presentó modificaciones significativas.

De las cinco isoenzimas, solamente el incremento de la actividad en valor absoluto de la LDH1 se asoció con la presencia de más de 4 regiones ganglionares.

Respecto a la presencia de enfermedad voluminosa, no se observaron variaciones significativas de LDH total e isoenzimas de LDH expresadas en valores absolutos. El patrón en porcentaje sólo reveló valores de LDH5 significativamente elevados ($p=0.028$) en los pacientes con enfermedad voluminosa mayor de 10 cm., comparados con el grupo de pacientes con enfermedad voluminosa <10 cm. No se obtuvieron variaciones en porcentajes en el patrón de isoenzimas de LDH1, LDH2, LDH3 y LDH4 asociadas a esta condición. Los niveles absolutos de la LDH1 se asociaron significativamente con los pacientes que presentaron compromiso de médula ósea ($p=0.01$) y no se obtuvieron variaciones significativas para LDH total y el resto de las isoenzimas relacionadas con dicha condición. No se observaron variaciones significativas expresadas en porcentajes.

En el grupo de pacientes que cursaron con enfermedad abdominal solo se detectaron valores absolutos significativamente elevados de LDH2 ($p=0.02$) respecto a los pacientes que no presentaron compromiso abdominal. La distribución en porcentaje de la isoenzima LDH5 resultó significativamente superior ($p=0.048$) en el grupo de pacientes con enfermedad abdominal y tampoco incidió sobre el valor de la LDH total. No se detectaron cambios en porcentajes en

las fracciones de LDH1, LDH2, LDH3 y LDH4 asociados a esta condición.

En relación al Índice Pronóstico Internacional (IPI), al comparar los valores entre los grupos de alto y bajo riesgo, observamos que el grupo de alto riesgo se asoció con niveles significativamente superiores de LDH total (p<0.0001) y valores absolutos elevados de LDH4 (p=0.02). No se detectaron variaciones en valor absoluto para LDH1, LDH2, LDH3 y LDH5 relacionadas a los grupos de riesgo. En este caso la significancia de la LDH total está influenciada principalmente por la isoenzima LDH4. La distribución de los valores en porcentajes, reveló para el grupo de alto riesgo valores significativamente superiores en la actividad de LDH1 (p=0.039) y LDH4 (p=0.05) comparado con el grupo de bajo riesgo. No se detectaron variaciones en porcentaje entre ambos grupos referentes a las isoenzimas LDH2, LDH3 y LDH5.

Asociación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH de acuerdo a los marcadores biológicos en pacientes con LNH: En la Tabla VI observamos la actividad de la LDH total y del patrón de las isoenzimas de LDH reportado en valores absolutos y porcentuales, de acuerdo a los niveles de B2M, AST, ALT, F.ALC. y CA-125.

Respecto a la B2M, los niveles elevados de LDH total sérica se asociaron con concentraciones aumentadas de B2M (p=0.01). Se obtuvieron valores absolutos de LDH1 (p=0.0001) y LDH2 (p=0.02) asociados significativamente a esta condición.

No se observaron modificaciones significativas para el perfil de las isoenzimas LDH expresado en porcentaje.

En relación a la enzima AST, tanto la LDH total como la actividad en valores absolutos de las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5 se asociaron significativamente (p<0.05) con niveles elevados de AST. La distribución en porcentajes no reveló variaciones significativas respecto a la actividad de AST.

No se observaron modificaciones en la actividad de LDH total y el perfil de isoenzimas de LDH asociadas a la actividad de las enzimas ALT y F.ALC.

Los niveles de LDH total se relacionaron significativamente con concentraciones elevadas

Tabla III. Niveles séricos de LDH total y perfil de isoenzimas de LDH en pacientes con LNH

Variables		N	(%)	M	Rango	*p
LDHT	U/L					
≤ 570		58	(87)	186	(83-556)	
>570		9	(13)	879	(580-1371)	<0.0001
LDH	U/L					
≤71.7		42	(63)	43	(4.5-65)	
>71.7		25	(37)	95	(76.9-596)	<0.0001
LDH2	U/L					
≤90.1		38	(57)	55	(24.1-87)	
>90.1		29	(43)	163	(106.9-535)	<0.0001
LDH3	U/L					
≤47.5		35	(52)	29	(16.1-44.1)	
>47.5		32	(48)	87	(47.6-394.2)	<0.0001
LDH4	U/L					
≤19.2		41	(61)	11	(4.2-19.0)	
>19.2		20	(39)	31	(20.5-260.6)	<0.0001
LDH5	U/L					
≤17.2		56	(84)	8.4	(3.9-16.1)	
>17.2		11	(16)	22	(18-86.5)	<0.0001

M: Mediana
p significativa = 0,05
p*: U Mann-Whitney
N: n° de pacientes
LNH: Linfoma No Hodgkin
LDH: Lactato deshidrogenasa
(%): Frecuencia

Tabla IV. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a las características clínico-patológicas en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT (M) U/L	LDH1 (M) U/L	%	LDH2 (M) U/L	%	LDH3 (M) U/L	%	LDH4 (M) U/L	%	LDH5 (M) U/L	%
Edad												
≤60 años	46	202	55.8	24.1	78.9	39.4	46.4	16.4	16.2	6.1	9.6	3.8
>60 años	21	203	44.9	23.4	69.2	39.5	43.1	11.9	12.4	6.9	8.5	4.2
p*		0.41	0.21	0.44	0.62	0.97	0.75	0.15	0.56	0.76	0.27	0.88
Estadio Clínico												
I-II	27	163	41.9	24.9	60.5	37.8	34.7	12.5	13.3	5.7	9.3	3.4
III-IV	40	289.5	64.9	25.1	115.3	41.5	65.4	16.0	17	8	9.1	5.6
p*		0.018	<0.0001	0.76	0.02	0.08	0.15	0.37	0.48	<0.0001	0.99	<0.0001
Estado Funcional Karnosfky												
≥70	61	199	53.5	25.5	77.2	39.9	42.9	13.2	14.1	6.7	9	4.1
<70	6	887.5	116.6	16.9	381.9	36.7	214.6	15.2	43.9	8.5	13.1	2
p*		<0.0001	0.02	0.11	0.01	0.66	<0.0001	0.32	<0.0001	0.87	0.05	0.11
Enfermedad Extraganglionar												
≤1	3	203	53.2	39.4	69.4	13.5	47.6	6.1	16.4	6.1	9.9	4.4
>1	44	206	55.8	35.0	79.8	14.2	43.5	7.5	15.1	7.5	8.8	3.6
p*		0.92	0.76	0.87	0.62	0.67	0.72	0.05	0.29	0.05	0.53	0.57
Síntomas B												
Ausente	38	171	45.9	24.6	67.4	41.7	34.4	16.4	11.4	6.7	8.5	3.4
Presente	29	312.5	65.0	25.5	116.8	38.1	65.9	11.3	20.5	6.7	10.7	4.4
p*		0.01	0.05	0.42	0.02	0.07	0.05	0.08	<0.0001	0.36	0.14	0.10

p significativa = 0,05 p*: U Mann-Whitney LNH: Linfoma No Hodgkin M:Mediana
LDH: Lactato deshidrogenas U/L: Unidades en valor absoluto %: Valor porcentual

de CA-125 (p<0.0001). El patrón de las cinco isoenzimas de LDH expresado en valores absolutos mostró el mismo comportamiento: LDH1 (p=0.01), LDH2 (p=0.01), LDH3 (p=0.05), LDH4 (p<0.0001), y LDH5 (p<0.0001). El análisis del patrón de isoenzimas expresado en porcentaje no mostró variaciones significativas.

La Tabla VII presenta el comportamiento de la LDH total y las isoenzimas de LDH de acuerdo a los valores de la PCR, IL-6, sRαIL-2, VSG y albúmina sérica.

La actividad de la LDH total se asoció significativamente con niveles elevados de la PCR (p= 0.014). Respecto a las isoenzimas de LDH, los valores absolutos elevados de LDH2 (p=0.013) y porcentajes aumentados de LDH3 (p=0.0001) se asociaron significativamente a concentraciones elevadas de PCR.

En relación a la IL-6, los niveles de LDH total se asociaron significativamente (p=0.014) con concentraciones aumentadas de esta citoquina. El patrón de isoenzimas de LDH mostró valores absolutos de LDH2 asociados significativamente con niveles elevados de IL-6 (p=0.014). No se observaron modificaciones porcentuales significativas del perfil de isoenzimas asociadas a las concentraciones de IL-6.

El patrón de isoenzimas de LDH no mostró modificaciones significativas asociadas a las concentraciones del sRαIL-2.

Respecto a la VSG, solo se obtuvieron porcentajes significativamente elevados de LDH3 (p<0.0001) asociados a valores aumentados de VSG. No se observaron diferencias en el patrón de las isoenzimas de LDH en valores absolutos y tampoco para la actividad de la LDH total relacionadas con los valores de la VSG.

En relación a la albúmina sérica, no se obtuvieron modificaciones de la actividad de la LDH total y del patrón de isoenzimas de LDH expresados en valores absolutos. El patrón de isoenzimas de LDH expresado en porcentajes, reveló valores de LDH3 significativamente aumentados (p<0.0001) relacionados con concentraciones disminuidas de la albúmina sérica.

Tabla V. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a las características clínico- patológicas en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT (M) U/L	LDH1 (M) UL	%	LDH2 (M) U/L	%	LDH3 (M) U/L	%	LDH4 (M) U/L	%	LDH5 (M) U/L	%
N° regiones ganglionares												
0-4	47	200	46	24.6	74	23	44	39	16	11	9.7	7.0
> 4	20	261	65.0	25.5	105	26	49	40	18	19	9.3	6.0
p*		0.19	0.05	0.59	0.12	0.09	0.85	0.12	0.59	0.16	1.0	0.16
Enfermedad Voluminosa												
≤10 cm	23	169	43.8	27.5	57.3	38.9	33.1	13.4	12.7	6.8	9.1	3.5
> 10 cm	44	241	55.8	23.8	96.3	41.7	59.2	15.4	17.6	6.5	9.4	5.5
p*		0.45	0.25	0.1	0.09	0.08	0.21	0.53	0.23	0.98	0.98	0.028
Compromiso Médula ósea												
Ausente	53	192	45.5	23.3	77.2	39.1	44.1	12.5	16	7.0	8.3	4.3
Presente	14	304.5	83.3	26.9	129.7	41.7	53.5	16.6	17.6	5.8	1.0	3.6
p*		0.66	0.01	0.30	0.4	0.70	0.92	0.38	0.11	0.44	0.11	0.47
Enfermedad Abdominal												
Ausente	26	169	43.6	23.3	66.5	37.9	33.8	13.3	13.4	7.1	9.1	3.8
Presente	39	241	56.2	25.5	108.9	40.9	64.2	16.4	17.4	6.3	9.7	5.6
p*		0.66	0.4	0.5	0.02	0.09	0.92	0.29	0.11	0.19	0.11	0.048
IPI												
Bajo Riesgo	60	176	55.5	23.9	67.5	39.3	51.6	14.0	10.7	4.6	9.3	3.9
Alto Riesgo	7	375	46.3	30.9	82.1	45.2	31.6	12.0	16.9	6.7	8.2	4.3
p*		<0.0001	0.9	0.039	0.44	0.29	0.06	0.65	0.02	0.05	0.58	0.63

p significativa = 0,05 p*: U Mann-Whitney IPI: Índice Pronostico Internacional
LNH: Linfoma No Hodgkin M: Mediana Bajo riesgo: bajo e intermedio bajo
Alto riesgo: Intermedio alto y alto riesgo. U/L: Unidades en valor absoluto %: Valores porcentuales

Correlación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH con las características clínico-patológicas en los pacientes con LNH: En la Tabla VIII observamos una correlación significativa y directa de los niveles séricos de la LDH total (p=0.012) y de las isoenzimas LDH1 (p=0.002) y LDH2 (p=0.02), pero no de las LDH3, LDH4 y LDH5, con la progresión de la enfermedad. Los niveles de la enzima LDH total y de las cinco isoenzimas de LDH correlacionaron significativamente de forma inversa ($p \leq 0.05$) con el estado funcional de los pacientes, correspondiendo a la isoenzima LDH3 el mayor factor de correlación y de mayor significancia (p=0.002). En relación al número de regiones ganglionares, el compromiso de médula ósea y la enfermedad abdominal, solo la isoenzima LDH1 mostró correlación directa y significativa (p=0.01) con dichas condiciones. La LDH total correlacionó de forma directa y significativa con síntomas B ($p< 0.01$) pero no así las isoenzimas y no se observó correlación alguna con enfermedad voluminosa.

Respecto al IPI, el análisis reveló una correlación significativa entre la actividad de la LDH total (p=0.04), LDH2 (p=0.001), LDH3 (p=0.02) y LDH4 (p=0.01) con esta condición, reflejando una influencia desfavorable o negativa sobre el pronóstico de la enfermedad. Las isoenzimas LDH1 y LDH5 no correlacionaron con esta variable.

Correlación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH con los marcadores biológicos en pacientes con LNH: El análisis entre los niveles de LDHT y las isoenzimas de LDH con las concentraciones de B2M (Tabla IX) demostró una correlación directa y significativa de los niveles de LDH total (p=0.0001), LDH1 (p=0.0001), LDH2 (p<0.0001), LDH3 (p=0.001), LDH4 (p=0.002) y LDH5 (p=0.005). Así mismo, observamos una correlación determinante de una influencia directa y significativa de los niveles de LDH total (p=0.01), LDH1 (p= 0.0002), LDH2 (p=0.002), LDH3 (p=0.005), LDH4 (p=0.0005) y LDH5 (p=0.005) con la actividad de la AST.

Tabla VI. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a los marcadores biológicos en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT (M) U/L	LDH1 (M) UL	%	LDH2 (M) U/L	%	LDH3 (M) U/L	%	LDH4 (M) U/L	%	LDH5 (M) U/L	%
B2M mg/l												
≤3.4	50	180	45.6	25.7	71.5	38.9	40.4	13.0	13.8	5.7	8.3	4.45
> 3.4	17	376	91.9	24.6	157.9	41.9	70.4	16.5	19.9	6.9	10	3.2
p*		0.01	>0.0001	0.71	0.02	0.09	0.31	0.39	0.11	0.4	0.11	0.11
AST U/L												
≤38	59	192	46.7	21.6	71.5	39.5	40.4	13.9	15.1	6.9	9.1	4.1
>38	8	386	91.9	25.8	157.9	39.44	86.5	14	26.6	6.7	15.1	3.9
p*		0.01	0.02	0.94	0.02	0.36	0.04	0.94	0.04	0.45	0.03	0.84
ALT U/L												
≤ 41	59	199	50.1	25.2	75.4	42.3	43.1	12.5	16	5.6	9.2	3.0
>41	8	249	73.6	24.9	104.1	39.1	66.1	14.4	25.5	6.7	10	4.1
p*		0.4	0.18	0.48	0.39	0.44	0.65	0.77	0.71	0.30	0.96	0.48
F. ALC. U/L												
≤290	56	204	50.1	24.6	77.6	39.9	44.3	14.1	16.3	5.8	9.2	4.1
>290	11	188	68.4	31.9	78.9	39.0	39.4	13.7	14.6	7.0	10.2	3.5
p*		0.68	0.11	0.053	0.89	0.83	0.76	0.92	0.55	0.052	0.73	0.53
CA-125 U/ml												
≤35	51	180	45.5	26.2	69.4	39.1	39.6	13.4	13.5	6.4	8.5	3.9
> 35	16	340	76.4	22.2	143.4	40.1	76.3	16.5	28.4	7.1	15.3	4.2
p*		<0.0001	0.01	0.09	0.01	0.81	0.05	0.14	<0.0001	0.12	<0.0001	0.80

P* significativa = 0,05 Prueba de U Mann-Whitney LNH: Linfoma No Hodgkin LDH: Lactato Deshidrogenasa
B2M: Beta 2 microglobulina AST: Aspartado aminotransferasa ALT: Alanino aminotransferasa
F. Alc.: Fosfatasa alcalina CA-125: Antigeno Cáncer 125 M: Mediana

En relación al CA-125, la actividad de LDH total correlacionó directa y significativamente (p=0.05) con este marcador, así como las isoenzimas LDH1 (p=0.008) y LDH5 (p=0.04); no se obtuvieron correlaciones significativas con LDH2, LDH3 y LDH4.

El análisis con los niveles de IL-6 reflejó un correlación directa y significativa de los niveles séricos de LDH total (p=0.017) y las isoenzimas LDH1 (p=0.035), LDH2 (p=0.027) y LDH4 (p=0.049) con esta variable. Las isoenzimas LDH3 y LDH5 no correlacionaron con IL-6.

No se obtuvieron resultados significativos al correlacionar la actividad de la LDH total y las isoenzimas de LDH con los valores de ALT, F.ALC, PCR, sRαIL-2, VSG y albúmina sérica.

Análisis de componentes principales: Se aplicó el análisis de componentes principales para obtener la representación visual o gráfica del comportamiento simultáneo (correlación multifactorial) de la enzima LDH total e isoenzimas de LDH en los pacientes con LNH (Figura Nº 1). Cada variable está representada por una línea cuya longitud refleja la influencia o importancia de los marcadores en el proceso evaluado (a mayor longitud, mayor influencia). Todas las variables convergen en un punto (la enfermedad), generando ángulos que reflejan la correlación entre ellas (a menor ángulo mayor cercanía, por lo tanto mayor correlación). Observamos que las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH3 son las que presentan mayor cercanía con la LDH total, la isoenzima LDH3 ocupa la posición central y según la gráfica resultó ser la de mayor correlación con la LDHT , mientras que las LDH4 y LDH5 están más correlacionadas o cercas entre si pero mas distantes de LDHT.

Evolución clínica de los pacientes con LNH: Se evaluaron 67 pacientes con un tiempo promedio de seguimiento de 30 meses (rango 3 – 48 meses), de los cuales 27(40%) entraron en remisión completa, 12(19%) y 17(25%) presentaron remisión parcial <50% y >50% respectivamente, registrando una respuesta global (RC+RP) en 56

Tabla VII. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a los marcadores biológicos en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT (M) U/L	LDH1 (M) UL	%	LDH2 (M) U/L	%	LDH3 (M) U/L	%	LDH4 (M) U/L	%	LDH5 (M) U/L	%
PCR mg/l												
≤ 6	37	180	47.1	25.8	68	35.9	39.6	9.0	12.7	6.7	8.5	3.6
>6	30	269	64.4	23.8	109.6	40.7	66.2	18.9	18.4	6.1	9.7	4.3
p*		0.014	0.35	0.27	0.013	0.7	0.35	<0.0001	0.28	0.61	0.32	0.26
IL-6 pg/ml												
≤1.99	23	169	45.4	24.9	67.4	38.5	39.6	9.0	11.4	7.0	9.3	4.6
>1.99	38	280.5	60.0	23.05	115.3	39.5	69.8	14.3	19.15	6.7	8.8	3.5
vd	6											
p*		0.014	0.16	0.17	0.014	0.59	0.22	0.26	0.19	0.91	0.70	0.18
sRαIL-2 pg/ml												
≤2000	18	175.5	51.3	26.6	67.8	39.7	33.2	12.5	13.7	6.9	9.4	3.9
>2000	24	176	53.2	26.5	77.2	40.4	33.1	16.4	13.5	6.1	8.2	3.9
vd	24											
p*		0.95	0.70	0.75	0.64	0.94	0.83	0.51	0.89	0.85	0.68	0.74
VSG mmh												
≤15	8	174	44.6	23.6	70.9	37.8	40.4	7.9	13.7	6.8	9.05	5.1
>15	29	184	56	27.5	68.4	38.8	34.65	16.0	13.4	6.9	9.85	4.4
vd	29											
p*		0.71	0.34	0.50	0.96	0.87	0.60	<0.0001	0.85	0.9	0.68	0.80
ALBÚMINA g/dl												
≥3.4	51	199.5	53.3	25.5	75.5	39.3	43.1	11.0	16	6.4	8.8	4.3
<3.4	16	312	68.6	25.2	128.3	41.2	55.4	17.5	21.8	7.4	10.58	2.9
p*		0.97	0.32	0.56	0.41	0.71	0.99	<0.0001	0.71	0.71	0.28	0.24

p* significativa= 0.05 Prueba de U Mann-Whitney
LNH: Linfoma No Hodgkin
IL-6: Interleuquina 6
VSG: Velocidad de sedimentación globular
LDH: Lactato Deshidrogenasa
PCR: Proteína C Reactiva
sRαIL-2: Receptor α soluble de Interleuquina 2
M: Mediana vd: Valor desconocido.

(84%). La progresión de la enfermedad se registró en 11(16%) de los casos y 24(36%) fallecieron.

Discusión

En el estudio de los LNH se han identificado una variedad de factores clínico-patológicos y biológicos con significacia pronóstica para la caracterización de la enfermedad, la evolución de los pacientes y la respuesta al tratamiento. La importancia de este estudio no solamente consistió en la determinación de las isoenzimas de LDH y una serie de marcadores tumorales en LNH, sino también en la profundización del conocimiento respecto a su relación con la enfermedad y las otras variables pronósticas en la población de pacientes venezolanos.

Se estudiaron 67 pacientes de primera consulta, siguiendo las pautas internacionales establecidas para el abordaje de la enfermedad; se evaluaron los marcadores pronósticos al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento, que reflejan las características del tumor y su potencial invasivo (LDH, estadio clínico, afectación extranodal, compromiso de médula ósea, N° de regiones ganglionares, enfermedad abdominal, enfermedad voluminosa e histología del tumor), la respuesta del paciente frente al tumor (estado funcional, síntomas B, B2M, enzimas hepáticas, albúmina sérica, CA125, VSG, IL-6, sRαIL-2), así como la capacidad del paciente de tolerar el tratamiento (edad, estado funcional y compromiso de médula ósea). La consideración de los factores pronósticos clínico-patológicos en conjunto con el IPI permitió categorizar a los pacientes en grupos de riesgo para la adecuada selección de las estrategias terapéuticas.

En nuestro trabajo la mayoría de los pacientes presentaron enfermedad avanzada, afectación de

Tabla VIII. Correlación de los niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH con las características clínico- patológicas en pacientes con LNH

Variables n=67		LDHT U/L	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L	LDH4 U/L	LDH5 U/L
Edad	r	0.06	0.83	0.005	0.03	0.04	0.0008
	p	0.58	0.5	0.96	0.79	0.73	0.99
Estadio Clínico	r	0.30	0.38	0.29	0.17	0.08	0.001
	p	0.012	0.002	0.02	0.15	0.47	0.98
Estado Funcional	r	-0.35	-0.22	-0.32	-0.40	-0.33	-0.23
	p	0.004	0.05	0.013	0.002	0.01	0.05
Enfermedad Extraganglionar	r	0.07	0.05	0.11	0.03	0.06	0.03
	p	0.56	0.7	0.4	0.8	0.6	0.8
Síntomas B	r	0.29	0.02	0.1	0.08	0.11	0.2
	p	0.01	0.1	0.3	0.7	0.3	0.4
N° regiones ganglionares	r	0.21	0.39	0.21	0.03	0.11	0.07
	p	0.08	0.002	0.08	0.79	0.34	0.55
Enfermedad voluminosa	r	0.19	0.15	0.20	0.15	0.16	0.02
	p	0.10	0.2	0.08	0.20	0.2	0.9
Compromiso Médula Ósea	r	0.2	0.30	0.15	0.02	0.11	0.12
	p	0.17	0.01	0.26	0.86	0.39	0.34
Enfermedad Abdominal	r	0.22	0.32	0.23	0.13	0.18	0.05
	p	0.07	0.013	0.06	0.29	0.31	0.95
IPI	r	-0.36	-0.2	-0.39	-0.38	-0.33	-0.23
	p	0.004	0.09	0.001	0.002	0.01	0.058

p significativa= 0.05 p*: Spearman r = Coeficiente de Correlación LNH: Linfoma No Hodgkin
IPI: Índice Pronóstico Internacional

más de un sitio extranodal, carga tumoral > 10cm y enfermedad abdominal, reflejando la extensión del tumor y su potencial invasivo, factores asociados con una disminución de la respuesta al tratamiento y sobrevida (3,4,36). Solo el 30% de los pacientes presentaron más de 4 regiones ganglionares; tanto el número como la localización de las áreas ganglionares afectas reflejan la extensión de la enfermedad. En relación al estado funcional y la presencia de síntomas B como expresión de la respuesta del paciente al tumor, la mayoría de los pacientes no presentaron alteraciones para estas condiciones. La capacidad funcional del paciente es considerada como uno de los factores pronósticos independientes con mayor influencia al valorar la repercusión que la enfermedad produce en el estado general del paciente y está relacionada con otros parámetros como síntomas B, carga tumoral, otras enfermedades concomitantes y la edad (4) . La vinculación de los síntomas B (fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso) al pronóstico ha sido controversial para los diferentes tipos de LNH (5), se ha reportado que pacientes con LNH agresivos con síntomas B, presentan una pobre respuesta a la quimioterapia y sobrevida (4). Las localizaciones extraganglionares específicas involucradas con la enfermedad han sido identificadas como áreas con significancia pronóstica, siendo una de ellas la médula ósea. En los casos de afectación de médula ósea el patrón de infiltración nodular, así como el escaso porcentaje de infiltración, va asociado a un mejor pronóstico para todos los tipos de linfoma (5); en nuestro estudio solo el 21 % de los pacientes presentó infiltración de la MO.

Tabla IX. Correlación de los niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH con los marcadores biológicos en pacientes con LNH

Variables		LDHT U/L	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L	LDH4 U/L	LDH5 U/L
B2M mg/l	r	0.56	0.53	0.51	0.40	0.45	0.34
n= 67	p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.001	0.002	0.005
AST U/L	r	0.48	0.45	0.38	0.34	0.43	0.35
n= 67	p	0.001	0.0002	0.002	0.005	0.0005	0.005
ALT U/L	r	0.15	0.19	0.16	0.16	0.12	0.01
n= 67	p	0.20	0.11	0.21	0.21	0.32	0.93
F. ALC. U/L	r	0.12	0.21	0.05	-0.18	-0.002	0.07
n= 67	p	0.30	0.08	0.66	0.87	0.98	0.53
CA-125 U/ml	r	0.24	0.32	0.18	0.07	0.17	0.24
n= 67	p	0.05	0.008	0.14	0.52	0.15	0.04
PCR mg/l	r	0.13	0.10	0.09	0.05	0.09	1.0
n= 67	p	0.27	0.4	0.4	0.67	0.45	1.0
IL-6 pg/ml	r	0.30	0.27	0.28	0.23	0.25	0.19
n= 61	p	0.017	0.035	0.027	0.07	0.049	0.12
SRαIL-2 pg/ml	r	-0.03	-0.09	-0.11	-0.02	-0.09	-0.08
n= 43	p	0.81	0.52	0.46	0.86	0.52	0.59
VSG mmh	r	-0.01	0.05	-0.09	-0.17	-0.03	0.20
n= 38	p	0.91	0.75	0.56	0.29	0.82	0.22
ALBÚMINA g/dl	r	-0.17	-0.16	-0.16	-0.08	-0.12	-0.09
n= 67	p	0.16	0.17	0.19	0.47	0.44	0.46

p significativa = 0.05 p*: Spearman r : coeficiente de correlación AST: Aspartado aminotransferasa
LDH: Lactato deshidrogenasa F. Alc.: Fosfatasa alcalina LNH: Linfoma No Hodgkin PCR: Proteína C Reactiva
B2M: Beta 2 microglobulina sRαIL-2: Receptor α soluble de Interleuquina 2
ALT: Alanino aminotransferasa CA-125: Antígeno cancer 125 IL-6: Interleuquina 6
VSG: Velocidad de sedimentación globular

En relación a los modelos pronósticos, el IPI en los últimos años, dado su elevado valor predictivo, ha sido de utilidad en los diferentes tipos de LNH, tanto agresivos como indolentes (3,37) y más recientemente a partir del año 2004, se ha propuesto la aplicación del FLIPI para los linfomas foliculares (38) y el R-IPI para los linfomas agresivos (39). En tal sentido, los pacientes evaluados en el estudio correspondieron al período 1999-2004 y para la categorización en grupos de riesgo se aplicó el IPI para todos los grados de malignidad, así la mayoría (90%) correspondió al grupo de bajo riesgo (riesgo bajo e intermedio bajo) y solo el 10 % de alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo).

Al considerar la distribución de los marcadores biológicos, la mayoría de los pacientes presentó valores de LDH, B2M, AST, ALT, F. ALC., CA125, PCR y albúmina sérica dentro del rango normal de referencia. Solo el 13% de los pacientes cursaron con alteración de la actividad de LDH total, en base al valor cut off establecido como el 100% del valor superior del rango de referencia); este bajo porcentaje pudiera estar influenciado por el tamaño de la muestra. El valor sérico de la LDH es uno de los factores pronósticos individuales que mayor información aporta en los diferentes tipos de LNH, hasta el punto que actualmente

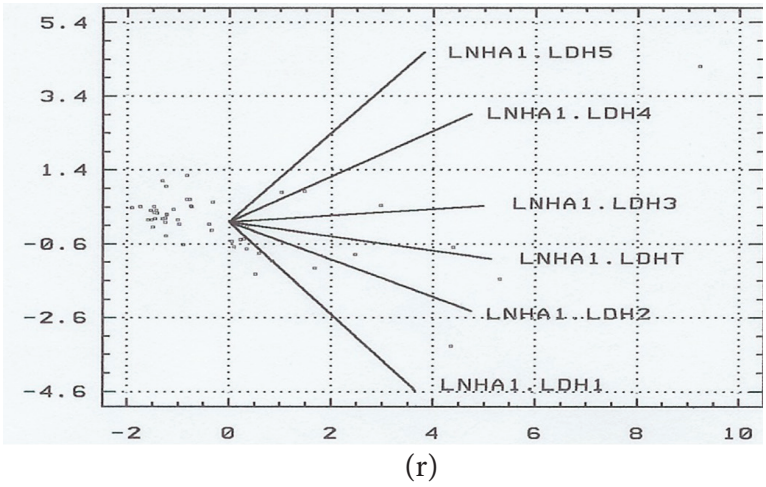


Figura Nº 1. Análisis de componentes principales de los niveles de LDHT e isoenzimas de LDH en pacientes con LNH.
(r): coeficiente de correlación Nº Pacientes: 67 LNHA1: Base de Datos
LDH: Lactato Deshidrogenasa LNH: Linfoma No Hodgkin

es considerado como dato imprescindible para definir el pronóstico de un paciente. Los marcadores biológicos que presentaron mayor incidencia de valores alterados correspondieron a la IL-6, sRαIL-2 y VSG. Si bien son marcadores que reflejan la actividad de la enfermedad, existieron pacientes con valores desconocidos y esto pudiera influir en los resultados.

Entre los factores pronósticos en LNH, la enzima LDH representa un marcador pronóstico independiente y forma parte del IPI (3). Constituye uno de los sistemas enzimáticos preferencialmente producidos y retenidos por las células cancerosas, siendo necesario para mantener el crecimiento y la proliferación del tumor (23,40, 41). Cuando las isoenzimas de LDH son liberadas por el tejido neoplásico al torrente circulatorio, se producen cambios en el patrón sérico de las mismas, así pudimos observar un incremento en los valores absolutos de la actividad de todas las isoenzimas y de la LDH total en los pacientes respecto al grupo control, con cambios en la distribución en porcentaje, que reflejaron disminución de LDH1, aumentos de LDH2, LDH3 y LDH5, pero no modificaciones de LDH4 (Tabla II). Ricerca y col. (20) obtuvieron resultados similares en el patrón de las isoenzimas en LNH, respecto al incremento de los valores absolutos, así como la disminución del porcentaje de LDH1 y el aumento de LDH3, sin embargo registraron porcentajes aumentados de LDH4 y no detectaron cambios en LDH2 y LDH5. La disminución de la LDH1 de los pacientes respecto a los controles, pareciera ser un patrón que se repite, sugiriendo una tendencia hacia las isoformas LDH4 y LDH5 asociadas a los tejidos con alta producción de ácido láctico o sea con metabolismo anaeróbico. Ferraris y col. (42) no observaron cambios en el patrón de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH, no obstante Batsakis y col. (43) reportaron LDH3 aumentada. Por su parte Rottenberg y col. (19) describieron tres casos en los cuales el aumento de los niveles de la LDH total se acompañó del predominio de las isoenzimas 2 y 3, siendo el único y más temprano signo de linfoma maligno oculto.

Más recientemente, Dumontet y col. (21) reportaron en pacientes con LNH, porcentajes elevados de la isoenzima 2 en pacientes con LDH total elevada respecto a los controles y al grupo de pacientes con valores normales de LDH. Otros autores (22) registraron incrementos en el porcentaje de LDH2 en los pacientes con LNH, pero no en otras patologías como Linfoma de Hodkin (LH) y mieloma múltiple, cuando se compararon con los valores normales. Según Paule y col. (18) la disminución de LDH1 y el incremento de LDH2 pareciera ser un marcador bioquímico de la evolución del proceso tumoral y de la diferenciación celular.

En el presente trabajo, los resultados del patrón de isoenzimas de LDH se expresaron en valores absolutos y porcentuales. El análisis en valor absoluto permite estudiar a la variable en su valor real, facilitando la comparación de la actividad enzimática con otros estudios, mientras que el nivel en porcentaje expresa valores relativos,

generando resultados e interpretaciones diferentes al compararlo con el del valor absoluto. El resultado en porcentaje nos orientaría acerca de la distribución de las fracciones de LDH y sobre la dirección o tendencia metabólica del tejido afectado. Otros factores influyentes a considerar comprenden la heterogeneidad biológica de la población estudiada y las diferentes metodologías empleadas en la determinación del marcador biológico, así como los rangos de referencia, cuando se comparan diferentes estudios.

Al analizar la frecuencia de las isoenzimas de LDH en los pacientes con LNH en base a los valores establecidos para la población venezolana, observamos que de las cinco isoenzimas, la LDH3 presentó la mayor incidencia de niveles elevados, tanto en valor absoluto como porcentual, seguido de la LDH2. Estos resultados coinciden con los reportes de otros autores sobre la incidencia del incremento de la isoenzima 3 en pacientes con mieloma múltiple y leucemia granulocítica crónica (44,45), así como la frecuencia incrementada del porcentaje de LDH2 en pacientes con LNH, leucemia linfoide crónica y síndromes linfoproliferativos (22-23). Las isoenzimas 2 y 3 están presentes en los órganos linfoides (14), siendo la LDH3 la isoenzima más abundante en el tejido linfoide normal (13) con altos porcentajes en células B, T y timocitos (46-47).

En las enfermedades linfoproliferativas los niveles elevados de la LDH total sérica reflejan un incremento en el metabolismo o recambio celular asociado con la expansión y actividad proliferativa del tumor. Battle y col.(48) reportaron niveles elevados de LDH asociados con el estadio clínico (III-IV), el estado funcional alterado y enfermedad voluminosa, en un grupo de 240 pacientes con LNH. Otros autores (20) observaron la relación de la actividad incrementada de la LDH total con los estadios clínicos avanzados, la presencia de síntomas generales y linfomas de alto grado de malignidad. En el presente trabajo observamos los niveles de LDH asociados con la progresión de la enfermedad (estadio clínico III-IV), alteración del estado funcional, presencia de síntomas B e IPI de alto riesgo (Tablas IV y V) evidenciando su importancia internacionalmente establecida (4,7,8). Nuestros resultados coincidieron con los de Ricerca y col.(20), quienes reportaron cambios en la actividad de la LDH influenciada por la progresión de la enfermedad y la presencia de síntomas B.

La información sobre el comportamiento de las isoenzimas de LDH respecto a los factores pronósticos es escasa, por lo cual profundizamos en este análisis. Así, observamos valores incrementados de LDH1 en los pacientes con enfermedad avanzada, estado funcional alterado, presencia de síntomas B, afectación de médula ósea, N° de regiones ganglionares y el porcentaje elevado de la isoenzima asociado con un IPI de alto riesgo. El estudio de Ricerca y col. (20) también reportó cambios en la distribución de LDH1 influenciados por la progresión de la enfermedad. Otros investigadores (21,22) determinaron una mayor frecuencia de porcentajes elevados de la isoenzima 2 en pacientes con alteración de su estado funcional y valores absolutos elevados de LDH3 más frecuentemente asociados con pacientes que presentaron afectación del estado general, enfermedad avanzada y linfoma de tipo agresivo. Al igual que dichos autores , obtuvimos una relación entre los valores absolutos de LDH2 y el estado funcional anormal y además con la presencia de síntomas B, es decir con la respuesta del paciente frente al tumor, con la progresión, diseminación de la enfermedad y su potencial invasivo. Nuestros hallazgos respecto a la asociación de la LDH3 con el estado funcional coincidieron con los de otros autores (21,22), pero adicionalmente encontramos una relación significativa con los síntomas B y la afectación extranodal. Es importante señalar que estos autores compararon las frecuencias de los valores absolutos o porcentajes elevados, mientras que en nuestro caso comparamos la actividad de las isoenzimas expresada bien sea tanto en valor absoluto como en porcentaje. Por su parte Ricerca y col.(20) , no obtuvieron resultados significativos para LDH2 en relación al estadio clínico, síntomas generales e histología del tumor, mientras que la actividad de LDH3 en porcentaje se asoció con el estadio clínico, síntomas B e histología de alto grado de malignidad, al comparar los valores con el grupo normal. Este hallazgo sugiere que la LDH3 pareciera ser un marcador de la presencia de enfermedad al presentar un comportamiento independiente de los factores clínicos patológicos, por lo que siendo la LDH3 la isoenzima más abundante en los tejidos linfoides, es posible que sus valores incrementados reflejen el tamaño de la masa tumoral en los pacientes con LNH. En lo que concierne a la isoenzima LDH4, en nuestra casuística, sus valores absolutos se vieron influenciados por el estado funcional y los síntomas B y su distribución en porcentaje se alteró con la progresión de la enfermedad y la afectación extraganglionar, coincidiendo con lo reportado por Ricerca y col. (20), además resultó ser la única isoenzima cuyos valores absolutos y porcentaje se asociaron con un IPI de alto riesgo. Cuando evaluamos a la LDH5, observamos sus valores absolutos influenciados por el estado funcional

del paciente y su distribución en porcentaje influenciada por los factores pronósticos asociados con el potencial invasivo del tumor (estadio clínico avanzado, enfermedad voluminosa y compromiso abdominal), sin encontrar reportes de otros autores al respecto. Los resultados en porcentaje nos reflejarían la tendencia o la expresión de los cambios en los tejidos sobre la dirección metabólica, estando la expresión de LDH5 más en relación con la producción de lactato en el tejido u órgano involucrado.

El análisis del contenido de las isoenzimas en las muestras de tumor nos podría orientar acerca del origen o incremento de las mismas a nivel sérico. Estudios in vitro han revelado que la actividad intracelular de los isotipos de LDH (H y M) muestran diferentes expresiones en los linfocitos B y T, en estado de reposo y de activación, siendo su patrón de expresión un mejor marcador de activación celular que del fenotipo (24, 25,49). Además de la utilidad de la determinación de la LDH total sérica, las características intracelulares de la misma y del perfil isotípico, son indicadores sensibles del estado metabólico (50), de la dirección aeróbica o anaeróbica de la glicólisis (14), del estado de activación (41), transformación maligna (51,52), así como del daño de la membrana celular (53). Los cambios en la actividad celular de la LDH y del isotipo (H, M) se han asociado con la inducción de apoptosis y la alteración de la membrana celular en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con linfoma. La tasa de apoptosis y consecuentemente la liberación de la LDH a través de la membrana de las CMSP, depende de la masa tumoral, la agresividad del tumor y de los estadios avanzados de la enfermedad. La actividad intracelular de la LDH y del isotipo M en las CMSP y la actividad de la LDH liberada espontáneamente, se vieron significativamente incrementadas en LNH con estados avanzados y alto grado de malignidad, contrario a lo observado en los pacientes con LH, quienes mostraron elevaciones en todos los parámetros (27) . En los pacientes con LNH la actividad intracelular de los isotipos LDH H y LDH M de las CMSP ultrasonicadas, fue significativamente elevada antes de comenzar la terapia y su actividad fue mayor en los estadios avanzados de la enfermedad en comparación con los estadios tempranos (30). Así en nuestro trabajo, pudimos observar que la actividad sérica de la LDH total y las isoenzimas 1, 2, 3, 4 y 5 mostraron la misma tendencia.

Por su parte Pan y col. (24,25) demostraron una correlación significativa entre la expresión de los isotipos de la LDH y la actividad proliferativa de las células linfoides humanas normales y poblaciones de células humanas neoplásicas, mediante la inmunotinción con anticuerpos monoclonales anti H de LDH (LDH 1,2) y anti M de LDH (LDH 4,5), reaccionando ambos anticuerpos débilmente con LDH3.

Tomando en cuenta estas consideraciones, cuando evaluamos la asociación del patrón de isoenzimas de LDH con el estadio clínico, podríamos interpretar por una parte que la actividad elevada en valores absolutos de la isoenzimas LDH1(H4) y LDH2(H3M) serían reflejo de la actividad proliferativa del tumor y , por otra, las proporciones (%) aumentadas de LDH4 (HM3) y LDH5 (M4), indicativos del metabolismo anaeróbico de las células tumorales, lo cual ha sido reportado en la mayoría de los tumores(14). La actividad incrementada de la LDH2 en el grupo de pacientes con enfermedad abdominal seria expresión del alto recambio celular (15). Igualmente, la proporción elevada de LDH5, asociada con la enfermedad voluminosa (carga tumoral) y el compromiso abdominal, nos reflejaría la relación con el metabolismo anaeróbico del tumor y su potencial invasivo, además de ser un marcador sensible del daño hepático (14). Recientemente Koukourakis y col.(49) reportaron la sobreexpresión de LDH5 en muestras de tejido de cáncer de pulmón de células pequeñas, asociada con la hipoxia del tumor y niveles elevados de LDH total sérica. Otros autores (54,55) mediante el análisis inmunohistoquímico evaluaron la expresión citoplasmática y nuclear de la isoenzima LDH5 en LNH difuso de células grandes B y linfoma folicular, detectando una alta expresión de LDH5 en ambos tipos de linfomas y ninguna en linfocitos no neoplásicos. La expresión de LDH5 se asoció significativamente con las proteínas reguladoras de la hipoxia celular, conocidas como los factores inductores de hipoxia (HIF) 1 alfa y 2 alfa. También observaron una amplia expresión del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular fosforilado (VEGF2/KDR) y su correlación con la activación de los factores HIF y su participación en la activación de la angiogénesis. En nuestro caso, observamos el significativo incremento de los valores absolutos de la LDH1 relacionados con la afectación de médula ósea y el número de regiones ganglionares como expresión de la extensión del tumor, esto podría ser reflejo de la respuesta proliferativa o recambio celular (15), aunque no se afecte el valor de la LDH total.

Los estudios in vitro de Jurisik V y col.(30) señalaron una actividad de LDH-H intracelular en CMSP de pacientes con LNH previo a la administración del tratamiento, no obstante,

la misma disminuyó después que las CMSP fueron tratadas con factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), mostrando un efecto contrario al comparar con las CMSP de controles sanos. La actividad del isotipo LDH-M intracelular de las CMSP de pacientes con LNH, previo al tratamiento con quimioterapia, se mantuvo elevada y sus valores no variaron post-tratamiento. La actividad intracelular de los isotipos de LDH y su relación, constituyen marcadores importantes de fenómenos biológicos intracelulares seguidos del efecto del TNFα. La actividad de la LDH-H estaría más relacionada con la proliferación celular que con la especificidad del algún tipo de malignidad. Según otras investigaciones, los cambios en la actividad de la LDH-H en controles sanos y pacientes con linfoma, antes y después de la quimioterapia, pudieran depender de características intracelulares previas de las CMSP, sugiriendo el papel de la expresión del receptor del TNFα o la activación de señales intracelulares (28).

Cuando relacionamos la actividad tanto de la LDH total como de las cinco isoenzimas (valores absolutos) con el estado funcional, se asociaron con un estado general alterado, reflejando la repercusión que la enfermedad produce en el paciente, sin producir cambios significativos en la distribución (%) del patrón isoenzimático, es decir hay una afectación general del paciente y de la actividad enzimática sin discriminar órganos o tejidos. Por otra parte es conocido que la LDH es un marcador inespecífico y también es producido por el tejido circundante al tumor. Al evaluar los cambios respecto a los síntomas B, se observaron alteraciones de todas las isoenzimas menos en la actividad de la LDH5.

Respecto a la enfermedad extraganglionar, observamos modificaciones porcentuales en el patrón de LDH3 y LDH4, aún cuando no incidió sobre la actividad total de LDH (Tabla IV). Por una parte, este factor pronóstico nos refleja la carga tumoral y por otra, la LDH3 es fisiológicamente la más abundante en los tejidos linfoides; así mismo, junto con la LDH4, parecen ser las isoformas más abundantes en las células hematopoyéticas en maduración (15) y predominantes en la mayoría de los tejidos malignos (10,13).

Nuestros hallazgos indicaron que los pacientes con niveles elevados de LDH total se asociaron con un IPI de alto riesgo, ejerciendo una mayor influencia sobre la proporción de la LDH1 como expresión de recambio celular y la actividad incrementada de LDH4, tanto en valores absolutos como en porcentaje. En tal sentido, las variaciones de LDH1 y LDH4 podrían deberse al proceso de diferenciación celular, además del comportamiento del tumor, indicando la actividad proliferativa del tumor, el predominio del metabolismo anaeróbico y su asociación con tejidos malignos (47,50).

Cuando se correlacionaron los niveles de la LDH total con las características clínico-patológicas, observamos, que su actividad aumentó significativamente con los factores adversos indicativos de la progresión de la enfermedad, además con la afectación del estado general del paciente y la presencia de síntomas, influyendo significativamente de forma negativa sobre el pronóstico de la enfermedad (Tabla VIII). Estos resultados soportan la importancia de la LDH total como marcador tumoral a pesar de ser inespecífico (9,10). La evaluación de las isoenzimas (Tabla VIII) reveló que un incremento de la actividad enzimática de LDH1 se correlacionó con una mayor actividad proliferativa del tumor, es decir con la progresión de la enfermedad, así como con la extensión de la misma (N° de regiones ganglionares y compromiso de médula ósea) y el potencial invasivo del tumor, mientras que la actividad de la isoenzima 2 solo se vió influenciada directamente por el estadio clínico. El incremento de la actividad de las cinco isoenzimas cursó con un significativo deterioro de la capacidad funcional del paciente y de la respuesta frente al tumor. El IPI empeoró significativamente en la medida que la actividad enzimática de las isoenzimas 2, 3 y 4 incrementó, siendo interesante comentar que en la literatura se menciona que en los nódulos linfáticos con lesiones malignas se presentan mayores concentraciones de LDH2, LDH3 y LDH4 que de LDH5 (10).

En la literatura encontramos reportes sobre el patrón LDH1>LDH2 (inversión de la relación LDH1/LDH2) en tumores de ovario y de células germinales, así como de niveles séricos elevados de LDH1 en cáncer testicular avanzado. Se ha sugerido que el fenómeno del cambio de relación LDH1/LDH2 se relaciona con cambios megaloblásticos en la médula ósea o por cardiocitotoxicidad por agentes citolíticos. El patrón de la relación invertida LDH1>LDH2, la cual es ampliamente utilizada en la enfermedad miocárdica, también puede ser vista en pacientes con cáncer. Las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH3 pudieran ser marcadores importantes de discrasias hematológicas y otras malignidades, explicando de esta manera nuestra observación en el análisis de componentes principales (Figura Nº 1), de que estas tres isoenzimas tuvieron mayor correlación con la LDH total en el proceso estudiado.

La importancia clínica de los marcadores biológicos serológicos en LNH está basada en la información que complementa al diagnóstico

morfológico, así como su papel en la estadificación, pronóstico y monitoreo de la enfermedad.
En las enfermedades linfoproliferativas los niveles de la LDH constituyen un marcador de recambio celular y se correlacionan con la proliferación y expansión celular; sin embargo en relación a las isoenzimas de LDH existe poca información respecto a su asociación y correlación con los marcadores biológicos serológicos en LNH. Dumontet y col. (21) reportaron valores séricos elevados del TNFα y su receptor p75 asociados a altos porcentajes de LDH2 en pacientes con LNH, considerando la influencia que este marcador pudiera ejercer sobre las alteraciones del perfil de isoenzimas de LDH en estos pacientes.
En nuestro trabajo pudimos observar que los niveles elevados de la LDH total influenciados por la actividad de LDH1 y LDH2, reflejaron el comportamiento del tumor y su potencial invasivo al asociarse con una elevada síntesis de la B2M, la cual es expresión del aumento de la tasa de activación y proliferación tumoral.
Nuestros datos indican que la actividad aumentada de la LDH total y las cinco isoenzimas cursaron con un incremento de los niveles de la B2M y AST, reflejando una correlación directa entre la actividad enzimática, la proliferación celular y el compromiso hepático (Tabla IX). También observamos la asociación de todas las isoenzimas con los niveles de la AST y del CA125, lo cual nos sugiere una relación con la afectación hepática y el potencial invasivo del tumor respectivamente, estando en concordancia con otros autores sobre la significativa relación entre la LDH y el CA125 (48,56-60). Es interesante señalar que la información biológica que nos provee el CA 125 es diferente a la que aportan los marcadores LDH y B2M, los cuales son liberados por las células linfomatosas, reflejando una medida de la carga tumoral y actividad proliferativa del tumor, mientras que el CA125 es indicativo de la respuesta del paciente frente al potencial invasivo del tumor, aportando una idea acerca de su actividad infiltrante. Nuestros resultados sugieren una correlación directa y significativa entre la LDH total y el antígeno CA 125, coincidiendo con el trabajo de Bairey y col. (56), no obstante contrastan con los de otros investigadores (48,60).
Cuando evaluamos las isoenzimas, obtuvimos una correlación significativa con las isoenzimas LDH1 y LDH5, lo cual correspondería con la actividad proliferativa de los isotipos H y M respectivamente. Nuestros resultados reflejaron el comportamiento biológico de los pacientes con LNH respecto a la actividad de la LDH total, sus isoenzimas y los marcadores inflamatorios. Así observamos la asociación de los niveles elevados de la LDH con los valores anormales de la PCR e IL-6, coincidiendo con los trabajos de otros autores (33,61-63), no obstante en la literatura encontramos referencias controversiales para la relación entre la LDH total y la IL-6 (64,65).

Al considerar el perfil de las isoenzimas en nuestros pacientes, los niveles elevados de la LDH2 sérica se asociaron con concentraciones alteradas de la IL-6 y PCR. Se obtuvieron porcentajes incrementados de la isoenzima LDH3 relacionados con los pacientes que presentaron valores alterados de la PCR, VSG, y albúmina sérica, por lo cual es posible que las modificaciones de las isoenzimas observadas en los pacientes estudiados, pueda deberse entre otros factores a la producción de las citoquinas inflamatorias, además de que la LHD2 y LDH3 son las mas abundantes en las células linfoides (14). La correlación significativa entre la actividad de la LDH Total y las isoenzimas 1,2 y 4 con la IL-6 reflejan la correlación entre la actividad proliferativa del tumor y el proceso inflamatorio.
Algunos autores han señalado que los niveles elevados de la PCR representan un marcador pronóstico sencillo que refleja directamente la actividad de la IL-6 en pacientes con LNH (34,63). Los niveles disminuidos de la albúmina sérica, la presencia de síntomas B, niveles elevados de la VSG y la anemia en pacientes con linfomas agresivos, pudieran explicarse como efectos de la liberación de las citoquinas a la circulación (41).
Las isoenzimas de LDH pudieran ser marcadores importantes en discrasias hematológicas y otras malignidades, no obstante, la interpretación de sus valores debe hacerse con el entendimiento de que están presentes en otras células como leucocitos, plaquetas y reticulocitos, pudiendo observar que algunas isoenzimas son indicadores de alteraciones celulares y metabólicas, mientras que otras están asociadas al pronóstico de la enfermedad (66).
Es importante mencionar las variables y limitaciones que pudieran influir en la evaluación de los marcadores tumorales en los pacientes con LNH. En relación a los pacientes evaluados, el perfil de los pacientes seleccionados representa una diferencia metodológica por lo que se requiere precisar si el estudio se realiza en el grupo total de los pacientes o de acuerdo a las categorías pronósticas. Un importante aspecto que influye en la comparación de los resultados se refiere a la heterogeneidad histológica de los subtipos, lo cual dificultaría la comparación debido a los recientes cambios en la clasificación de LNH. Desde el punto de vista metodológico, el método utilizado, la variabilidad de los rangos para establecer el

criterio de anormalidad o cut–off, así como el análisis estadístico aplicado, son determinantes en la reproducibilidad de los resultados. Nosotros establecimos los rangos de referencia para las isoenzimas de LDH en la población venezolana y este hecho constituye otro de los aportes de esta investigación.

En el presente estudio profundizamos sobre el comportamiento de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH, al momento del diagnóstico, antes de recibir el tratamiento, siendo importante complementar los estudios a nivel molecular, celular y serológico, para ampliar el panorama de acción de las isoenzimas, tanto en LNH como en otras malignidades.

La asociación y correlación de la actividad de la LDH1 con los factores clínico-patológicos adversos, IPI de alto riesgo y marcadores biológicos alterados, reflejan su compromiso con la progresión de la enfermedad, actividad proliferativa del tumor, recambio celular y la actividad de la enfermedad, así como la afectación del paciente y su respuesta frente al tumor. Los cambios en el patrón de la isoenzima LDH2 reflejaron su asociación con los factores clínico-patológicos y biológicos como expresión de la progresión y diseminación de la enfermedad, actividad proliferativa del tumor, respuesta del paciente frente a la enfermedad y actividad inflamatoria. Su actividad correlacionó con la progresión de la enfermedad, alteración del estado funcional y un IPI adverso. La isoenzima de mayor frecuencia con niveles elevados fue la LDH3 y su actividad se asoció con los factores pronósticos clínico-patológicos y biológicos adversos que reflejan la respuesta del paciente frente al tumor, la actividad inflamatoria y la propensión a la extensión de la enfermedad. Su correlación con el deterioro del estado general del paciente, el IPI de alto riesgo y los marcadores biológicos alterados, sugiere ser un indicador de la actividad proliferativa del tumor y la afectación del paciente. Los niveles incrementados de la isoenzima LDH4 y su patrón de distribución, se asociaron con la respuesta del paciente frente al tumor, IPI de alto riesgo, progresión y diseminación de la enfermedad y con marcadores biológicos que reflejan actividad hepática y el potencial invasivo del tumor. Su actividad correlacionó con los marcadores biológicos de la respuesta inflamatoria, actividad proliferativa del tumor y metabolismo hepático, expresándose como un marcador de actividad celular y del metabolismo anaeróbico. La alteración de los niveles de la LDH5 reflejó su relación y asociación con el deterioro del estado general del paciente y su respuesta frente a la enfermedad, la actividad proliferativa y el potencial invasivo del tumor. Los cambios en la distribución del patrón de la LDH5 sugieren la tendencia a su localización en los tejidos tumorales con actividad metabólica anaeróbica.

Conclusiones

Si bien la LDH se determina de rutina en los pacientes con malignidades hematológicas, existe poca información relacionada con el contenido de las isoenzimas, sus alteraciones y la significancia pronóstica.

En el presente estudio observamos alteraciones específicas en el perfil sérico de las isoenzimas de LDH, asociadas y correlacionadas con las características clínico- patológicas y la biología del tumor en los pacientes con LNH. La interpretación de los resultados en valores porcentuales o absolutos tiene sus implicaciones; los valores en porcentaje serían el reflejo del desplazamiento o la tendencia de la dirección metabólica, mientras que en valores absolutos obtenemos el valor real de la actividad enzimática, lo cual es importante para la comparación de la actividad enzimática con otros estudios reportados.

En base a los resultados del presente trabajo es recomendable profundizar el estudio de las isoenzimas de LDH, a nivel molecular, celular y serológico, tanto en LNH como en otras malignidades hematológicas, en poblaciones de mayor tamaño asi como evaluar el patrón de isoenzimas de LDH considerando los diferentes subtipos de LNH, dada la heterogeneidad biológica de la enfermedad.

Agradecimientos

Al Profesor Leovigildo Garcia (UCV) por la asesoria estadística.

A la Fundación Badan por la colaboración en el financiamiento del estudio estadístico. Al Grupo Evo-Lab, C.A. por la donación de los reactivos para las Isoenzimas de LDH.

Referencias

1. Fisher RI, Mauch PM, Harris NL, Friedberg JW. Non-Hodgkin Lymphomas. En: Cancer Principles & Practice of Oncology. Vicent De Vita Jr, Samuel Hellman, Steve A Rosemberg. 7th Edition. Lippincott: Williams & Wilkins 2005, capítulo 41-2; 1957-97.
2. Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non-Hodgkin Lymphoma: An update. The Lancet Oncol. 2004; 5: 341-53.

3. Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR , Armitage JO, Bonadonna G, Brittinger G ,et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non Hodgkin's lymphoma Prognostic Factors Proyect. N Engl J. Med. 1993; 329:987-94.
4. Nicolaides C. Dimou S, Pavlidis N. Prognostic factors in agressive Non-hodgkin´s Lymphomas. The Oncologist. 1998 ; 3 : 189-97.
5. Rabasa MP. Factores pronósticos en los linfomas: Linfomas no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. Anales del Sistema Sanitario de Navarra 2001; 24 (suplemento 1) : 141-58.
6. Moore DF, Cabanillas F. Overview of prognostic factors in Non-Hodgkin´s lymphoma. Oncology 1998; 12 (10 suppl 8): 17-24.
7. Morra E. The biological markers of Non-Hodgkin´s Lymphomas: Their role in diagnosis, prognostic assessment and therapeutic strategy. Int J Biol Markers 1999; 14 (3): 149-53.
8. Montserrat E. Prognostic factors in aggressive lymphoma. The contribution of novel markers. Ann Hematol. 2001; 80: B42 – B44.
9. Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Veeken J, Bossuyi P. The clinical value of lactate deshydrogenase in serum: A quantitative review, Eur J Clin Chem. Clin Biochem. 1997; 35 (8): 569-79.
10. Schwartz M. Lactic dehydrogenease. An old enzyme reborn as a cancer marker? Am J Clin Pathol. 1991; 96 (4): 441- 43.
11. Dawson DM, Goodfriend ThL, Kaplan N. Lactic dehydrogenases: function of the two types. Scince.1964;43:929-33.
12. Adams MJ,Buehner M, Chandra SK,Ford GC,Hackert ML,Liljas A, et al. Stucture-function relationships in lactate dehydrogenese. Proc Nat Acad Sci. 1973;1968-72.
13. Henderson AR. Isoenzymes of lactate dehydrogenase. En: Methods of enzymatic analysis. Enzymes 1: Oxidoreductases, transferases. Bergmeyer; H.V, 3er Ed. Weinhein, Deerfield Beach, Florida, Basel Verlagdreinie. 1984; Vol III.
14. Sun Tsieh. Lactate dehydrogenase bioenzimes. En: Sun Tsieh Editor. Interpretation of protein and bioenzymes patterns in body fluids. USA. Igashun Shoin Medical Publishers, Inc; 1991 p.197-215.
15. Alibert G, Pulignano I, Proietta M, Corvisieri P, De Michelle LV. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the marrow and peripheral blood from haematologycally normal subjects. Physiol Res. 1997; 46:435-38.
16. Coiffier B, Gisselbrecht C, Vose JM. Prognostic factors in aggressive malignant lymphomas. Description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy. J Clin Oncol. 1991;9:211-19.
17. Dimopoulus MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple mieloma. Ann Intern Med. 1991;115: 931-35.
18. Paule B, Frnacoual J, Lindenbaum C, Derrieux C, Russo C, Gerbet D, et al. Lactate dehydrogenase isoenzyme activity in malignant haematologycal diseases. Biomed Pharmacother. 1984;38:62-65.
19. Rotenberg Z, Weinberger I, Fuchs Y, Erdberg A, Davidson E, Agmon J. Elevation of serum lactic dehydrogenase levels as an early marker of occult malignant lymphoma. Cancer 1984;54:1379-81.
20. Ricerca BM, Storti S, Compisi S, Pagano F, Dalla Torre R, Marra A, et al. Serum lactate dehydrogenase Isoenzymes pattern in non Hodgkin's lymphoma. Int J Biol Markers 1988; 3 (4): 237-42.
21. Dumontet C, Drai J, Bienvenu J, Berard EN, Thieblemont C, Bouafia F et al. Profiles and prognostic values of LDH Isoenzymes in patients with non-Hodgkin´s lymphoma. Leukemia 1999;13 (65):811-17.
22. Bouafia F, Drai J, Bienvenu J, Thieblemont C, Espinouse D, Salles G, et al. Profiles and prognostic values of serum LDH Isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. Bull cancer 2004; 91 (7-8): E229-40.
23. Coiffier B,Bastion Y, Berger F, Felma p, Bryon PA. Prognostic factors in follicular lymphoma. Sem Oncol. 1993; 20: 89-95.
24. Pan L, Xu J, Isaacson PG. Cellular H and M type lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and tumour diagnosis-an immunohystochemical assessment. Journal of Pathol. 1991; 163:53-60.
25. Pan L, Beverley PC, Isaacson PG. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and prolifeative activity of lymphoid cells on immunocytochemical study. Clin Exp Immunol. 1991;86:240-45.
26. Reisser T, Langgut W,Kersten H. The nutrient factor queuine protects Hela cells from hipoxic stress and improves metabolic adaptation to oxygen availability. Eur J. Biochem. 1994;221: 979-86.
27. Jurisic V, Konjevic G, Banicevic B, Djuricic B, Spuzic I. Different alterations in lactate dehydrogenase activity and profile of peripheral blood mononuclear cells in Hodgkin's and Non Hodgkin's lymphomas. Eur J Haematol. 2000;64:259-66.
28. Jurisic V. Estimation of cell membrane alteration after drug treatment by LDH release. Blood 2003;101(7):2894
29. Jurisic V, Janci´c-Nedeljikov R, Strenovi´c M, Banicevi´c B, Colovic M, et al. The comparison of spontaneous LDH release activity from cultures CMSP with sera LDH activity in Non Hodgkin's lymphoma patients. Med Oncol. 2004; 21(2): 179-85.
30. Jurisik V, Bumbasirevic V, Konjevic G, Djuricic B, Spuzix I. TNF-α induced changes in LDH isotype profile

following triggering of apoptosis in CMSP of Non Hodgkin's lymphoma. Ann Haematol 2004;3:89-91.

31. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller HK,Vardiman J, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. J. Clin Oncol.1999;17: 3835-49.
32. Feldman AL, Pittaluga S, Jaffe ES. Clasification and Histopatology of the lymphomas. En: Canellos GP, Lister TA, Young B, editors. The Lymphomas. Second Edition. Saunders Elsevier; 2006. p. 2-38.
33. Schag CC, Heinrich RL, Ganz PA. Karnofsky performance status revisited: Reliability,validity and guidelines. J Clin Oncol. :1984;2:187-193.
34. Zabner-Oziel P, Galizia C, Somoza R,Wallis V,Desenne J, Gonzalez M, et al. Valor pronóstico de los niveles séricos de la IL-6 en linfoma No Hodgkin. Act Cient de la Soc Venz de Bioanal Espec. 2006,9(1):11-21.
35. Galizia C, Zabner-Oziel P, Somoza R, Wallis V, Desenne J, González M, et al. Valor pronóstico de los niveles séricos del Receptor α soluble de Interleuquina-2 en pacientes con linfoma No Hodgkin. Act Cient de la Soc Venz de Bioanal Espec. 2007, 10(1):39-46.
36. Hasselblom S, Ridell B, Nilsson-Ehle H, Anderson PO. The impact of gender, age and patient selection on prognosis and outcome in diffuse large B- cell lymphoma-a population-based study. Leuk Lymphoma 2007; 48(49): 736-45.
37. Hermans J, Krol ADG, Groningen K, Kluin PhM, Kluin-Nelemans JC, Kramer MH, et al. International Prognostic Index for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma is valid for all malignancy grades. Blood. 1995; 88 (4): 1460-63.
38. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P,White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. Blood. 2004; 104 (5) : 1258-65.
39. Ngo L, H S-W, L L-C, Tao M, Quek R, Yap S-P, et al. Prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma: Before and after the introduction of rituximab. Leuk Lymphoma. 2008; 49(3):462-69.
40. Wollberg P, Nelson D. Regulation of the expression of lactate dehydrogenase isoenzymes in human lymphocytes. Mol Cell Biochem. 1992; 110:161-64.
41. Xue Q, Yeung ES. Determination of lactate dehydrogenase isoezlymes in single lymphocytes from normal and leukemia cell lines. J Chromatogr. B 1996, 677: 233-40.
42. Ferraris AM, Giuntini P, Gaetani GF. Serum lactic dehydrogenase as a prognostic tool for non-Hodgkin lymphomas. Blood 1979; 54:928-32.
43. Batsakis JG, Siders D. Enzyme molecular heterogeneity (isoenzymes) in surgical diagnosis. Arch Surg. 1967; 95:138-43.
44. Copur S,Kus S, Kars A, Renda N, Tekuzman G, Firat D. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in serum for patients with multiple myeloma. Clin Chem. 1989; 35:1968-70.
45. Buchbaum R, Liu FJ, Trujillo JM. Serum lactate dehydrogenase 3 isoenzyme in chronic granulocytic leukemia. Am J Clin pathol. 1991; 96:464-69.
46. Plum J, De Smedt M,. Enzimatic relationship beetwen human Ty+ lymphocytes and thymocytes. Cell Immunol. 198; 55: 485-89.
47. Blatt I, Spiegel RY, Papadopoulos NM, Lazarou SA, Magrath JT, poplack DC. Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal and malignant human lymphoid cells. Blood 1982; 60: 491-94.
48. Batlle M, Ribera JM, Oriol A, Pastor C, Mate JL, Fernandez Aviles F, Flores A, et al. Usefulness of tumor markers CA 125 and CA 15-3 at diagnosis and during follow up in non Hodgkin's lymphoma: study of 240 patients. Leuk & Lymphoma 2005; 46:1471-76.
49. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, et al. Lactate dehydrogenase -5 (LDH-5) overexpression in non small cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. Br J Cancer 2003; 89:877-85.
50. Marjanovic S, Skog S, Heiden T, Tribukait B, Nelson BD. Expression of glycolitic isoenzymes in activated human peripheral lymphocytes: Cell cycles analysis using flow cytometry. Exper Cell Res. 1991; 193: 425-31.
51. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS,Dang G, Jungmann RA, et al. C-Myc transactivation of LDH-A:Implication for tumor metabolism and growth. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94:6658-63.
52. Pathak Ch, Jaiswal YK, Vinayak M. Modulation in the activity of lactate dehydrogenase and level of C-Myc and C-Fos by modified base queuine in cancer. Cancer Biol Ther. 2008; 7(1):85-91.
53. Konjevic G, Jurisic V, Spuzic I. Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytoxicity. J Immunol Meth. 1997; 200:199-201.
54. Giatromanolaki A, Kourakis MI, Pezzella F, Sivridis E, Turley H, Harris AL, et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in non-Hodgkin B cell lymphomas is associated with hypoxia regulated proteins. Leuk Lymph. 2008; 49 (11): 2181-86.
55. Giatromanolaki A, Kourakis MI, Pezzella F, Sivridis E, Turley H, Harris AL, et al. Phosphorylated VEGFR2/KDR receptor are widely expressed in B-cell non Hodgkin's lymphomas and correlate with hypoxia inducible factor activation. Hematol Oncol. 2008; 26 (4):219-24.
56. Bairey O, Blickstein D, Stark P, Prokocimer M. , Nativ

HM , Kirgner I. et al.: Serum CA125 as a prognostic factor in Non-hodgkin´s lymphoma. Leuk Lymphoma 2003;44 (10):1733-38.

57. Dilek I, Ayakta H, Demir C. CA-125 levels in patients with non-Hodgkin's lymphoma and other hematologic malignancies. Clin Lab Hem. 2005; 27:51-55.
58. Zidan J, Hussein O, Basher W, Zohar Sh. Serum CA 125 , A tumor marker for monitoring response to treatment and follow up in patients with Non-Hodgkin´s lymphoma. The Oncologist 2004;9: 417-21.
59. Bonnet C, Beguin Y, Fassott MF, Seidel L, Luyckx F, Fillet G. Limited uselfulness of CA 125 measurement in the managment of Hodgkin's and non Hodgkin's lymphoma. Eur Jof Haematol. 2007,78:399-404.
60. Wei G, Yuping Z, Jun W, Bing Y, Qiaohua Z. CA 125 expression in patients with non-Hodgkin´s lymphoma. Leuk Lymphoma 2006:47(7):1322-26.
61. May LT, Santhanam U, Tatter SB, Helfgott DC, Ray A, Grayeb J, Sehgal PB. Phosphorylation of secreted forms of human interferon beta 2 / hepatocyte-stimulating factor /interleukin-6. Biochem Biophys Res Commun. 1988; 152:1144-50.
62. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshinot T, Tamaru J, Nakamura S, et al. Simultaneus elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non Hodgkin´s lymphoma. Eur J Haematol. 2002; 68:91-100.
63. Legouffe E, Rodriguez C, Picot MC, Richard B, Klein B, Rossi JF. C Reactive Protein Serum Levels in a valuable and simple prognostic marker in non-Hodgkin's lymphoma. Leuk lymphoma 1998, 31 (3-4):351-57.
64. Seymour J, Talpaz M, Cabanillas F, Wetzler M, Kurzrock R. Serum Interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. J Clin Oncol. 1995; 13(3): 575-582.
65. Duleti'A, Steffer S, Mariji S, Luc k, Valcovi'c T, Petranovi'c D, et al. Serum IL-6, IL-8, IL-10 and beta 2 microglobulin in association with Internacional index in diffuse large B cell lymphoma. Tumori 2008 (July-August); 94(4) (aprox 10 p). Disponible en: www.tumorionline.it/articoli.php?archivio=yes&vol_id=371&id=4332.
66. Mazzotta S, Guerranti R, Gozzetia A, Bucalossi A, Bocchia M, Sammassimo S, et al. Increased serum lactate dehydrogenase isoenzymes in ph-negative chronic myeloproliferative diseases: a metabolic adaptation? Hematology 2006; 11(4). 239-44.