

Gammapatías monoclonales. Enfoque metodológico desde el Laboratorio

Monoclonal Gammopathies A methodological view from the Clinical Laboratory

Pizzolato M¹

¹Departamento de Bioquímica Clínica. INFIBIOC.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA
Centro de Hematología Pavlovsky - CABA

mapizzolato@hotmail.com.ar

Fecha de recepción: 24/02/2016
Fecha de aprobación: 01/04/2016



ARTÍCULO
DE REVISIÓN

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 n° 1: 99-104
Enero - Abril 2016

Palabras clave: Gammapatías monoclonales,
Proteinograma electroforético,
Inmunofijación,
Cadenas livianas libres

Keywords: Monoclonal gammopathies
Protein electrophoresis
Immunofixation
Free light chain

Resumen

Se describe la opinión de distintos autores sobre las metodologías con que cuenta el Laboratorio Clínico para el correcto diagnóstico de las gammapatías monoclonales. El objetivo de esta revisión es proveer en forma resumida las nuevas técnicas y las clásicas, en uso actualmente, para la detección, tipificación y cuantificación de las gammapatías monoclonales.

Abstract

The opinion of different authors in connection with the classical and new technologies for the diagnosis of monoclonal gammopathies in the Clinical Laboratory is described. The aim of this review is to provide a summary of the most common methods in the Clinical Laboratory for the detection, typing and quantitation of monoclonal gammopathies.

Introducción

El Laboratorio Clínico cumple un papel fundamental no sólo en el diagnóstico de las gammopatías monoclonales, sino también en el control de evolución de las mismas.

El término gammapatía monoclonal (GM) descrito inicialmente por Waldenström, implica la aparición en sangre u otros líquidos biológicos de una inmunoglobulina (Ig) constituida por una sola clase de cadena pesada (gamma; alfa; mu; delta o epsilon) y un sólo tipo de cadena liviana (kappa o lambda). Son sintetizadas y secretadas por las células plasmáticas (CP) de la médula ósea (MO). En un principio se consideró a estas inmunoglobulinas monoclonales (Igm) como estructuralmente anómalas y se les dio el término de "paraproteínas". Esto fue así durante mucho tiempo hasta que en la década del 60 mediante los estudios de dilucidación de la estructura de los anticuerpos, se demostró fehacientemente que estas Igm no diferían estructuralmente de las Ig normales (policlonales). Históricamente representaron el primer "marcador específico" de tumores. Dentro de las GM se incluyen una serie de entidades clínicas tales como: el mieloma múltiple (MM), la macroglobulinemia de Waldenström (MW), la GM de significado incierto (MGUS), la enfermedad de las cadenas pesadas (HCD) en sus diversas formas (gamma, alfa y mu), el mieloma indolente o asintomático (SMM), la amiloidosis AL (AL), el plasmocitoma solitario, el extraóseo y el síndrome POEMS entre las más importantes, que cursan en alrededor del 98% de los casos con una GM en sangre o al menos en orina.

El MM es una expansión clonal de las CP que infiltra la MO u otros tejidos. El diagnóstico se realiza mediante tres elementos fundamentales: un porcentaje \geq al 10% de CP en MO, la presencia de imágenes líticas en huesos planos y largos y/o aplastamiento vertebral, y la presencia de una Igm en sangre y/o en orina. Los pacientes con MM presentan además lesiones orgánicas tales como: hipercalcemia, compromiso renal, anemia y lesiones óseas (CRAB), provocadas por la infiltración de CP o por acción de la Igm.

La MGUS, por el contrario, si bien cursa con una Igm en suero, la concentración de la misma es menor (\leq 3g/dl), al igual que el grado de infiltración de la MO por parte de las CP (\leq 10%). Se observa en individuos de edad avanzada pero clínicamente

asintomáticos.

Se ha demostrado últimamente que la MGUS sería un estadio premaligno, ya que las CP clonales muestran un fenotipo similar al de las CP del MM, desconociéndose sin embargo hasta el momento la o las causas que conducen a un estadio maligno. No obstante se han descrito distintos factores de riesgo para estimar la posibilidad de malignización a través del tiempo, como veremos más adelante.

La frecuencia de MGUS en la población normal por encima de los 50 años es de alrededor de 3-4 % en las distintas casuísticas⁽¹⁾.

El MM indolente o quiescente, "smoldering" (SMM) cumple con la alteración de los parámetros observados en el MM activo: concentración de la Igm \geq 3 g/dl e infiltración de CP en MO \geq al 10%, pero se mantiene asintomático. Representan un estadio intermedio entre la MGUS y el MM activo o sintomático.

Metodología de estudio de las GM

El Laboratorio de Proteínas cuenta con distinta metodología para la detección, tipificación y cuantificación de las GM.

El método más simple y al alcance de cualquier laboratorio general es el proteinograma electroforético (PE). Se puede realizar con técnicas manuales o automatizadas. En la actualidad se utilizan con igual grado de sensibilidad y precisión sobre soportes de agarosa o acetato de celulosa. Otra alternativa es la electroforesis capilar.

Independientemente del método utilizado es fundamental que se realice la cuantificación densitográfica del "pico" de la Igm, ya que es el parámetro que nos permitirá evaluar la evolución y la respuesta terapéutica a los distintos tratamientos y para determinar períodos de progresión, remisión y recaída.

Para la tipificación inmunológica de la Igm puede apelarse al método clásico de la inmunoelectroforesis (IEF) con antiseros específicos anti cadenas pesadas y anti cadenas livianas, si bien la metodología de mayor sensibilidad para evaluar monoclonalidad es sin duda la inmunofijación (IF). Mediante esta técnica se identifican inmunológicamente a las distintas clases de cadenas pesadas (gamma, alfa, mu, delta y epsilon) y a los distintos tipos de cadenas livianas (kappa y lambda) y así se determina el origen clonal de la Ig involucrada o sus fragmentos (mono o policlonales). Resulta imprescindible, ade-

más, en la identificación de bandas oligoclonales, las que se observan frecuentemente en el período post TAMO⁽²⁾, como posteriormente a la inducción con bortezomib o lenalidomida⁽³⁾. También puede ser realizada mediante técnicas manuales o automatizadas.

Suele complementarse con el dosaje específico de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, eventualmente IgD e IgE. Mediante estos valores se puede tener una idea del grado de inmunosupresión del paciente. Se realiza mediante inmunodifusión radial, nefelometría o por turbidimetría.

El estudio del cuadro proteico urinario es de fundamental importancia, ya que si bien cuando existe una Igm en suero resulta suficiente para el monitoreo de la GM, el cuadro de selectividad de la proteinuria nos da una idea del grado de compromiso glomerular y/o tubular y permite prever la presencia de cadenas livianas monoclonales libres (proteinuria de Bence

Jones), la que deberá ser confirmada por métodos inmunológicos con antisueros específicos anti cadenas livianas. Cuando la Igm está constituida solamente por cadenas livianas monoclonales resulta imprescindible el estudio proteico urinario, ya que por su bajo peso molecular sólo podrán ser detectadas en orina, aunque existen casos con “reflejo” sérico.

El PE en suero puede ser totalmente normal (inexpresivo) con distintos grados de hipogammaglobulinemia (lo más frecuente) e incluso, en un bajo número de casos, puede cursar con hipergammaglobulinemia policlonal. Estos casos pueden pertenecer tanto a una MGUS a cadenas livianas como a un MM micromolecular o incluso una amiloidosis AL. Ante la ausencia de cadenas pesadas de tipo gamma, alfa o mu corresponde investigar la posible presencia de cadenas pesadas de tipo delta o epsilon. Las MGUS a cadenas livianas están muy expuestas a desarrollar ulteriormente amiloidosis de tipo AL⁽⁴⁾.

La investigación de la proteinuria de Bence Jones (BJ) exige ser realizada mediante IEF o por IF con antisueros anti cadenas livianas (kappa y lambda). El método de la termosolubilidad, de sólo valor histórico, debe ser descartado absolutamente debido a su muy baja sensibilidad.

Las determinaciones habituales para la detección, tipificación y cuantificación de las GM han sido secuencialmente el proteinograma electroforético

(PE), la inmunolectroforesis (IEF), la cuantificación de las Ig y la inmunofijación (IF) en suero. Se complementan con el PE, la IEF o la IF de las proteínas en orina de 24 hs., sobre todo de las cadenas livianas, para la investigación de la proteinuria de BJ.

Cuantificación de cadenas livianas libres (CLL)

En 2001 Bradwell y col.⁽⁵⁾ describen un método específico y de alta sensibilidad (Freelite®) para la cuantificación inmunológica de las cadenas livianas libres (CLL) en suero. La prueba utiliza un antisuero policlonal que sólo reconoce un epítipo en la región oculta de la cadena liviana de la Ig completa (tetrapeptídica). Consiste en la cuantificación de la cadena liviana libre monoclonal (involucrada) y la cadena liviana libre policlonal (no involucrada).

En base a las mismas se calcula el cociente entre ambos valores que se expresa como la relación kappa/lambda, cuyos intervalos de referencia son 0,25 a 1,65⁽⁶⁾.

Desde la perspectiva de la biomedicina traslacional, resulta curioso que un hallazgo casual realizado en el año 1845 por el químico inglés Henry Bence Jones, demorara más de 100 años hasta que se descubriera su estructura química y recién en la primera década de este siglo se lograra desarrollar una metodología de alta especificidad y sensibilidad para cuantificar la proteína de BJ que no es otra cosa que las cadenas livianas libres de las Ig de origen monoclonal.

Existe controversia con respecto a los inmunoensayos que determinan la concentración de las CLL en suero y los que determinan la concentración de las cadenas livianas totales (libres y unidas a las cadenas pesadas). Estos últimos inmunoensayos han demostrado no ser adecuados para el diagnóstico y seguimiento de las GM debido a su baja sensibilidad^(7,8).

¿Cuál es la utilidad de esta nueva metodología?

La cuantificación de cadenas livianas libres posibilita fundamentalmente el diagnóstico y seguimiento de pacientes con MM “no secretor” u oligosecretor, ya que en esos casos no existe un marcador visible en suero ni en orina⁽⁹⁾. Con la utilización de esta técnica ha disminuido la proporción de MM “no secretorios”, debido a la elevada sensibilidad de la cuantificación de cadenas livianas libres⁽¹⁰⁾.

Resulta imprescindible también en el diagnóstico y seguimiento de la amiloidosis de tipo

AL y en la enfermedad por depósito de cadenas livianas (LCDD)⁽¹¹⁾.

Hay autores que la proponen en reemplazo del estudio urinario en pacientes con MM de tipo micromoleculares^(12,13), aunque otros no lo comparten⁽¹⁴⁾. Distintos trabajos la presentan también como un factor de riesgo para la evolución de MGUS y SMM a MM activo sintomático. Rajkumar y col. relataron que pacientes con MGUS con valores de Igm con una concentración \leq a 1,5 g/dl y relación kappa/lambda normal tenían un 2% de riesgo a 20 años de desarrollar una GM maligna⁽¹⁵⁾. Se considera además un parámetro precoz de respuesta y recaída, debido a la corta vida media de las cadenas livianas. El International Myeloma Working Group (IMWG) ha descrito pacientes con SMM, que no obstante estar asintomáticos y en ausencia de CRAB, serían pasibles de una intervención terapéutica inmediata por presentar valores de la relación kappa/lambda libre en suero \geq 100⁽¹⁶⁾.

Si bien hay trabajos que proponen el PE, la IF y la cuantificación de cadenas livianas libres en suero para el estudio sistemático de las GM en especial MM, MW e incluso el MM micromoleculares, prescindiendo del estudio urinario^(12, 17), en el caso de la AL y de las LCDD aceptan incorporar la IF en orina^(18,19).

En nuestro medio, donde no podemos dejar de considerar la relación costo-beneficio, el PE y la IF en orina, sumado al PE y la IF en suero, nos permiten evaluar, además de los MM y la MW, a los MM micromoleculares, a la AL y a la LCDD, y posteriormente complementar con la cuantificación de cadenas livianas libres más selectivamente.

Sensibilidad de los distintos métodos

Es importante para interpretar correctamente los distintos tipos de respuesta a los diversos recursos terapéuticos, tener idea de la sensibilidad de los distintos métodos de análisis.

El PE independientemente del método utilizado, posee una sensibilidad de 100 mg/dl, la IF por su parte detecta hasta niveles de 10 mg/dl y la técnica de CLL (Freelite) permite cuantificar hasta el orden de 1 mg/dl, es decir la cuantificación de cadenas livianas libres sería unas 10 veces más sensible que la IF y unas 100 veces superior al PE.

Tipos de respuesta al tratamiento

Los distintos tipos de respuesta terapéutica se establecen a través de la variación en la concentración

sérica de la Igm. Pueden mostrar: falta de respuesta, progresión, no respuesta-no progresión (estable), remisión parcial, muy buena remisión parcial o remisión completa.

El IMWG considera una serie de condiciones para la clasificación⁽²⁰⁾ de las mismas: Remisión parcial: reducción del \geq 50 % de la Igm en suero y reducción de \geq 90 % en la excreción de cadenas livianas en la orina de 24 hs. o \leq 200 mg/24 hs.

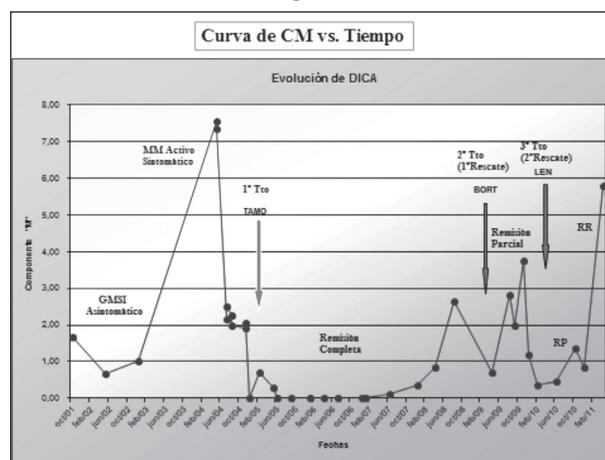
Muy buena remisión parcial: ausencia de Igm en el PE y presente en la IF o reducción de \geq 90 % de la Igm en suero y negatividad de las cadenas livianas en orina.

Remisión completa: Igm negativa no sólo en el PE de sangre y orina, sino además negativa a la IF de sangre y orina. CP en M.O. \leq de 5 %.

El IMWG definió un nuevo tipo de remisión completa, denominada "estricta" que exige, además de las condiciones para remisión completa, un cociente kappa/lambda libre normal de 0,26 – 1,65⁽²⁰⁾.

La **Figura 1** muestra un caso de nuestra casuística donde se observan los distintos estadios desde MGUS a SMM y a MM activo, y los períodos de remisión y recaída post TAMO, con los sucesivos rescates a través del tiempo.

Figura 1



Nuevos aportes metodológicos

Recientemente el grupo de Bradwell describe un nuevo ensayo para la cuantificación tanto de las cadenas pesadas como de las livianas del mismo isotipo (ej.: IgG kappa-IgG lambda, IgA kappa-IgA lambda, IgM kappa-IgM lambda) denominado "Hevylite®"⁽²¹⁾. Los autores proponen que mediante la determinación del cociente IgH kappa/IgH lambda

(Ig completa involucrada/Ig completa no involucrada) obtienen una medida de la inmunosupresión relacionando la Ig monoclonal con la Ig policlonal de igual isotipo. Hay trabajos que también lo proponen como el método más adecuado para detectar GM especialmente de tipo IgA, las que frecuentemente migran en la región beta de la electroforesis, e incluso en la alfa. Muchas veces quedan “camufladas” detrás de las bandas normales del PE, como transferrina, C3 o beta lipoproteína en la zona beta y alfa2 macroglobulina o haptoglobina en la zona alfa, en especial cuando se encuentran en baja concentración, dificultando su identificación.

Hemos estudiado un caso poco frecuente de Igm en la zona alfa1 a expensas de cadenas L monoclonales en un paciente portador de MM.

Otros autores han demostrado que la prueba Hevylite permitiría, además, determinar enfermedad mínima residual, así como acortar los tiempos de respuesta (remisión y recaída) y como factor de riesgo independiente, junto con la beta2 microglobulina, para estimar sobrevida^(22,23). La determinación cuantitativa de los niveles séricos de la beta2 microglobulina es importante además para la estadificación del paciente con MM y como factor independiente de pronóstico.

Hará falta acumular mayor experiencia en el uso de esta nueva técnica, para establecer el real valor y el aporte que brinda, antes de incorporarla al estudio sistemático de las GM.

Conclusión

Del análisis de las distintas metodologías con que cuenta el Laboratorio Clínico para la detección, tipificación y cuantificación de las GM y tratando de contar con un panel mínimo de técnicas para el estudio de las mismas, se llega a las siguientes conclusiones:

- cuando existe una Igm de alta concentración en suero, resulta suficiente el PE, por ejemplo en MM y MW, para su detección y monitoreo.
- en Igm de baja concentración, por debajo de 0,1 g/dl, la sensibilidad del PE no resulta suficiente, requiriendo técnicas de mayor sensibilidad como la IF y la cuantificación de CLL.
- en el caso de GM a expensas exclusivamente de cadenas livianas, donde el PE resulta inexpresivo, se debe utilizar la IF, la cuantificación de cadenas livianas libres y, sobre todo, incluir el

PE y la IF en orina de 24 hs., en especial para el estudio de AL, de MM micromolecular y de LCDD.

- frente a un MM “no secretor” u oligosecretor, la cuantificación de cadenas livianas libres resulta imprescindible, al igual que en la AL.

Finalmente existen distintas estrategias para el estudio analítico de las GM. Así por ejemplo Katzmann y col.⁽²⁴⁾ proponen que sólo con PE y cuantificación de cadenas livianas libres en suero detectan la mayoría de los MM, MW y SMM, y que agregan más selectivamente la IF en suero y los estudios en orina de 24 hs. No obstante afirman que un panel que incluya el PE, la IF y la cuantificación de cadenas livianas libres en sangre, más PE e IF en orina, son la combinación con mayor probabilidad para la detección de una GM

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV y col. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354: 1362-1369.
2. Alejandro M, Pavlovsky MA, Remaggi G y col. Serum free light chain in patients with multiple myeloma and autologous bone marrow transplantation. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 1093-1097.
3. Fernandez de Larrea C, Tovar N, Cibeira MT y col. Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy association with the use of novel agents. *Heamato-logica* 2011; 96: 171-173.
4. Laine ST, Soppi ET, Mörsky PJ. Critical evaluation of the serum kappa/lambda light chain ratio in the detection of M proteins. *Clin. Chim. Acta* 1992; 207: 143-149.
5. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP y col. Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chain in serum and urine. *Clin. Chem.* 2001; 47: 673-680.

6. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS. y col. Serum reference interval and diagnosis ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chain: relative sensitivity for detection of monoclonal light chain. *Clin. Chem.* 2002; 48: 1437-1444.
7. Delgado F, Kuus K. Comparison of free kappa and lambda light chain immunoassays and total (bound and free) kappa and lambda light chain immunoassays. *Rev. Invest. Clin.* 2014; 66: 473-474.
8. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 207: 114-118.
9. Drayson M, Tang LX, Drew R y col. Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001; 97: 2900-2902.
10. Terpos E, Apperley IF, Samson D y col. Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: improved survival in nonsecretory multiple myeloma but lack of influence of age, status at transplant, previous treatment and conditioning regimen. A single-centre experience in 127 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 163-170.
11. Abraham RS, Katzmann JA, Clark RJ y col. Quantitative analysis of serum free light chain. A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am J Clin Pathol.* 2003; 119: 274-278.
12. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA. Elimination of the need of urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1575-1578.
13. Hill PG, Forsyth JM, Rai B y col. Serum free light chain: an alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies?. *Clin. Chem.* 2006; 52: 1743-1748.
14. Beetham R., Wassell J, Wallage MJ. Can serum free light chains replace urine electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 516-522.
15. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM y col. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106: 812-817.
16. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo y col. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15: e538-e548.
17. Jenner E. Serum free light chain in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta* 2014; 427: 15-20.
18. Dispenzieri A, Kyle RA, Merlini G y col. International Myeloma Working Group guidelines for serum free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009, 23: 215-224.
19. Palladini G, Russo T, Bosoni T y col. Identification of amyloidogenic light requires the combination of free light chains assay with immunofixation of serum and urine. *Clin. Chem.* 2009; 55: 499-504.
20. Durie BG, Harousseau JL, San Miguel J. y col. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20: 1467-1473.
21. Bradwell A, Harding S, Fourrier N y col. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig γ k / Ig γ λ ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2013; 27: 202-207.
22. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N y col. Heavy/light chain assay for evaluation in myeloma. *Leukemia* 2013; 27: 213-219.
23. Lakomy D, Lemaire-Ewing S, Denimal D y col. Evaluation of the new Hevylite® IgA assay for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. *Ann Biol Clin* 2013; 71: 157-163.
24. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J y col. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin. Chem.* 2009; 55: 1517-1522.