

Detección y tipificación de las Gammopatías Monoclonales

Bragantini G. y Pizzolato M.

Departamento de Bioquímica Clínica – Fac. Farmacia y Bioquímica. Laboratorio de Proteínas. Hospital de Clínicas “José de San Martín”. UBA



ACTUALIZACION
EN LABORATORIO
HEMATOLOGICO

HEMATOLOGIA, Vol. 3 N° 1: 28-31
Enero - Abril, 1999

INTRODUCCIÓN

Las inmunoglobulinas son producidas por las células maduras de la progenie B de los linfocitos. Para que la producción se manifieste debe ocurrir un cambio estructural en el ADN celular. En este proceso los genes implicados en la síntesis de las cadenas livianas y pesadas de las inmunoglobulinas son sometidos a disrupciones y re-acoplamientos. Los procesos normales de maduración finalizan con células conteniendo genes de inmunoglobulinas con una estructura única y particular. Esta fase de diferenciación se lleva a cabo en la médula ósea, migrando posteriormente el linfocito a otros órganos linfoides. En una segunda etapa, el linfocito se selecciona mediante la presentación de antígenos propios del organismo (en la cual son eliminados numerosos tipos de rearrreglos con reactividad hacia estos). Las estirpes supervivientes son enfrentadas a los eventuales antígenos externos y se activa un proceso de mutación somática que provocará el último cambio en la estructura variable de las inmunoglobulinas. Una vez establecidas las mejores combinaciones para enfrentar al antígeno expuesto, se produce una fase de expansión clonal, en la cual cada linfocito B maduro produce un número de réplicas idénticas (productoras fundamentalmente de IgM e IgD). A continuación en una parte de estas células se producirá una última alteración del ADN que consiste en el cambio de la región constante de la cadena pesada. Este proceso, conocido como *switch* dará origen a diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgE) en el que también se produce ruptura y re-acoplamiento del ADN. A una parte de la población clonal (aparentemente del tipo

pre-switch) mediante mecanismos de interacción celular se les inhibe la apoptosis convirtiéndose en linfocitos de memoria. La otra parte de la población clonal migra a la médula ósea, donde en el microentorno que brinda las células del estroma, fundamentalmente la producción de interleuquina 6, los linfocitos maduran a plasmocitos y se produce una nueva expansión clonal.

Cualquier desregulación o alteración en los múltiples pasos que llevan a la producción de una inmunoglobulina podrá provocar o inducir la proliferación descontrolada y eventualmente la malignización de la estirpe celular afectada. La visualización de este fenómeno (la producción de gran cantidad de una inmunoglobulina con estructura única y definida) es lo que se conoce como Gammopatía Monoclonal.

CARACTERIZACIÓN DE LAS GAMMOPATÍAS MONOCLONALES

La caracterización de los componentes monoclonales se realiza mediante fraccionamientos electroforéticos realizados sobre soportes adecuados (acetato de celulosa o geles de agarosa) en condiciones que garanticen la observación de al menos 6 fracciones proteicas séricas: la albúmina y las globulinas alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 y la región gamma. A su vez se considera una buena calidad de fraccionamiento el que la zona gamma tenga una extensión mínima de 15 a 18 mm. En esas condiciones se deberá realizar un exhaustivo análisis cualitativo tomando como referencia el fraccionamiento de un suero normal de

control. En los últimos tiempos se han desarrollado técnicas de fraccionamiento automatizado utilizando soportes de vidrio (electroforesis capilar) con las que es posible obtener un grado de separación adecuada y altamente reproducible, en esta técnica la detección de las proteínas se realiza por elución sucesiva registrándose la absorción del enlace peptídico en el UV lejano (200 nm) en función de la distancia. Con estos datos es posible por procesos computadorizados construir una "imagen" equivalente al fraccionamiento electroforético tradicional.

Las inmunoglobulinas presentan hipervariabilidad de cargas por lo que se encuentran distribuidas desde el sector de siembra (en el cátodo) hasta la fracción alfa-2, con una notoria expresión en la zona gamma. La desregulación de un clon plasmocítico dará como origen la producción de una proteína homogénea, la que se visualizará generalmente como una banda adicional en el sector gamma (de allí la denominación gammopatía monoclonal). Es importante destacar que un número de estas inmunoglobulinas monoclonales podrán observarse en posiciones más anódicas superpuestas a las globulinas beta y alfa-2 o en los espacios entre estas fracciones. No es raro visualizar depósitos proteicos en el punto de siembra o condensaciones que determinan la necesidad de repetir la corrida con el agregado de sustancias reductoras como el beta mercaptoetanol o el ditiotretol, o modificando el punto de siembra hacia zonas más anódicas con el fin de provocar una expansión de la región gamma.

Ante la visualización de una banda homogénea se deberá discernir si la misma puede ser producida por alguna interferencia (por ejemplo hemoglobina en la zona beta-1 o fibrinógeno en la zona rápida de las gammaglobulinas) o, en caso contrario, definir el carácter anómalo de la misma.

TIPIFICACIÓN INMUNOLÓGICA

El paso siguiente consiste en la identificación de la inmunoglobulina monoclonal mediante ensayos inmunológicos. A tal fin se podrán realizar técnicas de inmunoelectroforesis, electroinmunofijación (ambas sobre acetato de celulosa o geles de agarosa) o de inmunosustracción.

Inmunoelectroforesis: En general se aplican adaptaciones a la técnica original descrita por Grabar y Williams, donde la muestra se aplica en forma puntual en la zona catódica y posteriormente al fraccionamiento electroforético se coloca el antisuero a ensayar en una canaleta realizada en forma paralela a la zona de corrida. El uso de anticuerpos oligoespe-

cíficos que reconocen por ejemplo a todas las inmunoglobulinas, los cuales son muy útiles al evaluar las inmunoglobulinas policlonales, debe evitarse cuando se procura identificar un componente monoclonal. En este caso es siempre preferible efectuar la técnica ensayando individualmente cada antisuero monoespecífico (para las cadenas pesadas anti- μ , anti- α , anti- γ , anti- δ y anti- ϵ y para las cadenas livianas anti- κ y anti- λ) enfrentando la muestra a un control normal. La identidad del componente «M» estará determinada por la presentación de un arco de precipitación que presente alguna inflexión y que se repita en la misma posición en algún antisuero contra cadenas pesadas y en solo uno de los dirigidos contra cadenas livianas. La metodología es relativamente sencilla pero presenta inconvenientes al momento de tipificar componentes de baja concentración.

Electroinmunofijación: Es un método más sensible que la inmunoelectroforesis. Básicamente la muestra se siembra igual que un proteinograma y finalizada la corrida se aplica homogéneamente sobre la superficie del soporte los distintos antisueros a ensayar (solo se aplican antisueros monoespecíficos). La precipitación "in situ" de los complejos inmunes formados se visualizará luego de efectuar un lavado con solución fisiológica, con el fin de eliminar las proteínas que no reaccionaron y la posterior coloración. Como control de movibilidades se requiere una corrida del suero del paciente efectuada de manera simultánea al ensayo. Las inmunoglobulinas policlonales darán una imagen heterogénea, mientras que el componente monoclonal será visualizado *con la misma movilidad y de la misma forma* que en el proteinograma control. La principal limitación de esta técnica consiste en tener bien titulados los antisueros, puesto que un exceso de antígeno dará lugar a redisolución del complejo inmune y consecuentemente a un resultado falso negativo.

Inmunosustracción: Consiste en absorber la muestra problema con los diferentes antisueros a ensayar y proceder al análisis de los resultados obtenidos después de formados (y precipitados) los complejos inmunes, respecto de la muestra en condiciones nativas. La dificultad para lograr una completa precipitación y la persistencia de otras proteínas aportadas por el antisuero eran fuertes limitantes para su aplicación. En los últimos tiempos se ha comenzado a aplicar una variante en la cual el antisuero se encuentra adherido a una fase sólida. Esta modificación permite remover fácilmente los complejos inmunes formados y no aporta contaminantes. El análisis de re-

sultados es, en cierta forma, reverso: la ausencia de componente "M" al utilizar determinados antisueros mono-específicos determina la identidad del mismo. Su uso en combinación con la electroforesis capilar es una reciente innovación en este campo.

ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

Una de las determinaciones complementarias más importantes en la evaluación de gammopatías monoclonales es el estudio proteico de orina, puesto que la observación de un componente "M" aislado en suero no es condición única ni concluyente de existencia de patología alguna, especialmente si son de baja concentración. A su vez si existe sospecha clínica de una patología linfoproliferativa, la ausencia (o aparente ausencia) en suero de un componente "M" no es determinante de exclusión. La búsqueda de cadenas livianas libres de origen monoclonal (CLLM) o proteína de Bence Jones es de fundamental importancia. La excreción de CLLM implica un riesgo potencial de alteraciones renales a nivel glomerular y/o túbulointersticial, con presentaciones clínicas agudas o crónicas. A su vez es conocido que la excreción de CLLM es un signo de mal pronóstico en la evolución de un paciente con un componente "M" con evolución aparentemente benigna.

Detección de cadenas livianas libres de origen monoclonal en orina: En la actualidad el mejor método para la detección de CLLM es el proteinograma en orina sin concentración previa. Este método utiliza metales pesados en suspensión coloidal como sistema de coloración de alta sensibilidad, evitando de esta manera la concentración de las muestras. Las muestras de orina centrifugadas se siembran puras con los sueros de los pacientes, diluidos 1/20 en solución fisiológica, como control de movilidad. La observación cualitativa es fundamental y la caracterización de cada banda observada debe ser evaluada por profesionales expertos. La identificación inmunológica puede ser realizada por electroinmunofijación, con o sin concentración previa de las muestras.

IMPLICANCIA CLÍNICA DE LAS GAMMOPATÍAS MONOCLONALES

Diariamente la médula ósea produce aproximadamente 10^{10} linfocitos B, de esos no más del 10% llegarán a la etapa madura y de no ser activados por la presentación antigénica son destruidos en escasos días. Como se señaló previamente cualquier anomalía en el complejo proceso de diferenciación y maduración puede inducir a una proliferación descontrolada. Aún se ignora cuáles son los procesos críticos

que determinan que un clon plasmocitario llegue a la etapa de malignización, pero hay alguna evidencia que al menos algunos de estos procesos serían independientes o al menos no interferirían con el proceso de maduración normal. La presencia de un componente monoclonal debe ser evaluada en este contexto.

Casi el 50 al 55% de los componentes "M" corresponden a la categoría de "benignos" o "gammopatías monoclonales de significado indeterminado" (MGUS, en la literatura anglosajona). Solo en casos excepcionales se demostró en estos pacientes la excreción de proteína de Bence Jones. El seguimiento clínico de hasta 30 años sobre este tipo de pacientes ha demostrado que casi un tercio de los mismos puede desarrollar enfermedades malignas.

De un 20 a 25% de los pacientes se encuadran dentro de las "gammopatías monoclonales secundarias o asociadas" y corresponden a cuadros que no involucrando directamente a la progenie B linfocitaria presentan usualmente débiles componentes "M". No es raro de observar en estos la característica de "transitoriedad", es decir al desaparecer la causa externa, el componente llega a niveles casi imperceptibles o desaparece en su totalidad. En esta categoría se incluyen los componentes "M" observados luego de trasplante de órganos (hematopoyéticos o no) y a los asociados a algunas neoplasias.

Finalmente casi el 25% de los componentes "M" responden a un origen maligno del clon productor. Dos son las patologías que más frecuentemente se ven asociadas a estos, el mieloma múltiple y la macroglobulinemia de Waldenström. También se los observa en la leucemia linfática crónica y en el linfoma linfoplasmocítico (en una menor proporción de casos). Otras patologías menos frecuentes son las enfermedades por cadenas pesadas en sus tres variantes conocidas (μ , α y γ) y otras patologías de presentación extraordinaria.

Por su parte la detección de CLLM cobra relevancia tanto en las variantes de mieloma con producción de inmunoglobulinas completas como en la variante con producción exclusiva de cadenas livianas: el mieloma micromolecular (aproximadamente un 20% de los mielomas). También es frecuente su observación en casos de macroglobulinemia. Otra patología en la cual es importante su detección es ante la sospecha de amiloidosis AL. La amiloidosis AL es provocada por el depósito tisular de fragmentos de cadena liviana y se puede presentar con manifestaciones renales, hepáticas o cardíacas. Otra enfermedad asociada es la "enfermedad por depósito de cadenas livianas" con características clínicas similares (usualmente síndrome nefrótico con proteinuria masiva en adultos) pero con cuadros histopatológicos diferenciales.

CONCLUSIÓN

El objetivo de la presente comunicación ha sido presentar sucintamente la variedad y complejidad de los cuadros asociados a la presencia de las diferentes variedades de Gammopatías monoclonales así como la importancia clínica actual de su correcta caracterización y tipificación.

Si bien las herramientas para el estudio de las mismas no han variado sustancialmente a lo largo del tiempo, las mejoras en las técnicas de estudio y el perfeccionamiento profesional para su evaluación perfilan para el futuro cambios que se verificarán en un aumento en la detección de los componentes monoclonales.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Bladé J. "Consideraciones sobre las gammopatías monoclonales de significado indeterminado". *Sangre* 1994, 39; 329.

- García M., Madalena L., Bragantini G., Bresciani P., Pizzolato M. "Electroinmunoafijación de orinas sin concentrar por coloración con metales pesados". *Acta Bioq. Clín. Latinoam.* 1996, 30; 215.
- Henskens Y., de Winter J., Pekelharing M., Ponjee G. "Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis". *Clin. Chem.* 1998, 44: 6.
- Kyle R. "Monoclonal gammopathy of undermined significance and solitary plasmacytoma". *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 1997, 11: 71.
- Kyle R. "Monoclonal proteins and renal disease". *Annu. Rev. Med.* 1994, 45: 71.
- Munshi N. "Immunoregulatory mechanisms in multiple myeloma". *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1997, 11: 51.
- Pizzolato M., Bragantini G., Bresciani P., Pavlovsky S., Chuba J., Vidal R., Rostagno A., Ghiso J. "IgG1-k biclonal gammopathy associated with multiple myeloma suggest a regulatory mechanism". *Br. J. Haematol.* 1998, 102: 503.
- Pizzolato M., Goñi F., Salvarezza R. "Immunofixation on cellulose acetate: an improved screening method for monoclonal immunoglobulines". *J. Immunol. Meth.* 1979, 26: 365.
- Wagner S., Neuberger M. "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes" *Annu. Rev. Immunol.* 1996, 14: 441.