

Estudio inmunoquímico de las proteínas del mieloma. Informe preliminar

Por los Dres.:

Miguel Matarama Peñate,²² Gerhard Bundschuh²³ y J. M. Ballester**

Matarama Peñate, M. et al. *Estudio inmunoquímico de las proteínas del mieloma. Informe preliminar.* Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973.

Se presenta un informe preliminar sobre el estudio inmunoquímico e inmunolectroforético de las proteínas del mieloma, su historia y clasificación. Se revisan algunos aspectos de laboratorio, incluyendo nuevos métodos diagnósticos de estas proteinopatías.

INTRODUCCION

La aplicación de las modernas técnicas de análisis inmunoquímico e inmunolectroforético, ha hecho variar notablemente el origen, estructura y clasificación de las proteínas del mieloma, modificando la antigua clasificación que de estos se tenía.

Es nuestro propósito revisar en este trabajo algunos aspectos de laboratorio, incluyendo nuevos métodos para el diagnóstico de estas proteinopatías.

El mieloma múltiple fue descrito clásicamente como un trastorno óseo generalizado, cuyo cuadro clínico comprendía manifestaciones dolorosas, fracturas patológicas, anemia, insuficiencia renal de curso crónico, y que termina en breves años en la muerte del paciente.

HISTORIA

Su primera descripción fue hecha en 1848 por *Niñtyre. Wettsony Bence Jones*,

habiendo señalado éste último que dichos enfermos eliminaban por la orina una sustancia albuminoide, descrita poco después como albuminuria de Bence Jones. *Khler*, en 1889, describe su cuadro clínico, y *W(dlgren, Zaddk, Rehr y Bcscis* completan su estudio citomorfológico al microscopio electrónico, señalando la infiltración medular por células plasmáticas.^{1,2}

El término paraproteína fue creado por *Apitz*³ para una proteína patológica, la cual es extraña para los componentes normales de la sangre. *Hebbs*⁴ las define como aquellas proteínas que corren como una banda anormal entre las posiciones alfa y gamma.

Otros sugieren las designaciones de globulinas anómalas, inmunoglobulinas anómalas, componente "M", "M" proteína, gamma globulinas monoclonales.

*Seligman*⁵ sugiere que son constituyentes normales en exceso.

En nuestro medio, algunos trabajos han sido publicados en relación con el estudio del mieloma,^{6,7} enfocando los aspectos clínicos y electroforéticos.

²² Especialista Instructor de Medicina Interna. Hospital "Calixto García". Universidad de la Habana.

²³ Instituto de Hematología e Inmunología. Hospital "Enrique Cabrera". Alta Habana.

CLASIFICACION

Antes de considerar estos aspectos, se hace necesario que estudiemos algunas concepciones relacionadas con las inmunoglobulinas.

Grabar y *Williati*¹¹ separan electroforéticamente las proteínas del plasma en agar gel, las precipitan por medio de antisueros y diferencian dos tipos de beta 2 globulinas: beta 2A, denominada gamma 1A por los norteamericanos; y beta 2M, denominada gamma 1M por los norteamericanos y beta 2 macroglobulina por los franceses.

A la gamma g se le denominó gamma 2.

La introducción posterior de métodos de ultracentrifugación permite diferenciar los constituyentes ligeros (7 S) de los pesados (19 S) donde se incluye la gamma M.

Estos términos crean confusión en la literatura y se hace necesario una nomenclatura estándar, la cual fue creada por un comité.¹²

Desde entonces queda establecido que las gamma globulinas son una heterogénea familia de proteínas, sintetizadas por las células plasmáticas, con un papel fundamental de defensa, y por tanto, denominadas inmunoglobulinas (IGs).

Trabajos posteriores de *Portar* y otros investigadores ponen de manifiesto que estas inmunoglobulinas están constituidas por cuatro cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas pesadas dan especificidad a la inmunoglobulina, mientras que las cadenas ligeras son comunes para todas.

Trabajando posteriormente con las proteínas de pacientes con mieloma, se logró ampliar estos conocimientos.

Actualmente se aceptan las siguientes inmunoglobulinas:

IG G, IG A, IG M, IG D, IG E, IGF (fetal).

A las cadenas pesadas de cada una de las inmunoglobulinas se les ha designado con las letras (y), (c), (jJ), (8), (s), respectivamente.

A las cadenas ligeras de las IGs se les denominó (K) kappa, (L) lambda. El 60% de las inmunoglobulinas normales del plasma está constituido por cadenas ligeras del tipo K y el 40% por cadenas tipo L.

Fue por inmunoelectroforesis, sobre todo después de los trabajos de *Hercmans*,¹³ que se aclara y erradica totalmente la antigua clasificación de los mielomas que fue definida a partir de los trabajos de *Wurhman* y *Wunderly*¹⁴ que consideraban a los mielomas en alfa, beta y gamma. Queda perfectamente definido en estos momentos que todos son gammas mielomas, diferenciándose de acuerdo con el tipo de proteína M que se produce en cada célula plasmática.

Existirán entonces, tantos tipos de mieloma como IGs se conozcan.

Así, se conocen actualmente:

Mielomas gamma G, gamma D, gamma A, gamma E y asociaciones de gamma G con gamma A, gamma G con gamma M, etc. Bence Jones Mieloma.

Estudios inmunofluorescentes han evidenciado que estas proteínas M son producidas por un clon celular, de ahí la denominación de gammapatías monoclonales. Se ha propuesto la clasificación de diclonales para la asociación de dos componentes M; a la luz de los conocimientos actuales tiende a considerarse como una discrasia de células plasmáticas.¹⁵

De acuerdo con el tipo de cadenas que esté presente se clasifican en kappa o lambda. Se conoce que la albuminuria de Bence Jones no es más que el producto de la eliminación de las cadenas ligeras por la orina.

Exámenes de laboratorio

Bence Jones en orina:

Dos métodos clásicos se han utilizado para el estudio simple de las proteínas urinarias:

Por medio del calor: Primeramente, se somete la orina a 50 grados de temperatura, donde podremos observar un enturbiamiento y coagulación de la proteína, y su disolución si continuamos el calentamiento hasta 90 grados.

La adición de 1 ml de paratolueno sulfónico al 12% a 3 ml de orina, produce igual efecto que su calentamiento. *Por medio de la precipitación:* El sulfato de amonio saturado en una proporción de 2 a 1, precedido de una diálisis de la orina, permite la separación de las cadenas ligeras, todo lo cual puede ser confirmado mediante la inmunoelectroforesis empleando antisueros específicos (antikappa y antilambda).

Electroforesis de las proteínas en papel.

En el suero:

Este proceder nos permitirá detectar un aumento global de las IGs, un pico anormal de base estrecha (tipo M) en las zonas de las alfa, beta o gamma. A la luz de los conocimientos actuales se sabe que sólo nos es de utilidad para diferenciarlas de las gammopatías de tipo policlonales en el curso de hepato-patías y otras afecciones neoplásicas, tomándose con alguna reserva, toda vez que se han detectado por inmunoelectroforesis gammopatías monoclonales enmascaradas dentro del pico de base ancha.

Inmunoelectroforesis

Este método fue introducido por *Grabar* y *Willian*, lo cual permitió una mejor comprensión de la composición de las proteínas plasmáticas.

Se utiliza como medio el agar, un buffer de veronal, así como antisueros totales y específicos, procedentes de conejos y caballos inmunizados previamente.

Un estudio inmunoelectroforético de las proteínas del mieloma nos puede ofrecer

los siguientes aspectos morfológicos:

1. Una gruesa línea de precipitación con cambios en su morfología localizada en las zonas de las alfa, beta, o más frecuentemente, en la zona de las gamma (figs. 1, 2a y 3).
2. Una línea adicional en la porción cóncava del engrosamiento de una línea de precipitación (fig. 1).
3. Ausencia de una línea definida de precipitación, ocupando en su lugar, la proteína del mieloma, el sitio de la siembra (fig. 2b).

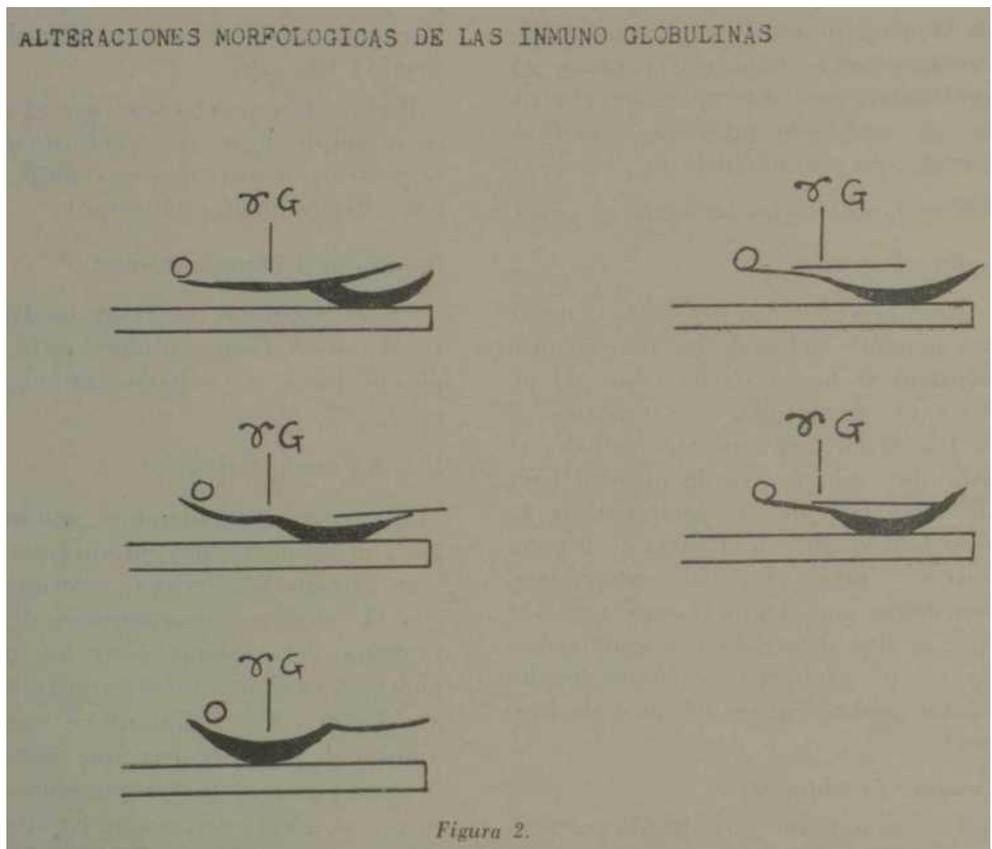
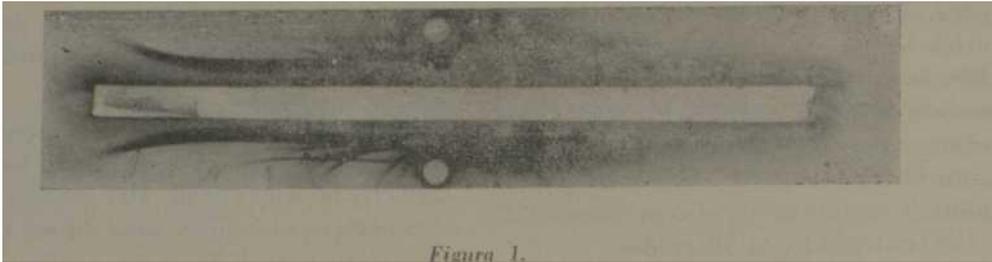
Esto se interpreta como que el antL suero empleado no es específico contra la proteína o bien que ésta última no tiene determinantes antigénicos.

Inmunoelectroforesis normal:

En la gráfica se observan las IGs G, IG M e IG A. Como antisuero se ha empleado suero de caballo antihumano, total.

Estudio inmunquímico:

Si revisamos la literatura publicada hasta el momento, nos encontramos una gran variedad de trabajos relacionados con el estudio inmunquímico de las proteínas del mieloma, entre los cuales podemos citar los interesantes trabajos de: *Fahey, Roive, Engle*^{16,17,18} donde aplican diversas técnicas que incluyen la precipitación de las proteínas mediante el sulfato de amonio, las sales de cinc, cromatografía en DEAE celulosa, la filtración en gel de Sephadex y otras sustancias. En publicación reciente, nos hemos referido a un simple método de separación de inmunoglobulinas del suero por medio del Sephadex G 200,¹⁹ lo cual nos facilita no sólo la separación de las IGs normales, sino también de las IGs del mieloma.



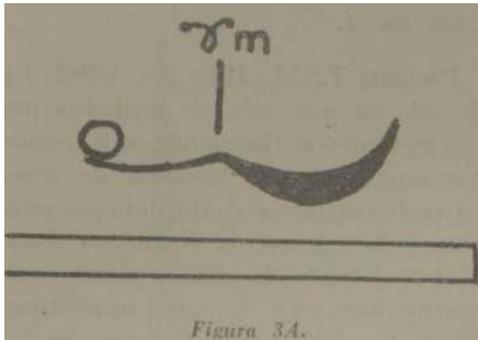


Figura 3A.

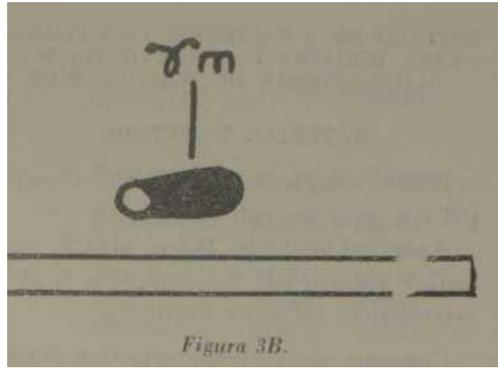


Figura 3B.

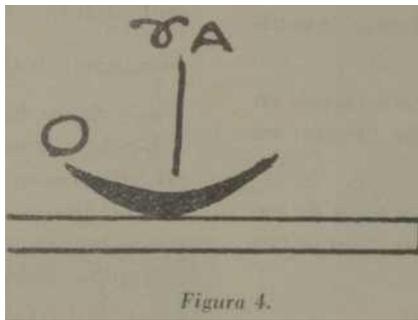


Figura 4.

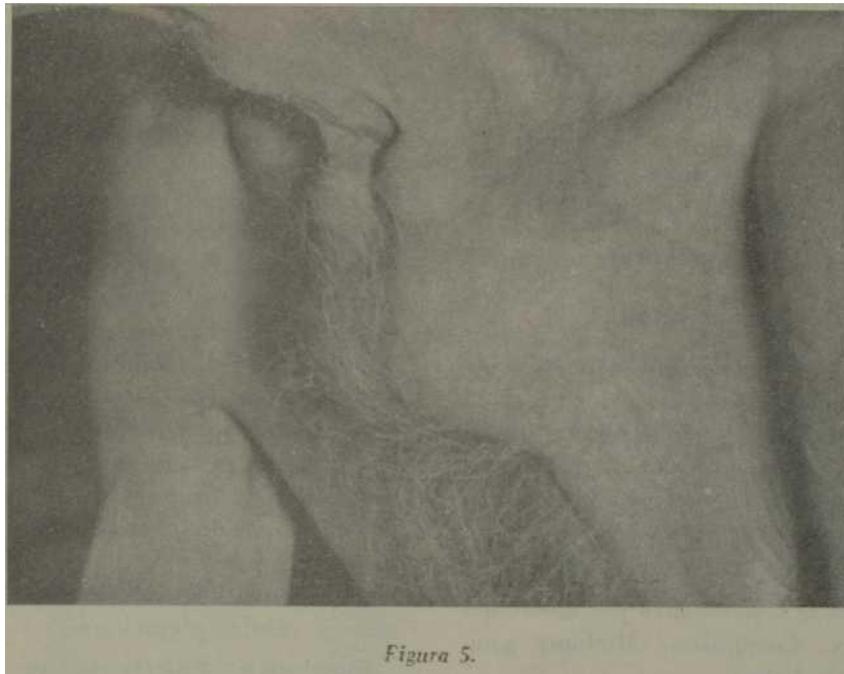


Figura 5.

ESTUDIO DE 3 PACIENTES CON PLASMA
C.ELL MIELOMA Y 1 CASO DE MACRO-
GLOBULINEMIA DE WALDESTROM.

MATERIAL Y METODO

Hemos empleado buffer de veronal pH 8.6 para las cubetas.

Agar noble de la Difeo al 1%, con buffer veronal pH 8.6 Sephadex G 20Ü, estabilizado en agua destilada.

Columna de material plástico según trabajo de *Bundschn y col.*¹⁰

Suero de cuatro pacientes a los cuales se les practicaron las siguientes investigaciones:

Mednlograma, eritro, electroforesis en papel, survey ose, Bence Jones en orina.

Como antisueros: Inmuno uero de caballo total. Inmunosuero de conejo an- tikappa y antilambda.

Caso No. 1

Paciente F.F.D., H.C. No. 163653. Ingresó en una sala de medicina, por un cuadro de dolores generalizados. Survey óseo con lesiones osteolíticas generalizadas. Medulograma con infiltración de células plasmáticas. Bence Jones en orina positivo.

Electroforesis de proteínas con una hipergamma de base estrecha.

In m u n oidctrofo resis:

a — Suero normal control.

b-c-d-e — Suero correspondiente al paciente, puro, diluido 1:4, 1:16 y 1:32 respectivamente, donde se pueden observar alteraciones morfológicas de las IGs G. Aparece un engrosamiento marcado de la línea de precipitación.

f-g-b-i-j — Corresponden a la separación de la Ig G patológica por medio del Sephadex. Conclusión: Mieloma gamma G tipo kappa.

Caso No. 2.

Paciente F.S.M., H.C. No. 15902. Ingresado en una sala de medicina por una minoración fluctuante en la región presternal, pérdida marcada de peso. Extensión de material obtenido por punción de la tumoración demuestra abundante infiltrado de células plasmáticas. Survey óseo con lesiones osteoíticas. Electroforesis de proteínas con una hipergamma de base estrecha. Ver figura del cuadro No. 2 y fotografía de la tumoración fig. 4.

In munolectroforesis:

a — Suero humano normal control.

b-c-d-e — Suero del paciente a distintas diluciones: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, donde aparece una marcada línea de precipitación, engrosada, y una fina línea sobreañadida en la concavidad de la línea de precipitación.

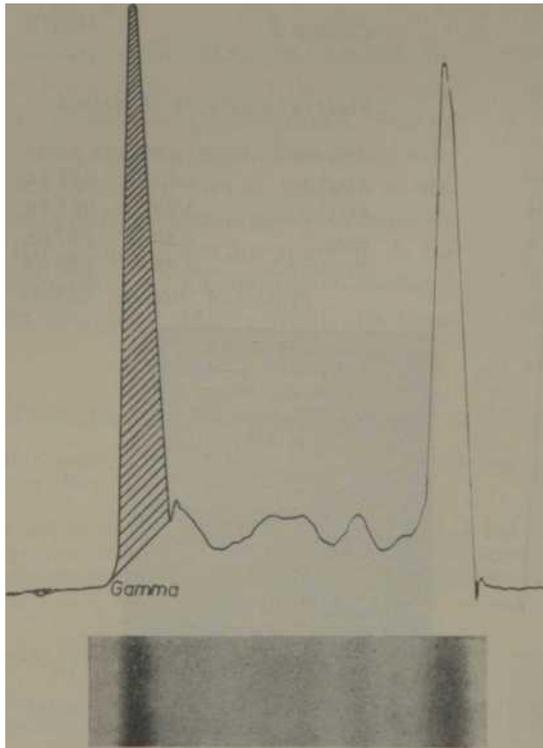
f-g-li — Separación de la Ig G por medio del Sephadex.

Conclusión: Mieloma gamma G.

Caso No. 3.

Paciente: F. R., H.C. No. 140417. Este enfermo ingresa en una sala de medicina por vez primera en el año 1967, con un cuadro respiratorio y una esplenomegalia con anemia, un cuadro de insuficiencia renal aparente (urea elevada) y creatinina. A su alta le diagnosticaron una leucemia linfática. En su segundo ingreso en 1968 se diagnostica como linfoma o enfermedad de Franklin. Bence Jones en orina: positivo. Electroforesis en papel con una hipergamma de base estrecha. Un tercer ingreso y una inmunolectroforesis demuestran la presencia de un marcado engrosamiento de la gamma M, prueba de Sia; positiva y un medulograma con infiltración de linfocitos y células plasmáticas.

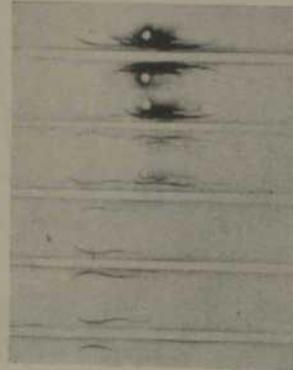
Conclusión: Enfermedad de Waldstrom.



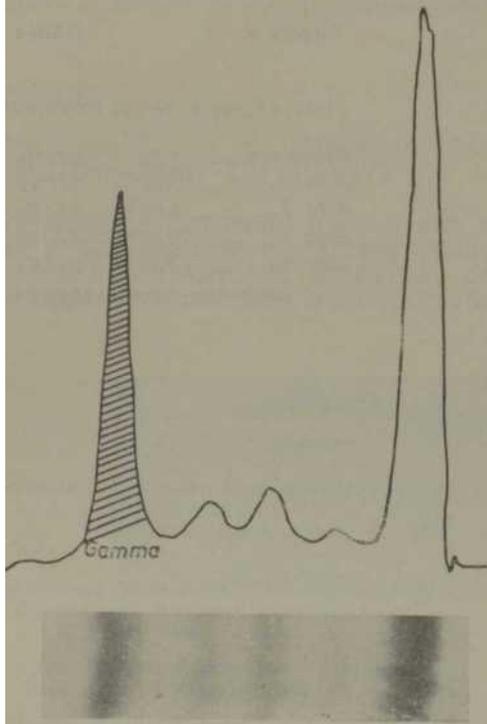
Cuadro 1 163653

Electroforesis de las Proteinas

Albúmina	33.50%	4.20 Gs
Alfa 1	3.20%	0.40 Gs
Alfa 2	6.40%	0.80 Gs
Beta	14.00%	1.75 Gs
Gamma	42.90%	5.35 Gs
Proteinas Totales		12.50 Gs



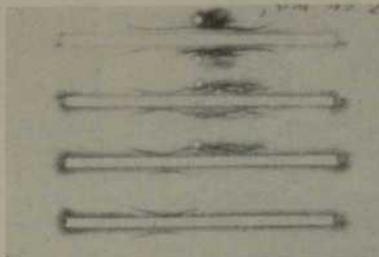
27 12 68



Cuadro 2 159102

Electroforesis de las Proteinas

Albúmina	50.50%	3.30 Gs
Alfa 1	3.80%	0.25 Gs
Alfa 2	9.40%	0.61 Gs
Beta	8.00%	0.52 Gs
Gamma	28.30%	1.82 Gs
Proteinas Totales		6.50 Gs



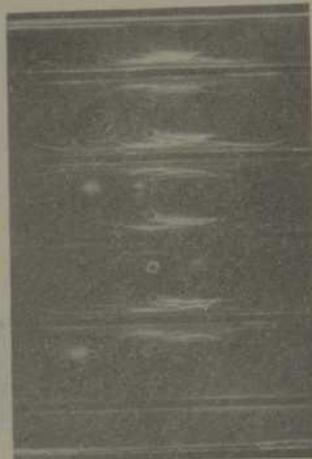
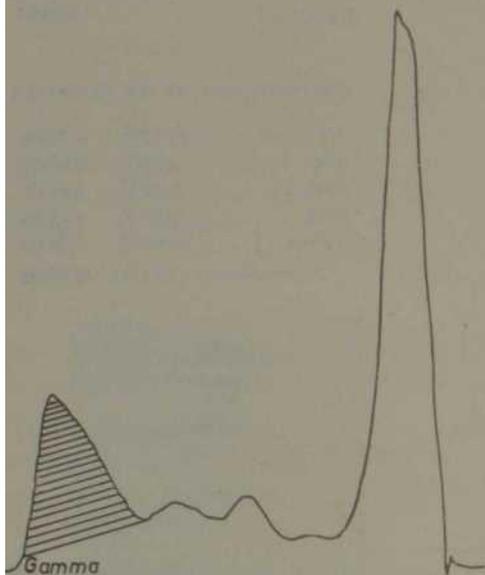
7 10 68

Cuadro 3

140417

Electroforesis de Proteinas

Albúmina.....	53.50%	4.25 Gs
Alfa 1.....	4.60%	0.37 Gs
Alfa 2.....	8.50%	0.67 Gs
Beta.....	8.50%	0.67 Gs
Gamma.....	24.90%	1.99 Gs
Proteinas Totales		7.95 Gs



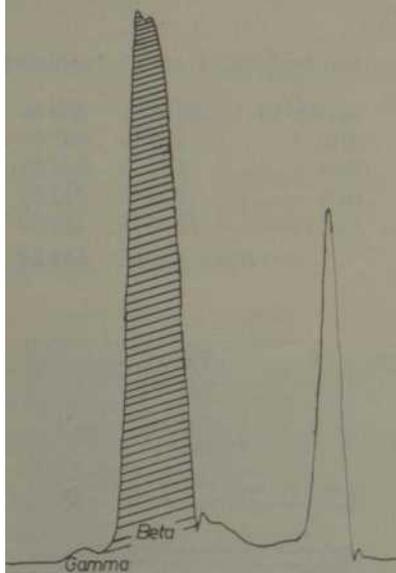
10 10 68

Cuadro 4

146864

Electroforesis de las Proteinas

Albúmina.....	21.20	2.20 Gs
Alfa 1.....	2.00%	0.21 Gs
Alfa 2.....	5.00%	0.53 Gs
Beta.....	70.50%	7.40 Gs
Gamma.....	1.30%	0.16 Gs
Proteinas Totales		10.50 Gs



24 10 68

CASO No. 4.

Paciente: A.M., H.C. No. 146864. In-
gresada con artenía, palidez de piel y mu-
cosas y dolores generalizados. Survey óseo
con lesiones osteolíticas generalizadas.
Electroforesis en papel: se demuestra una
hipogammaglobulinemia de las IGs
normales con un aumento de las
betaglobulinas. Una inmunoelectrofore-

sis en agar, pone de manifiesto una línea
de precipitación engrosada, con la adición de
una línea fina en la concavidad de la misma.

Este caso ilustra gráficamente la utilidad de
la inmunoelectroforesis en el diagnóstico de
proteínas del tipo de la gamma G, que migran
en las zonas de las beta. Conclusión: Mieloma
gamma G tipo kappa.

SU MM Alt Y

Matarama Peñate, M. et al. *Immunochemical study on myeloma's proteins. A preliminary re- port.* Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973.

A preliminary report on the immunochemical and immunoelectrophoretical study of myeloma proteins, its history and classification is presented. Some laboratory aspects, which include new diagnostic methods for these proteinopathies, are reviewed.

RESUME

Matarama Peñate, M. et al. *Etude immunochemique des protéines du myélome. Rapport préliminaire.* Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973.

On présente un rapport préliminaire sur l'étude immunochemique et immunoelectrophoretique des protéines du myélome, son histoire et classification. On révisé quelques aspects de laboratoire en incluant de nouvelles méthodes diagnostiques de ces protéinopathies.

FE3KME.

3pHaHjj.ec n., h jrp• Itey^eHne íojníeBOíi khcjioth h BHTaMma B-12. Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973

IlpoBOjniTCH H3yHeHHe oó ycnexax He tojibko óiioxiniíneckHX 3HaHitíi, hó ii KjniHiraecKHx od odMeHe cJojmeBOíi khcjioth h BHTaMHa B-12, h Tait~e o HeKOTOpHX acneKTax, cBH3aHHHX c paceTpoñeTBaMK, BU3- Ba.HHHMH HejtOCTaTKOM 3THX (JaKTOpOB.

- 1.—Bessis, M. y Scebat, L.: Etude des cellules de la serie plasmocyttaire. Etudes Cytologique dumyeloma. Presse Med 62: 662 1954.
- 7j.- Corchado Smitiago, M.: La disproteinemia del mieloma. Revista Clínica Española. Tomo 5. 15. 3, 1966.
3. —Apitz: Die papaprotino en. Virchow Arch (Path Anat). 306: 631, 1940.
4. —Hobbs, J. R.: Paraproteins benign or malignant. Brit. Med. J. 3: 699, 1967.
7. —Franco Solazar, G.: El Mieloma múltiple o plasmocitoma en el servicio de Medicina

BIBLIOGRAFIA

5. —Seligman, M., Basch, A.: The clinical significance or pathological immunoglobulins. Plenary session paper of the XII congress of the international Society of Hematology New York Grune and Stratton. 21: 1968.
6. —Más Martín, Julio y Corral, J. F.: Estudio de las proteínas del mieloma múltiple. Revista Cubana de Medicina. Vol. 3: No. 2, Abril 30, 1961.

- Interna del hospital "Comandante M. Fa. jardo".
Revista Cubana de Medicina. Vol. 3: No. 4,
Agosto 31, 1964.
8. *Burtin, P. and Bujfe, D.*: Inmunofluores- cent
Studies of human plasma cells in gamma and B2
a mieloma. Proc. Sec. Expr. Biolo. Med. 114: 171-
175, 1963.
 9. —*ffood, B. T.; Thompson. S. H. and Golds- tein,*
G.: Fluorescent antibody Staining IV.
Preparation of fluorescein-isothiocyanate.
Labeled antibodies. J. Immunology 95: 225-229,
1965.
 10. — *Bárbara, J.; Rosen, M. D. and Thornus W.*
Smith: Múltiple myeloma associated with two
aerum M componéis IG G type K arnl IG A typer
L.
 11. —*Grabar. P. Burtin*: Inmunolectroforesis. Toray
Massen S. A. Sep. 1968.
 12. —*No-menclature for human inmunoglobulins.*
Bull World Health Organ. 30: 447-450, 1964.
 13. —*Heremans, J.*: Les globulines sériques du
système gamma, leur nature et leur patho- logic.
Ed. Masson, Paris, 1960.
 14. —*Wurhmany Wunderly*: Las proteínas san-
guíneas en el hombre. Segunda edición. Editorial
Cientificomédica 1964.
 15. —*Osserman, E. L.*: Plasma Cell dyserasia. Cecil
Leeb. Text Book of Medicine. Bee- son P. B. and
Dermott N. MC. ed. Phyla- delphia W. B.
Saunders, 1967.
 16. *Fahey, J. L.*: Heterogeneity of Myeloma
proteínas. J. Clin. Investigation. 42: 11-123,
1963.
 17. —*Rotve, D. S. and Fahey, J. L.*: New Class of
Human jimmunoglobulins. I Unique myeloma
protcin. J. Expert. Med. 121: 171- 184, 1965.
 18. —*Entfle, R. L. Jr. and Nachman, R. L.*:
Two Bence Jones proteins of diferents immuno-
logyc types in some patient with multypale
myeloma. Blood 27: 74-77, 1966.
 19. —*Budschuh, G.; Ballester, J. M ; Matarama M.*: A
simplified method for the prepara tion of
inlinunoglobulins by gel filtration centrifugation.
Journal of chromatography. 45: 147-149, 1969.