

REARREGLOS DE GENES DE CADENAS PESADAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS  
EN LAS GAMMAPATIAS MONOCLONALESANDREA BOSALEH, VALERIA DENNINGHOFF, ALEJANDRO GARCIA<sup>1</sup>, CARLA RESCIA<sup>1</sup>,  
ALEJANDRA AVAGNINA, BORIS ELSNER*Servicio de Patología; <sup>1</sup>Servicio de Citometría de Flujo; CEMIC, Buenos Aires*

**Resumen** Las neoplasias de células plasmáticas resultan de la expansión de un clon de células B que secreta inmunoglobulinas, conocido como componente monoclonal o componente M. Las neoplasias malignas incluyen al mieloma múltiple y la macroglobulinemia de Waldenström, y la condición premaligna comprende las gammopatías monoclonales de significado incierto (MGUS). El MGUS presenta un componente monoclonal sin evidencia de mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis primaria u otros desórdenes. El diagnóstico se basa en la combinación de características patológicas, radiológicas y clínicas. Aproximadamente el 25% de las gammopatías monoclonales de significado incierto desarrollarán mieloma múltiple, amiloidosis sistémica, macroglobulinemia o enfermedades linfoproliferativas malignas, indicando que sería una condición premielomatosa. El objetivo del presente trabajo es establecer la utilidad clínica de la inmunofenotipificación por citometría de flujo (CF) y la detección de clonalidad por biología molecular. Se estudiaron 32 pacientes, siete con diagnóstico de mieloma múltiple y veinticinco con gammapatía monoclonal en estudio, los cuales fueron divididos en cuatro grupos basados en los datos clínicos y los resultados de CF. En el grupo de pacientes con CF no diagnóstica, se realizó la detección de los rearrreglos de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), detectándose monoclonalidad en el 59% de los casos. El estudio de los rearrreglos de los genes de las cadenas pesadas de las IgH mediante PCR incrementa la sensibilidad de detección de monoclonalidad.

**Palabras clave:** gammapatía monoclonal, MGUS, Rea-B

**Abstract** *Immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in the monoclonal gammopathies.* Plasma cell neoplasia occurs as a result of the expansion of an immunoglobulin-secreting B-cells clones, known as monoclonal component or M component. Malignant neoplasias include multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia, while premalignant conditions comprise monoclonal gammopathies of unknown significance (MGUS). MGUS present a monoclonal component with no signs of multiple myeloma, Waldenström macroglobulinemia, primary amyloidosis or other disorders. Pathological, radiological and clinical features are required for the diagnosis. Approximately 25% of patients with MGUS will become multiple myeloma, primary amyloidosis, macroglobulinemia, or other lymphoproliferative disease, which would be a premyelomatous condition. The objective of this study was to determine the clinical implications of immunophenotyping by flow cytometry and of the detection of clonality by molecular biology. A total of 32 patients were studied. Seven of them were diagnosed with multiple myeloma, and 25 with monoclonal gammopathy under study. These 32 patients were divided into four groups, based on their clinical data and flow cytometry outcome. In patients with non-diagnostic flow cytometry detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements by PCR was performed, and monoclonality was found in 59% of the cases. The study of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements by molecular biology allows a more sensitive detection of clonality.

**Key words:** monoclonal gammopathy, MGUS, Rea-B

Las neoplasias de células plasmáticas resultan de la expansión de un clon de células B que secreta inmunoglobulinas, conocido como componente monoclonal o componente M, que puede expresarse en condiciones malignas, benignas y premalignas. Entre las malignas

se pueden encontrar el mieloma múltiple (MM) y la macroglobulinemia de Waldenström, y entre las neoplasias premalignas se incluyen las gammopatías monoclonales de significado incierto (MGUS)<sup>1</sup>.

El MM es el prototipo de gammapatía monoclonal (GM) maligna que representa el 15% de los procesos neoplásicos hematológicos<sup>2</sup>. La misma se caracteriza por la presencia de una proteína sérica monoclonal, destrucción esquelética con lesiones osteolíticas, fracturas patológicas, dolor óseo, hipercalcemia y anemia. Esta enfermedad posee un espectro que va desde las formas

Recibido: 17-VI-2004

Aceptado: 17-III-2005

**Dirección postal:** Dr. Boris Elsner, Servicio de Patología, CEMIC, Galván 4102, 1431 Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-11) 4546-8264

e-mail: belsner@cemic.edu.ar

localizadas conocidas como plasmocitomas, hasta las formas agresivas y diseminadas como la infiltración de células plasmáticas en varios órganos, tales como el riñón, conocido como riñón del mieloma, el compromiso neurológico por compresión medular<sup>3</sup>, leucemias de células plasmáticas y desórdenes secundarios al depósito de cadenas pesadas en tejidos<sup>1</sup>. El diagnóstico está basado en las características patológicas, radiológicas y clínicas, requiriendo como mínimo un criterio mayor y uno menor, o tres criterios menores (Tabla 1). El MM habitualmente es una enfermedad incurable con una sobrevida media de 3 años<sup>4, 5</sup>.

La MGUS podría ser el prototipo de gammapatía monoclonal (GM) premaligna que se caracteriza por presentar un componente M sin evidencia de MM, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis primaria u otros desórdenes. Se asocia a plasmocitosis medular menor al 10%, sin presentar lesiones óseas líticas ni síntomas relacionados con el MM. Los pacientes suelen ser asintomáticos y el componente M se pone en evidencia al realizar un proteinograma electroforético, método que detecta la banda característica de proteína monoclonal. La MGUS presenta una prevalencia del 1% en pacientes mayores de 50 años y del 3% en los mayores de 70 años<sup>1</sup>. Algunos autores citan que aproximadamente el 25% de los pacientes con MGUS desarrollan MM, amiloidosis primaria, macroglobulinemia de Waldenström y otras enfermedades linfoproliferativas luego de un seguimiento de más de 20 años post-detección<sup>1, 6, 7</sup>. El intervalo medio entre reconocer la proteína monoclonal y el diagnóstico de mieloma múltiple, macroglobulinemia y amiloidosis es de aproximadamente 10 años<sup>1, 6</sup>. El MM puede desarrollarse en cualquier momento posterior a la detección inicial del MGUS, dado que la curva que describe el riesgo de desarrollar MM no posee *plateau*<sup>7, 8</sup>, por lo tanto los pacientes con una población de células monoclonales deben ser controlados de por vida<sup>6, 7</sup>.

En nuestro trabajo se estudiaron pacientes con gammapatía en estudio (GE) y pacientes con diagnóstico

de MM que recibieron tratamiento quimioterápico (melfalan, VAD: vincristina- doxorubicina-dexametasona), sin trasplante de médula ósea. El grupo GE se define como pacientes asintomáticos con detección del componente M en suero o en orina, detectado mediante inmunoelectroforesis. A todos estos pacientes se le realizó en paralelo un estudio histopatológico de la biopsia de médula ósea (BMO) e inmunofenotipificación por citometría de flujo (CF) de la punción aspiración de médula ósea (PAMO), para evaluar el porcentaje de infiltración por células plasmáticas. Posteriormente, en los pacientes con inmunofenotipificación negativa, se efectuó la detección de los rearrreglos de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Rea-B) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica altamente sensible.

El objetivo del presente trabajo fue establecer la utilidad clínica de la inmunofenotipificación por CF y la detección de clonalidad mediante PCR.

## Materiales y métodos

Se recibieron 51 pacientes en estudio por GM en el Servicio de Patología del CEMIC entre los años 1999 y 2002, de los cuales se seleccionaron 32 que contaban con BMO y PAMO para realizar estudios comparativos. Contamos con 17 hombres y 15 mujeres con una edad media de 62.9 años (rango a 52 de 82 años). Siete de ellos tenían diagnóstico previo de MM y 25 de GM en estudio.

**Histopatología:** las BMO fueron fijadas con una solución bufferada de formol y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de 3 micras ( $\mu\text{m}$ ) los cuales fueron coloreados con hematoxilina y eosina. Se obtuvieron nuevas secciones de  $3\mu\text{m}$  y se incubaron con el anticuerpo monoclonal CD138 o *syndecan-1*<sup>9</sup> (DAKO, Carpenter, California, EE.UU., 1:50) utilizando el complejo avidina-biotina aplicando el *kit Vectastin Elite* (Vector Labs, Burlingame, EE.UU.). Se reveló con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (Aldrich), se acentuó la marcación con sulfato cúprico y se contrastó con hematoxilina virada en carbonato de litio. Con ambas técnicas se evaluó el porcentaje de compromiso medular de células plasmáticas.

**Citometría de Flujo:** en el material de las PAMO remitidas se realizó separación de mononucleares por gradiente de densidad con *Ficoll-Hypaque* (Sigma, St. Louise, EE.UU.). Las células se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 revoluciones por minuto (r.p.m.). El material obtenido fue resuspendido en *buffer* PBS y centrifugado a 1500 r.p.m. durante 25 minutos. Las muestras se dividieron en tubos con un recuento final de  $5 \times 10^5$  células por tubo y fueron marcadas con 20 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de los siguientes anticuerpos mono y policlonales: CD7 (FITC), CD8 (FITC), CD38 (FITC y PE) de *Immunotech* (Marseille, Francia), CD3 (PE), CD19 (PE y Per CP), CD4 (PE), CD45 (Per CP), CD56 (PE), CD10 (FITC) de *Becton Dickinson* (San José, CA, EE.UU.),  $\kappa$ : *kappa* (FITC),  $\lambda$ : *lambda* (FITC y PE) de *Dako* (Glostrup, DK). Los tubos fueron incubados en la oscuridad a 4°C durante 30 minutos. Luego fueron lavados con *buffer* PBS y centrifugados a 1500 r.p.m. durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron en *buffer* PBS y se analizaron con un citómetro de flujo *FACScan* de *Becton Dickinson Immunocytometry Systems* utilizando el programa *CELL Quest*. Se realizó análisis multiparamétrico de las distintas poblaciones celulares basado en propiedades morfológicas: *Forward Scatter* (FSC) y *Side Scatter* (SSC), y la intensidad

TABLA 1.- Criterios diagnósticos para mieloma múltiple

### A - Criterios mayores:

- Plasmocitosis medular mayor a 30%.
- Plasmocitoma en biopsia.
- Componente M:
  - sérico: IgG>3.5g/dl, IgA>2g/dl.
  - urinario: proteinuria de Bence-Jones >1g/24 hs.

### B - Criterios menores:

- Plasmocitosis medular entre el 10 y 30%.
- Componente M: presente pero menor.
- Ig normales reducidas (<50% del normal).

Ig: inmunoglobulinas; g/dl: gramos/ decilitro; g/hs: gramos/horas.

de la fluorescencia. Las poblaciones se discriminaron basándose en FSC, SSC y la expresión de CD45. Para evaluar cadenas livianas, IgG e IgA citoplasmáticas se utilizó el *kit* de permeabilización de *Immunotech* (Marcella, Francia). Se definieron como monoclonales las poblaciones de células plasmáticas con una relación  $\kappa/\lambda$  mayor o igual a 5 o menor a 0.5.

**Amplificación por PCR:** en los 16/32 casos con CF negativa, se purificó ADN a partir de muestras en fresco mediante una digestión en *buffer*-PK (100 milimolar (mM) Tris HCl-ph=8, 25mM EDTA, 0.5% SDS, 0.01% PK) a 12 horas 42 °C. Las fracciones lipo-proteicas fueron extraídas con fenol-cloroformo-isoamílico (*Carlo Erba*, Italia). El ADN purificado fue precipitado con NaCl/isopropanol y resuspendido en T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>(Tris-EDTA). La pureza y el rendimiento del ADN obtenido fueron medidos por espectroscopia. Se analizó la presencia de una población clonal B mediante la amplificación de un fragmento de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, con el *primer* VH (5'-CTGTGCGACACGGCCGTGTA-TTACTG-3) homólogo a la secuencia cercana al extremo 3' de la región FR3 altamente conservada y un segundo *primer* JH (5'-AACTGCAGAGGAGAC-GGTGACC-3') de una secuencia consenso, que determinan diferentes fragmentos comprendidos entre 90-160 pares de bases (pb) debido a la variabilidad dada por los reordenamientos de los genes discontinuos de las inmunoglobulinas<sup>11</sup>. Existen innumerables *primers* descritos en la literatura con diferentes ventajas y desventajas para el estudio de procesos linfoproliferativos. Elegimos este ensayo porque es simple (requiere un solo par de primer consenso para los reordenamientos VH/JH), rápido (no es una técnica *nested*, no utiliza primers múltiples, no requiere secuenciación posterior, ni geles desnaturizantes), sensible (detecta 82% de los procesos linfoproliferativos comparados con la técnica de *Southern Blot*), específico (no tiene resultados falsos positivos), no radiactivo (no utiliza sondas marcadas con radioisótopos), versátil (puede ser utilizado a partir de material en fresco o fijado en formol y parafinado), reproducible y económico (no es necesario utilizar una técnica cuantitativa)<sup>12</sup>. La amplificación fue realizada en un volumen de reacción de 25  $\mu$ l usando 500 nanogramos (ng) de ADN total. Cada tubo de reacción contenía 25 picomoles de cada *primer*, 200 micromolar ( $\mu$ M) de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM Cl<sub>2</sub>Mg y 1 unidad de Taq polimerasa (*Promega*, WI, EE.UU.). Después de un paso inicial de desnaturización a 94 °C durante 5 minutos fueron realizados 30 ciclos de amplificación (desnaturización a 94 °C durante 40 segundos, *annealing* a 56 °C durante 40 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto) con una elongación final a 72 °C durante 5 minutos. En cada *pool* de reacciones se amplificó ADN correspondiente a una leucemia linfática crónica B como control positivo, ADN purificado a partir de leucocitos extraídos como controles negativos y ausencia de ADN (agua) como blanco de amplificación. Un fragmento de 110 pb del gen de la beta-globina humana fue investigado en todas las muestras como control de amplificación, verificando la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra<sup>13</sup>. Las PCR fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% en *buffer* TBE 1X (Tris-bórico-EDTA), visualizadas con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta y fotografiadas.

## Resultados

A partir del estudio histopatológico de las BMO se estableció el porcentaje de infiltración de células plasmáticas (CP) en forma semicuantitativa utilizando los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, y el anticuerpo mono-

clonal CD138. El análisis de la inmunofenotipificación mediante CF a partir de las PAMO mostró un inmunofenotipo clásico de MM en 16/32 casos: CD45-, CD38+ (intenso), CD56+, CD19-, CD10+/-, CD3-, CD4-, CD7-, CD8- con restricción de cadenas livianas citoplasmáticas, considerando este inmunofenotipo como un resultado positivo. Dentro de este grupo, 12/16 individuos mostraban IgG *lambda* y 4/16 IgA *kappa*. La capacidad de detección de la CF dependió básicamente del número de CP en médula ósea, dado que esta técnica identificó clonalidad en el 100% de los casos cuando la infiltración con CP era mayor al 10%, en el 84% de los casos cuando se consideraban las muestras con infiltración mayor al 5% y en el 76% de los casos cuando se evaluaban aquellas mayores al 1%.

La población estudiada fue dividida en cuatro grupos (A, B, C y D) de acuerdo al diagnóstico clínico y el resultado de la CF (Tabla 2). En el grupo A y B se incluyeron los pacientes con inmunofenotipo positivo. En el grupo A se encontraban los pacientes con GE y en el grupo B los que tenían MM post-tratamiento. Por otro lado, en el grupo C y D se incorporaron pacientes sin clonalidad mediante CF. En el grupo C se encontraban los pacientes con GE y en el grupo D los que tenían MM post-tratamiento. El grupo A contaba con 11 individuos, (8 mujeres y 3 hombres), con infiltraciones de CP en BMO entre el 5 y el 80% (mediana 10%). El grupo B incluía 5 pacientes, (1 mujer y 4 hombres) con infiltraciones en BMO de CP entre el 5 y el 80% (mediana 20%). El grupo C tenía 14 pacientes (4 mujeres y 10 hombres), que presentaban infiltraciones de CP en BMO menores al 5% y el grupo D incluía 2 pacientes de sexo masculino con infiltraciones medulares menores a 1% (no detectables con los métodos de rutina).

Mediante el estudio molecular 12/14 pacientes del grupo C fueron considerados evaluables. No se obtuvo material amplificable (tasa de fracaso) en 2/14 pacientes. En 7/12 (59%) individuos se observó una banda de amplificación de mayor intensidad entre 90-160pb correspondiente a la población clonal B sobre una *smear* que representa las demás poblaciones B. Dentro del grupo D se observó monoclonalidad en uno de los dos individuos (Tabla 3).

## Discusión

De acuerdo con la literatura, se ha observado que el 25% de los pacientes con MGUS pueden desarrollar MM, amiloidosis primaria, macroglobulinemia u otros desórdenes linfoproliferativos<sup>1, 6, 7</sup>. El intervalo comprendido desde el reconocimiento del componente M hasta el diagnóstico de las entidades anteriormente descritas es de aproximadamente 10 años, por lo tanto los pacientes con MGUS deberían tener un seguimiento clínico por el ries-

TABLA 2.- Resultados comparativos de histopatología y citometría de flujo

Grupo	Nº	Clínica	Diagnóstico Histológico	BMO (% de CP)	CF	Cadenas livianas (CF)
A	1	GE	MM	<10	POS	IgG <i>lambda</i>
	2	GE	MM	30	POS	IgG <i>lambda</i>
	3	GE	MM	40	POS	IgG <i>lambda</i>
	4	GE	MM	10	POS	IgA <i>kappa</i>
	5	GE	Amiloidosis	10	POS	-
	6	GE	DM	5	POS	IgG <i>lambda</i>
	7	GE	MM	10	POS	IgG <i>lambda</i>
	8	GE	MM	70	POS	IgG <i>lambda</i>
	9	GE	MM	80	POS	IgG <i>lambda</i>
	10	GE	MM	30	POS	IgG <i>lambda</i>
	11	GE	MM	10	POS	IgG <i>lambda</i>
B	12	MM	MM	5	POS	IgG <i>lambda</i>
	13	MM	MM	80	POS	IgA <i>kappa</i>
	14	MM	MM	80	POS	IgG <i>lambda</i>
	15	MM	MM	20	POS	IgG <i>lambda</i>
	16	MM	MM	20	POS	IgA <i>kappa</i>
C	17	GE	Hipoplasia	<1	NEG	-
	18	GE	HI	<1	NEG	-
	19	GE	HI	3	NEG	-
	20	GE	HI	3	NEG	-
	21	GE	DM	5	NEG	-
	22	GE	Plasmocitosis	5	NEG	-
	23	GE	Hipoplasia	<1	NEG	-
	24	GE	DM	<1	NEG	-
	25	GE	DM	5	NEG	-
	26	GE	HI	<1	NEG	-
	27	GE	HI	<1	NEG	-
	28	GE	HI	<1	NEG	-
	29	GE	DM	<1	NEG	-
	30	GE	HI	<1	NEG	-
D	31	MM	HI	<1	NEG	-
	32	MM	Medula adiposa	<1	NEG	-

GE: gammapatía en estudio; DM: descripción morfológica; HI: hallazgos incharacterísticos; <1=menos a 1%; BMO: biopsia de médula ósea; CF: Citometría de flujo, POS: positivo; NEG: negativo; MM: mieloma múltiple; CP: Células plasmáticas.

go de una enfermedad progresiva<sup>1,6,7</sup>. El diagnóstico de las GM se realiza mediante datos bioquímicos, radiológicos, clínicos, histopatológicos e inmunofenotipificación por CF. Para el estudio histopatológico es importante determinar en cortes de rutina, teñidos con hematoxilina y eosina el porcentaje de CP, que no es fácil de evaluar cuando las infiltraciones de CP son escasas. Por lo tanto se procede a aumentar la sensibilidad, utilizando un inmunomarcador para facilitar el conteo celular. En nuestro trabajo se utilizó el anticuerpo monoclonal CD138 que se corresponde con estadios tar-

díos de la diferenciación B<sup>10</sup> y que se expresa con alta densidad en CP normales, malignas viables<sup>16</sup> y linfoplasmocitoides<sup>17,18</sup>. El CD138 es un marcador específico de CP y no muestra asociación con otras células hematopoyéticas o endoteliales<sup>15</sup>. La infiltración por CP mayor o igual al 30% es criterio diagnóstico de MM<sup>1</sup>. Nuestros resultados arrojan en 14/32 BMO porcentajes de infiltración con CP entre el 10 y el 80%, en 5/32 de los pacientes un porcentaje de infiltración de 5%, en 2/32 pacientes un 3% y en 11/32 pacientes se encontró menos de 1% de infiltración.

TABLA 3.— Resultados de PCR. Pacientes con citometría de flujo negativa: grupo C y D. Comparación con infiltración de células plasmáticas en BMO

Grupo	N=16	BMO (% de CP)	PCR (Rea-B)	β-globina	Resultado
C	1	<1	+	+	Positivo
	2	<1	+	+	Positivo
	3	3	+	+	Positivo
	4	3	+	+	Positivo
	5	5	+	+	Positivo
	6	<1	+	+	Positivo
	7	<1	+	+	Positivo
	8	<1	-	+	Negativo
	9	<1	-	+	Negativo
	10	<1	-	+	Negativo
	11	<1	-	+	Negativo
	12	<1	-	+	Negativo
	13	5	-	-	No amplificable
	14	5	-	-	No amplificable
D	15	<1	+	+	Positivo
	16	<1	-	+	Negativo

<1=menos a 1%; ReaB: rearreglo de genes de cadenas pesadas de las Inmunoglobulinas;  
CP. Células plasmáticas

La inmunofenotipificación mediante la CF es ampliamente utilizada para la detección de MM y procesos linfoproliferativos porque posee ventajas como el análisis simultáneo multiparamétrico de grandes cantidades de células con varios anticuerpos, la cuantificación de las mismas y la rapidez de los resultados. El análisis del inmunofenotipo utilizando CD56 y anti-CD19 diferencia en el 65% de los casos las CP mielomatosas maduras que expresan CD19- y CD56+, de las CP normales que expresan CD19+ y CD56-<sup>10, 19, 20</sup>. En nuestro trabajo la CF mostró el inmunofenotipo clásico en 16/32 pacientes con GM en estudio, los cuales presentaban infiltraciones de CP en BMO entre el 5 y el 80% con una media de 32%. En los casos considerados como negativos la infiltración hallada fue menor al 5%. Todos los casos que fueron positivos para CF tenían una celularidad mayor o igual al 5% con una mediana del 20%, por lo tanto los datos sugieren que la capacidad de detección de este método depende estrechamente de la celularidad de la muestra. Según lo que se desprende de este trabajo, la CF podría ser un método de *screening* complementario para la detección de MM.

Swedin y col<sup>21</sup> utilizaron la identificación de Rea-B mediante PCR para detectar enfermedad residual mínima en pacientes con MM post trasplante de médula ósea. La detección de enfermedad residual por estos métodos ha sido también informada por otros au-

tores como factor pronóstico en niños con leucemia linfoblástica aguda<sup>22, 23</sup>, leucemia linfocítica crónica<sup>24</sup> y linfoma no Hodgkin-B<sup>25</sup>. Por otro lado, Brinckman<sup>26</sup> utilizó la misma técnica para el diagnóstico de linfomas-B de bajo grado, concluyendo que la PCR puede ser un método diagnóstico para verificar la sospecha de infiltración linfomatosa en casos no concluyentes por histopatología e inmunohistoquímica. Se utilizó también la técnica cuantitativa PCR "Real time"<sup>27</sup> para la detección de enfermedad mínima residual post trasplante medular, demostrando que el análisis cuantitativo de IgH es una nueva vía para evaluar la eficacia terapéutica y predecir pronóstico en pacientes con MM. Lacy y col.<sup>28</sup> compararon la expresión de interleuquina-1 beta (IL-1 beta) en MGUS y MM por hibridación *in situ*, detectando la expresión de IL-1 beta en más del 95% de los pacientes con MM y en menos del 25% de aquellos con MGUS, pudiendo determinar cómo la expresión aberrante en CP de la interleuquina podría ser predictiva del progreso eventual de MGUS a MM. Sibley y col.<sup>29</sup> encontraron la translocación t(4;14) mediante la técnica de RT-PCR en el 10% (7/67) de los pacientes con MM. Estos pacientes sobreexpresaban la proteína FGFR3 cuyo gen mapea en el brazo corto del cromosoma 4. Posiblemente la desregulación génica de este gen se deba al acercamiento de los promotores fuertes de las inmunoglobulinas de la región 14q32.

Todos estos antecedentes nos llevaron a estudiar a los pacientes no diagnosticados mediante las técnicas de rutina (histopatología y CF) mediante PCR (técnica disponible en nuestro laboratorio para el estudio de clonalidad en procesos linfoproliferativos B y T) con el objetivo de aumentar la sensibilidad de detección. El estudio de Rea-B en nuestro trabajo detectó clonalidad en 7/12 (59%) de los casos del grupo C, todos con infiltraciones de CP en BMO menor del 5% (4/7 con menos del 1%). En ningún caso se realizó cambio terapéutico post hallazgo. En un futuro, si la utilidad de esta determinación tiene alguna implicancia clínica, podría agregarse una segunda PCR para el FR2 para aumentar la sensibilidad de detección en un 7% adicional<sup>12</sup>.

Según la literatura, aproximadamente un 25% de los pacientes con MGUS pueden desarrollar MM, amiloidosis primaria, macroglobulinemia o trastornos linfoproliferativos durante un seguimiento de más de 20 años; entonces, la detección de una población clonal en pacientes con MGUS debiera estudiarse para saber si podría ser considerado un predictor de enfermedad, colocando a estos pacientes dentro de un estrato de riesgo.

En conclusión, el estudio de los rearrreglos de los genes de las cadenas pesadas de las IgH mediante técnicas de biología molecular incrementó la sensibilidad de detección de monoclonalidad. La identificación de una población clonal en pacientes con MGUS podría considerarse un factor predictor de enfermedad, pero serían necesarios estudios a largo plazo con un número mayor de casos para probar esta hipótesis.

**Agradecimientos:** A Valeria P. Melia, de la Unidad de Investigación Dr. Baron, por la traducción al inglés del resumen del trabajo. A Hugo Krupitzki por el asesoramiento estadístico.

## Bibliografía

- Grogan TM, Van Camp B, Kyle RA, Müller-Hermelink HK, Harris NL. Pathology and genetics of tumors of haemato-poietic and lymphoid tissues. In: Grogan TM, et al (eds). World Health Organization Classification of Tumors (WHO): Plasma cell neoplasm, Lyon: IARC Press, 2001, pp 142-56.
- Knowles DM. B-cell Immunoproliferative disorders, including multiple myeloma and amyloidosis. In: Knowles DM (eds). Neoplastic Hematopathology. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 1557-72.
- Creixentí J, Rozman C. Gammopatías monoclonales. En: Farreras P; Rozman C. Medicina interna. 13<sup>o</sup> ed. Madrid: Mosby-Doyma, 1995, pp 1753-60.
- Salmon SE, Cassady JR. Plasma cell neoplasm. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg S, (eds.) Cancer, Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1988, p 1854.
- Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, Alexanian R. Plasma cell myeloma-new biological insights and advances in therapy. *Blood* 1989; 73: 865-79.
- Kyle RA. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med* 1978; 64: 814-26.
- Kyle RA. "Benign" Monoclonal gammopathy- After 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 26-36.
- Regis-Bataille, Harousseau JL. Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 1997; 23: 1657-64.
- Wijdenes J, Clement C, Klein B, Dore JM. New B-cell CD antigens. BC29: CD138 (syndecan-1) workshop panel report. In: Kishimoto T, et al (eds). White cell differentiation antigens. 6<sup>th</sup> ed. London: Garland Publishing Inc, 1997, pp 149-52.
- Sahara N, Ihara M, Ono T, et al. Multiple myeloma expressing CD19<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> phenotype. *Am J Hematol* 2000; 64: 311-3.
- Sioutos N, Bagg A, Michaud G, et al. Polymerase chain reaction versus Southern Blot hybridization. *Diag Mol Pathol* 1995, 4: 8-13.
- Bagg A, Braziel RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *J Mol Diagn.* 2002; 4: 81-9.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
- Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica* 2001; 86: 837-43.
- Bayer-Garner I, Sanderson R, Dhodapkar M, Owens R, Wilson C. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: Shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol* 2001; 14: 1052-8.
- Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol* 1999; 104: 152-62.
- Sebstyten A, Berczi L; Mihalik R, Paku S, Malolosy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 1999; 104: 412-9.
- Costes V, Magen V, Legouffe E, et al. The MI15 monoclonal antibody (antisyndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Human Pathol* 1999; 30: 1405-11.
- Harada H, Kawano MM, Hung N, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993; 81: 2658-63.
- Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol* 1997; 97: 46-55.
- Swedin A, Lenhoff S, Olsson T, Thuresson B, Westin J. Clinical utility of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement identification for tumor cell detection in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; 103: 1145-51.
- Jacqy C, Delapaut B, van Daele S, et al. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997; 98: 140-6.
- Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, et al. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in

- children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 100: 235-44.
24. Provan D, Bartlett-Pandite L, Zwicky C, et al. Eradication of polymerase chain reaction detectable chronic lymphoblastic leukaemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88: 2228-35.
  25. Zwicky CS, Maddocks AB, Andersen N, Gribben JG. Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88: 3314-22.
  26. Brinckmann R, Kaufmann O, Reinartz B, Dietel M. Specificity of PCR-based analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements for the detection of bone marrow involvement by low-grade B-cell lymphomas. *J Pathol* 2000; 190: 55-60.
  27. Zhongguo Shi Yan. Real-time quantitative detecting minimal residual disease in multiple myeloma patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Xue Ye Xue Za Zhi* 2003; 11: 516-20.
  28. Lacy MQ, Donovan KA, Heimbach JK, Ahmann GJ, Lust JA. Comparison of interleukin-1 beta by in situ hybridization in monoclonal gammopathy of indeterminate significance and multiple myeloma. *Blood* 1999; 93: 300-5.
  29. Sibley K, Fenton J, Dring A, Ashcroft A, Rawstron A, Morgan G. A molecular study of the t(4;14) in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002; 118: 514-20.

-----

*Le plus ancien des traitements désinhibiteurs est utilisé depuis des temps immémoriaux: l'alcool. Contenu dans les vins, les hydromels, les bières de l'Antiquité, il tentait aussi de répondre à cette question toujours d'actualité: comment ajouter un peu de bonheur à la vie? Galien est sûr de sa réponse: "Le vin dissipe manifestement toute espèce de chagrin et l'abatement [ . . . ]. Le vin, bu modérément, produit les effets opposés à la mélancolie". L'éthanol est donc sans doute le plus ancien des sédatifs anxiolytiques. Il y a quelques décennies encore la potion cordiale et la potion de Todd étaient en usage courant dans les hôpitaux. La potion cordiale était composée par: vin rouge (125 g); sirop d'écorces d'oranges (30 g) et teinture de cannelle (8 g). (A prendre une cuillerée toutes les demies heures. Pour relever les forces épuisées après les maladies graves).*

El más antiguo de los tratamientos desinhibidores es empleado desde tiempos inmemoriales: el alcohol. Contenido en vinos, hidromieles, las cervezas de la Antigüedad, trataba de responder a esa cuestión, siempre de actualidad: ¿cómo agregar un poco de felicidad a la vida? Galeno está seguro de la respuesta: "El vino disipa manifestamente toda especie de tristeza y de abatimiento [ . . . ]. El vino, bebido con moderación produce efectos opuestos a la melancolía". El etanol es pues sin duda el más antiguo de los sedantes ansiolíticos. Hace algunas décadas la poción cordial y la poción de Todd eran de uso corriente en los hospitales. La poción cordial estaba compuesta por vino tinto (125 g); jarabe de corteza de naranja (30 g) y tintura de canela (8 g). (A tomar una cucharada cada media hora. Para recuperar las fuerzas agotadas después de enfermedades graves).

François Chast

*Histoire contemporaine des médicaments.* Paris: La Découverte/Poche, 2002, p 158