

Caracterización de la proteína amiloidogénica en un registro institucional de amiloidosis

Characterization of the amyloidogenic protein in an institutional registry of amyloidosis

Nucifora E¹, Aguirre MA², Sorroche P³, Saez MS³, Boietti BR², Rocca JA², Pérez de Arenaza D⁴, Antonietti C², García Rivello HJ⁵, Valeo Chulvi MP⁵, Petriglieri C², Giunta DH² y Posadas Martínez ML².

Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA), ¹Sección Hematología, ²Servicio de Clínica Médica, ³Laboratorio Central, ⁴Servicio de Cardiología, ⁵Servicio de Anatomía Patológica⁵.

elsa.nucifora@hospitalitaliano.org.ar

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN ORAL EN EL MARCO DEL
XXIII CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA.

Fecha recepción: 22/06/2018
Fecha aprobación: 24/08/2016



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 nº 2: 144-150
Mayo - Agosto 2018

Palabras claves: amiloidosis,
proteína amiloidogénica,
AL,
TTR,
AA.

Keywords: amyloidosis,
amyloidogenic protein,
AL,
TTR,
AA.

Resumen

El diagnóstico de amiloidosis (A) se confirma evidenciando el depósito de amiloide con la tinción rojo Cojo en la biopsia del órgano afectado. La identificación de la proteína amiloide (PA) es necesaria para orientar el tratamiento. En Argentina no contamos con técnicas como la espectrometría de masa (EM) o inmunomicroscopía electrónica (ME) a nivel asistencial, por lo que diseñamos una sistemática para arribar al diagnóstico.

Diseño : cohorte ambispectiva de pacientes consecutivos con diagnóstico de A realizado por biopsia del Registro Institucional de Amiloidosis del Hospital

Italiano de Buenos Aires (RIA), 01/04/2012-7/2017. La evaluación constó de determinación de cadenas livianas libres kappa y lambda en suero, la detección de la clonalidad de plasmocitos en médula ósea, secuenciación del gen de la TTR, inmunohistoquímica para proteína AA, centellograma óseo con pirofosfato junto con la historia clínica.

Resultados: Se incluyeron 181 pacientes con A: el 37% (67) AL, 16% (29) A Senil, 10% (19) AA, 4,4 % (8) TTR mutada, 22,6% (41) A localizada y en el 9% (17) no se pudo identificar la proteína responsable. El 37% (67) cumplieron criterios de AL, el 42%

tuvieron banda monoclonal detectable correspondiente a los isotipos L-lambda un 44 %, IgG-lambda un 28%, IgG-kappa un 10%, L-kappa un 6% y otros isotipos un 12%. Se detectó compromiso renal en un 73% (49) y cardíaco en un 66% (44). El diagnóstico diferencial con A Senil a nivel cardíaco se hizo con centellograma con PYP (negativo en AL). En la A senil, el 16% (29) la variante natural (wild type). El compromiso cardíaco fue del 100% (29) e incluye biomarcadores: ProBNP o BNP 100% (29/29) e imágenes compatibles en el ecocardiograma 85% (23/27) o en la resonancia nuclear magnética 88%(24/27) y centellograma cardíaco con PYP positivo. Las mutaciones detectadas en la A hereditaria TTR

fueron: 4 Val30Met (polineuropatía hereditaria familiar, clásica y de comienzo tardío), 2 Thr60Ala (amiloidosis cardíaca), 1 Ala36Pro (polineuropatía), 1 Tyr114Cys (amiloidosis vítrea).

De los casos de AA el 100% (19) arrojó resultados positivos en la inmunohistoquímica, de ellos un 80% (15) tuvo compromiso renal, 26% (5) digestivo, 21% (4) cardíaco y el dosaje de sAA resultó útil para seguimiento.

Conclusión: la caracterización de la PA involucrada en la enfermedad es importante porque determina tratamiento y pronóstico. El diseño de una sistemática de detección nos ha permitido con las herramientas disponibles determinar la PA involucrada.

Summary

The diagnosis of amyloidosis (A) is confirmed by the deposit of amyloid with the Congo red stain in the biopsy of the organ that is suspected to be affected. The identification of the amyloid protein (PA) is necessary to guide the treatment. In Argentina we do not have techniques such as mass spectrometry (EM) or electron microscopy (EM) with immunohistochemistry, so we designed a systematic to arrive at the diagnosis.

Design: ambispective cohort of consecutive patients with diagnosis of A by biopsy of the Institutional Registry of Amyloidosis of the Hospital Italiano de Buenos Aires (RIA), 01/04 / 2012-7 / 2017. The evaluation consisted of: free light chains in serum and urine, the detection of clonality of plasma cells in bone marrow, measurement of SAA, and sequencing of the TTR gene.

Results: A total of 181 patients with A were included: 37% (67) AL, 16% (29) A Senile, 10% (19) AA, 4.4% (8) TTR mutated, 22.6% (41) A localized and in 9% (17) the responsible protein could not be identified. The 37% (67) met criteria for AL, 42% had a detectable monoclonal band corresponding to the isotypes L-lambda 44%, IgG-lambda 28 %, IgG-kappa 10%, L-kappa 6% and other isotypes 12%. Renal involvement was detected in 73% (49)

and cardiac involvement in 66% (44). The differential diagnosis with A senil at the cardiac level was made with a PYP scintigraphy (negative in AL). In the A senil, 16% (29) presented TTR wild type. The cardiac commitment was 100% (29) and included biomarkers: ProBNP or BNP 100% (29/29) and compatible images in the echocardiogram 85% (23/27) and magnetic resonance 88% (24/27) . Cardiac scan with positive PYP.

The mutations detected in the hereditary TTR A were: 4 Val30Met (familial hereditary polyneuropathy, classic and late onset), 2 Thr60Ala (cardiac amyloidosis), 1 Ala36Pro (polyneuropathy), 1 Tyr114Cys (vitreous amyloidosis).

Of the cases of AA, 10% (19) yielded positive results in immunohistochemistry, of which 80% (15) had renal compromise, 26% (5) digestive, 21% (4) cardiac, and the dose of SAA was useful for follow up.

Conclusion: the characterization of the protein involved in the disease is important because it determines treatment and prognosis. The lack of the tools that allow this detection in the clinical laboratory led us to elaborate a detection system that allowed us to determine the involved protein with the available tools.

Introducción

La amiloidosis (A) es una enfermedad rara, subdiagnosticada en la que poco se piensa. La A debe ser confirmada por el patólogo mediante la clásica

tinción de rojo Congo cuya realización es compleja y depende de que la técnica implementada sea correcta⁽¹⁾. Para mejorar sus resultados, el corte debe

ser relativamente grueso (6 micrones) y siempre se debe trabajar con un testigo. De no hallarlo el patólogo sólo se puede informar que “en el material estudiado no se ha hallado tejido rojo Congo positivo, sin descartar A”. Si la sospecha es muy fuerte, es preferible repetir la biopsia. Puede optarse por la grasa de la pared abdominal, la mucosa yugal o el órgano comprometido, teniendo en cuenta que esa elección conlleva, ya sea hígado, riñón o corazón, mayores riesgos, sobre todo de sangrado.

El hallazgo de A en la biopsia no es suficiente, se requiere identificar el tipo específico de sustancia amiloidea depositada. La proteína involucrada es la que permite nombrar al tipo de A, asignar el tratamiento correspondiente y estimar el pronóstico de la patología⁽²⁾.

Para la identificación de la PA existen técnicas altamente específicas como la espectrometría de masa y la inmunohistoquímica con microscopía electrónica usadas en otros países. Sin embargo, en Argentina no contamos con estos sofisticados recursos a nivel asistencial.

Frente a esta situación, intentamos definir una sistemática de estudio que nos permita la identificación proteica en la mayoría de los pacientes, siendo el objetivo de este trabajo contar esta experiencia en un registro insitucional de amiloidosis.

Materiales y métodos

Diseño

Se estudió una cohorte ambispectiva clínica, con todos los pacientes (ptes) consecutivos con A (biopsia) del Registro Institucional de Amiloidosis del Hospital Italiano de Buenos Aires (RIA), desde el 01/04/2012 al 7/2017.

El RIA está registrado en ClinicalTrials.gov (NCT01347047) y aprobado por el Comité de Ética local.

Pacientes

Se incluyeron todos los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, mayores de 18 años, independientemente de su prestador de salud.

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores a 18 años
- Amiloidosis confirmada por anatomía patológica

Criterios de exclusión

- Negativa a participar del estudio o del proceso de consentimiento informado por parte del paciente o representante legal, o negativa a consentir la participación en el estudio en el caso de menores de edad.

Mediciones

Se recolectaron los datos de manera estandarizada con un formulario diseñado a tal fin, los datos fueron recolectados por estudiantes de medicina entrenados y chequeados por un médico del plantel. Frente a la sospecha de A se revisó la historia clínica electrónica (HCE) y luego de ser incluido prospectivamente se prosiguió con la solicitud de los estudios complementarios correspondientes. La misma incluyó para todos los participantes: proteinograma electroforético, inmunofijación de proteínas plasmáticas y urinarias, dosaje de inmunoglobulinas, cuantificación de cadenas livianas libres en suero kappa y lambda y la relación entre las mismas, clonalidad de plasmocitos en médula ósea, biomarcadores cardíacos e imágenes (electrocardiograma, ecocardiograma Doppler color, resonancia nuclear magnética con contraste con gadolinio), centellograma cardíaco con PYP (centellograma óseo con pirofosfato de tecnecio), creatinina, urea, uricemia, proteinuria, hepatograma e inmunohistoquímica en tejido para afirmar o negar AA.

La secuenciación del gen de TTR se realizó frente a clínica o historia familiar compatible.

En la **tabla 1** se muestran los estudios diagnósticos disponibles a nivel asistencial para A y caracterización de la proteína.

En la **tabla 2** se muestra pesquisa y seguimiento del órgano afectado.

Muestreo y análisis estadístico

Muestreo consecutivo de todos los pacientes que cumplieron con los criterios de selección.

Se describieron las variables continuas como media y desvío estándar. Se describen las variables categóricas como frecuencia absoluta y porcentaje. Se utilizó el programa Stata versión 11.

Financiación

Los costos del Registro de Amiloidosis son financiados por el Servicio de Clínica Médica y Hematología del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Tabla 1. Estudios diagnósticos disponibles a nivel asistencial para amiloidosis y caracterización de la proteína.

	Diagnóstico	Seguimiento
Amiloidosis	<ul style="list-style-type: none"> Sospecha clínica Biopsia de tejido (órgano afectado u otro) Tinción rojo Congo positivo 	<ul style="list-style-type: none"> Biopsia de otros órganos afectados
AA	<ul style="list-style-type: none"> Inmunohistoquímica en tejido para AA Pesquisa de órgano afectado 	<ul style="list-style-type: none"> SAA Pesquisa y seguimiento de órgano afectado
AL	<ul style="list-style-type: none"> Proteinograma electroforético Inmunofijación de proteínas plasmáticas y urinarias Dosaje de inmunoglobulinas Cadenas livianas libres en suero kappa y lambda Clonalidad de plasmocitos en médula ósea, Seguimiento con cadenas livianas libres y marcadores según órgano afectado Pesquisa de órgano afectado 	<ul style="list-style-type: none"> Cadenas livianas libres Pesquisa y seguimiento de órgano afectado
TTR hereditaria	<ul style="list-style-type: none"> Historia familiar Secuenciación del gen de TTR Pesquisa de órgano afectado 	<ul style="list-style-type: none"> Pesquisa y seguimiento de órgano afectado
Senil	<ul style="list-style-type: none"> Centellograma cardíaco con PYP (descarta AL) Secuenciación del gen de TTR 	<ul style="list-style-type: none"> Pesquisa y seguimiento de órgano afectado

Tabla 2. Pesquisa y seguimiento de órgano afectado.

Órgano afectado	Estudio complementario
Corazón	Biomarcadores cardíacos (pro BNP, troponina) e imágenes (electrocardiograma, ecocardiograma Doppler color con esfuerzo, resonancia nuclear magnética con contraste con gadolinio y cuantificación con mapeo T1) Centellograma cardíaco con PYP (centellograma óseo con pirofosfato de tecnecio)
Riñón	Creatinina, urea, uricemia, proteinuria, microalbuminuria
Hígado	Hepatograma, FAL
Digestivo	Biopsia
Neurológico	Electromiograma

Resultados

El Registro incluyó 181 pacientes con A, el 40% (73) de sexo femenino, media de edad de 62 años (DS 16). Las A más encontradas por orden de frecuencia fueron: senil (TTR no mutada, variante neutral), AL, AA, TTR mutada y A localizada 41 (23%) en general cutánea. En el 9% (17 pts) no se pudo identificar la proteína responsable.

A Senil

EL 15 % (29) presentó TTR no mutada y al diagnóstico tenían compromiso cardíaco 100%. Predominio

masculino. . El compromiso cardíaco se estableció por biomarcadores: ProBNP o BNP 100% (29/29) y Troponinas 28% (8/29); e imágenes: ecocardiograma 85% (23/27) y resonancia nuclear magnética 88% (24/27). Centellograma cardíaco con PYP positivo.

AL

EL 37% (67) cumplieron criterios diagnósticos de amiloidosis AL. Sólo 25 pacientes (42%) presentaron banda monoclonal en el proteinograma, y apenas 6 de ellos (10% del total) tenían una concentración

mayor a 1,5 g/dl (diferencia con los mielomas, que pueden tener bandas monoclonales de mayor cuantía). La distribución por isotipo de los componentes monoclonales fue: L-lambda, 44 %; IgG-lambda, 28%; IgG-kappa, 10%; L-kappa, 6%; y otros isotipos, 12%. Al diagnóstico presentaban compromiso renal el 73% (49) y cardíaco 66% (44).

El compromiso cardíaco se estableció por biomarcadores: ProBNP o BNP 90% (40/44) y troponinas 28% (8/29); e imágenes: ecocardiograma 86% (38/44) y resonancia nuclear magnética 90% (40/44). El diagnóstico diferencial con A senil a nivel cardíaco se hizo con centellograma con PYP (negativo en AL). El compromiso renal se estableció por insuficiencia renal en el 100% (49/49, creatinina >1.3 mg/dl) y/o estudios proteicos de orina en el 94% (46/49, proteinuria glomerular).

AA

EL 100 % (19) presentó AA demostrada en tejido por inmunohistoquímica. Al diagnóstico presentaban compromiso renal el 80% (15), digestivo 26% (5), cardíaco 21% (4).

El dosaje de sAA es útil sólo para seguimiento.

TTR mutada

Se estudiaron sólo los pacientes con historia familiar compatible y/o con muerte temprana de causa cardíaca y los que presentaron neuropatía periférica y/o cardiomiopatía. Se investigó TTR mutada por secuenciación completa del gen si era el propósito y del exón implicado si era familiar de un caso conocido. En el 5 % (8) de los ptes se confirmó TTR mutada. Aún encontrada la mutación estos pacientes debieron tener biopsia positiva para A. Las mutaciones más frecuentes fueron: Val30Met (polineuropatía hereditaria familiar, clásica y de comienzo tardío), Thr60Ala (amiloidosis cardíaca), Ala36Pro (polineuropatía), Tyr114Cys (amiloidosis vítrea).

Discusión

Con el avance y difusión del conocimiento de la A, el número de pacientes afectados es mayor del supuesto, en particular, la A por TTR (incluyendo variante natural y mutada) demuestra una mayor incidencia respecto al total de casos confirmados.

Hasta hace poco tiempo primaba el diagnóstico tardío, cuando el paciente consultaba por insuficiencia cardíaca o renal terminal o hepatomegalias masivas.

Gracias al advenimiento de nuevos métodos diagnósticos no cruentos, como técnicas de imágenes accesibles, hoy es posible identificar el compromiso del miocardio precozmente. Los biomarcadores, troponinas y particularmente ProBNP, son altamente sensibles aunque inespecíficos. Un ProBNP normal aleja la posibilidad de infiltración miocárdica. Si es alto, se deben efectuar electrocardiograma y ecocardiograma Doppler (de ser posible con medición de deformación longitudinal global -esfuerzo-): la asociación de ambos aumenta su rendimiento diagnóstico. Si bien las imágenes de medición de deformación longitudinal global son patognomónicas de la infiltración amiloide, es la resonancia nuclear magnética la técnica que confirma el diagnóstico. Actualmente se prefiere agregar el mapeo T1, para poder ser más claros en las características infiltrativas. Sólo excepcionalmente resulta imprescindible realizar una biopsia endomiocárdica⁽³⁻⁴⁾.

Todos estos estudios, tanto invasivos como no invasivos, permiten el diagnóstico de A pero no ayudan a su clasificación. La única excepción es el centellograma con PYP (el mismo que se usa para hacer evaluación ósea) con capacidad de dar certeza diagnóstica en casos de A TTR. Por lo tanto, centellograma con PYP positivo caracteriza una A por TTR. Existe evidencia de que la A TTR es sistémica, no exclusivamente cardíaca, ya que en un alto porcentaje de pacientes se constata el antecedente de síndrome de túnel carpiano. El mismo no es exclusivo de A TTR, puede observarse en otras A, en particular en la AL y resultaría fundamental estimular el estudio del material quirúrgico obtenido de la biopsia del túnel carpiano para obtener un diagnóstico temprano.

Si bien hasta el día de la fecha el tratamiento farmacológico para esta patología no se emplea de rutina, se han encontrado drogas que, se presume, son eficientes, no sólo para detener la progresión de la enfermedad sino, además, para lograr que la infiltración retrograde. Todos los nuevos fármacos tienen como objetivo interferir con la monomerización del tetrámero de TTR impidiendo así su depósito en los tejidos o inhibir directamente la síntesis de TTR.

Como el nuestro no es un país endémico en relación a A hereditaria, desconocemos el perfil de TTR y estamos obligados a realizar más estudios y a secuenciar el gen en forma completa. En caso de conocer la mutación en un grupo familiar podría emplearse

la técnica de PCR para determinar su presencia. La V30M es la mutación más frecuente en Portugal y Brasil. En Argentina los pacientes presentan la forma tardía que involucra al corazón. Su diagnóstico específico es trascendente, pues el tratamiento entre A TTR variante natural, TTR mutada y AL es totalmente distinto.

El diagnóstico de AA es más sencillo, pues la inmunohistoquímica en la biopsia es contundente. Hay una mayor afectación renal pero cualquier órgano, incluyendo el corazón, puede verse afectado⁽⁵⁾. Es posible medir la sAA circulante, es decir la cantidad de proteína AA en el suero. Este dato es fundamental para evaluar la evolución y la respuesta al tratamiento, pero no es útil para el diagnóstico.

La enfermedad inflamatoria o infecciosa responsable de la A AA se encuentra en un 50% de los casos. A las infecciones crónicas clásicas se agregan, ahora, los cuadros de inmunodeficiencias, las enfermedades reumatológicas e incluso algunos síndromes linfoproliferativos crónicos.

Para el diagnóstico de AL deben cumplirse varios requisitos, ya que la inmunohistoquímica no es confiable⁽⁶⁾. Se pide demostrar plasmocitos clonales en médula ósea (independiente del número), alteración de la relación kappa / lambda en suero. El proteino-grama electroforético normal no descarta una alteración clonal (sólo el 40 % de nuestros pacientes tuvo banda monoclonal). El centellograma cardíaco con PYP negativo es requisito (se sabe que en algunas circunstancias con marcada infiltración puede ser positivo en AL, pero no es lo habitual). Y la inmunohistoquímica para AA en la biopsia debe ser negativa. En caso de compromiso cardíaco el pronóstico es grave: frente a insuficiencia cardíaca congestiva G III o IV la expectativa de vida no va más allá de 6 meses. En estos casos el ProBNP es muy alto y su medida es otro factor pronóstico. En estos casos el tratamiento es una emergencia⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Han quedado pacientes cuya A no pudo ser identificada. Puede atribuirse a deficiencias técnicas o a que se hubiera tratado de una proteína para la que no tenemos patente de identificación. Contar con un espectrómetro de masa sería una buena aproximación a un diagnóstico más confiable y carente de falsos negativos.

Los grupos de investigación que poseen series que incluyen numerosos pacientes han descrito la intervención de más de una proteína depositada en un

órgano (corazón) y siguen identificando nuevas mutaciones de proteínas conocidas o inclusive, nuevas proteínas.

Conclusión

El diagnóstico de A en nuestro medio es un tanto complejo y requiere el cumplimiento de una sistemática no siempre al alcance del profesional. Es fundamental el alto índice de sospecha y la implementación en forma temprana de las técnicas disponibles como, por ejemplo, el centellograma con PYP que permite la caracterización de la A TTR, o el ProBNP que identifica con alta sensibilidad el compromiso cardíaco.

Consideramos que es imprescindible formar grupos de trabajo que se apoyen en el intercambio de tecnología, porque aunque es mucho más frecuente de lo que se pensó hasta ahora, la A sigue siendo una enfermedad rara.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

Bibliografía

1. Maria M. Picken, Guillermo A. Herrera, Ahmet Dogan, Amyloid and Related Disorders: Surgical Pathology and Clinical Correlations, 2015; 2nd Edition, Humana Press.
2. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JM y col. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification. *Amyloid*. 2016; 23(4): 209–213.
3. Arbustini E, Merlini G. Early identification of transthyretin-related hereditary cardiac amyloidosis. *JACC: Cardiovasc Imaging*. 2014; 7(5):511-4.
4. Gonzalez-Lopez E, Gallego-Delgado M, Guzzo-Merello G y col. Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. *Eu Heart J*. 2016; 36(38):2585-94.

5. Erdogmus S, Kendi Celebi Z, Akturk S y col. Profile of renal AA amyloidosis in older and younger individuals: a single-centre experience. *Amyloid*. 2018; 18:1-5.
6. Fernandez de Larrea C, Verga L, Morbini P y col. A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidoses. *Blood*. 2015; 125(14):2239-44.
7. Miyazaki K, Kawai S, Suzuki K. Abdominal subcutaneous fat pad aspiration and bone marrow examination for the diagnosis of AL amyloidosis: the reliability of immunohistochemistry. *Int J Hematol*. 2015; 102:289–295.
8. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2013 update on diagnosis, prognosis and treatment. *Am J Hematol*. 2013; 88(5):416-25.
9. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2014 update on diagnosis, prognosis and treatment. *Am J Hematol*. 2014; 89(12):1132-40.
10. Molle P, Merlini G. Free light chain testing for the diagnosis, monitoring and prognostication of AL amyloidosis. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54(6): 921-7.
11. Muchtar E, Buadi FK, Dispenzieri A y col. Immunoglobulin Light-Chain Amyloidosis: From Basics to New Developments in Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Acta Hematol*. 2016; 1128(2):159-168.
12. Palladini G, Merlini G. What is new in diagnosis and management of light chain amyloidosis? *Blood*. 2016; 128(4):159-68.