

NOTE DE CURS

Crioglobulinele - semnificație clinică și determinare de laborator

Cryoglobulins – clinical importance and laboratory assesment

Ileana Funduc

Rezumat

Crioglobulinele sunt proteine sau complexe de proteine care precipită reversibil la temperaturi scăzute. Clasificarea lor cuprinde crioglobulinele monoclonale, mixte monoclonale –policlonale și mixte policlonale. Mecanismul crioprecipitării rămâne încă obscur, iar incidența crioglobulinemiei mixte la pacienții cu HCV cronică nu este încă total demonstrată. Totuși, crioglobulinemia mixtă ar putea reprezenta o punte de legătură între o tulburare autoimună clasică și malignitate. Pentru a realiza o caracterizare adecvată, crioglobulinele sunt răcite sub temperatura normală a corpului, se fac spălări repetate pentru a îndepărta proteinele serice aderente nespecifice și alte elemente sanguine; după această etapă, crioglobulinele se resolubilizează prin încălzire la 37°C și apoi se analizează.

Deoarece testarea crioglobulinelor până în prezent nu este standardizată, evaluările seriate nu pot fi un ghid al evoluției bolii sau a eficacității terapiei, până în prezent existând doar o corelație săracă între parametrii de laborator și prezența crioglobulinemiei. Valorile crioglobulinelor serice nu se coreleză totdeauna cu prognoza și severitatea bolii, ele trag doar un semnal asupra prezenței acestor proteine încă incomplet cunoscute.

Abstract

Cryoglobulins are proteins or protein complexes that undergo reversible precipitaton at low temperatures. Their classification includes monoclonal, mixed monoclonal-polyclonal and mixed polyclonal cryoglobulins. The mechanism of cryoprecipitation remains still unanswered and the incidence of mixed cryoglobulinemia in patients with chronic HCV infection has only little evidence. However, mixed cryoglobulinemia could represent a crossroad between a classic autoimmune disorder and malignancy.

In order to realise an adequate characterisation, cryoglobulins are cooled below core body temperature, than repeatedly washed to remove nonspecifically adherent serum proteins and other blood elements. After such a process the cryoglobulins are resolubled by warming to 37°C and only then analyzed. Because the testing for cryoglobulins is not standardized until this moment, serial evaluation cannot be a guide for disease evolution or for the efficacy of therapy; it only remains a sign of the presence of these proteins, which are still not well known.

Crioglobulinele sunt proteine sau complexe de proteine ce precipită reversibil la temperaturi scăzute.

Clasificare

Crioglobulinele se clasifică în unul din cele 3 tipuri emise de către BROUET încă în 1974: primul, reprezentat de crioglobuline simple monoclonale, al doilea și al treilea cuprinzând crioglobuline mixte monoclonale cu policlonale și respectiv exclusiv policlonale, în care de obicei IgM are activitate de factor reumatoid.

În ultima vreme s-a extins această clasificare prin introducerea unui nou tip II-III sau II special, ce cuprinde crioglobuline mixte cu microheterogenitate. În acest tip se includ crioglobuline cu o structură imunochimică diferită de a celorlalte tipuri, fiind format din IgM oligoclonal și urme de IgG policlonal.

Imunoglobulinele secretate de plasmocitele clonelor de celulă B ca răspuns la diversele stimulări antigenice sunt caracterizate prin heterogenitate. În condiții patologice, când sunt afectate mecanismele de apărare imună, are loc o disfuncție a celulei B, o restricție a heterogenității sintetizării imunoglobulinelor, care se manifestă fie prin aspectul monoclonal, fie prin cel oligoclonal de multi-benzi - cel puțin două - ce implică una sau mai multe clase de imunoglobuline.

Microheterogenitatea IgM s-a considerat a fi un rezultat al unei posibile tranziții de la tipul III cu imunoglobuline exclusiv policlonale la cel oligoclonal (tipul II-III) și apoi la cel monoclonal (tipul II). Această transformare reflectă un spectru al continuității biologice asupra părții clonelor de celulă B prin care expansiunea în răspunsul la un stimul antigenic conduce la prevalența unei clone față de altele.

Mecanismul crioprecipitării

Ipotezele recente asupra mecanismului crioprecipitării explicate pe baza biologiei moleculare nu s-au putut total dovedi, așa încât această problemă a rămas încă obscură. Aceasta se datorează caracteristicilor intrinseci ale componentilor individuali mono- sau policlonali individuali

și/sau interacției lor.

Între crioimunoglobuline și imunoglobuline ce nu precipită la rece nu există diferențe. Totuși, între acestea s-au semnalat niște particularități.

Pentru tipul I de crioglobuline:

- Șobolanii induși cu un sindrom asemenea lupusului și cu IgG3 (care se pare că are un rol criogenic crescut, căci se asamblează cu el însăși prin interacții spontane Fc-Fc) au prezentat reziduurile 6 și 23 din V_H cu surplus de pozitivitate față de proteinele care nu crioprecipită.
- Crioprecipitabilitatea este inhibată de către anticorpi antiidiotipici și antigene ce implică ulterior regiunea variabilă și locul de combinare a antigenului în procesul de crioprecipitare.
- La unele proteine ce crioprecipită s-a observat descreșterea conținutului de tirozină sau descreșterea accesibilității reziduurilor de tirozină și/sau creșterea celui de triptofan.
- Crioprecipitabilitatea s-ar datora unor anomalii ale interacției apă-proteină (supraabundență de reziduuri hidrofobice) sau a unor trăsături unice ale structurii terțiare.
- Crioimunoglobulinele prezintă un număr redus de reziduuri de acid sialic; mai mult, îndepărtarea glucidelor rămase în crioimunoglobulină face să crească temperatura de solubilizare a sa. Ficatul răspunde de îndepărtarea glicoproteinelor desialilate din circulație, incluzând și crioimunoglobulinele, prin receptori specifici hepatocelulari pentru astfel de proteine. De altfel, se știe că nivele crescute de crioglobuline sunt asociate cu bolile hepatice.

Interacțiile intermoleculare ce rezultă în urma formării unui crioprecipitat sunt slabe și depind de condițiile experimentale ca temperatura, pH, putere ionică. Concentrația este un determinant al crioprecipitabilității, creșterea ei determină o creștere a temperaturii de crioprecipitare. Prezența altor proteine serice ajută la solubilizarea crioglobulinelor.

Tipului II de crioglobuline i se aplică multe din trăsăturile anterioare. Ele au proprietăți tipice de complexe imune, sunt mult mai mari ca volum.

- Crioprecipitarea apare numai când proteinei monoclonale, de obicei IgM, i se permite să reacționeze cu o imunoglobulină normală, de obicei IgG.
- IgM ce fac parte din crioglobulinele mixte diferă de factorii reumatoizi clasici:
 - nu reacționează cu fragmentele Fc;
 - are reactivitate preferențială pentru fragmentele F(ab)₂.
- În complexe imune de tip II pot apare antigene ca: HCV, HBV, HAV, virusul Epstein Baar, complexe polinucleotide și anticorpi ca: anticorpi anti-ADN, anticorpi față de fibrinogen, limfocite, α -fetoproteină, mușchii netezi, agenți infecțioși incluzând Coxiella burnetti.
- Crioglobulinele mixte reacționează cu componenții complementului și, pentru unele, crioprecipitarea depinde de prezența C1q, ca în LES. Crioglobulinele mixte activează complementul *in vitro*, ca și cum încorporarea complementului în complexe imune, cum sunt crioglobulinele mixte ar influența semnificativ proprietățile lor de solubilitate și ar crește ulterior potențialul lor de lezare tisulară. Nivelele de complement seric în crioglobulinemia mixtă scad în cazul C1q, C4 și C2, sunt normale pentru C3 și normale sau chiar crescute pentru C5, C9. Lipsa activării C3 se pare că ar fi rezultatul descreșterii sintezei și creșterii catabolismului în cazul C1 și C4, sau, după alți autori, s-ar datora mecanismului regulator care controlează convertiza C3 a căii clasice a complementului.
- În tipul II, defectele clearance-lui de complexe imune favorizează acumularea lor în circulație și depunerea în țesuturi (piele, rinichi, plămâni). Acestea conduc la descreșterea abilității complexelor de crioglobuline să fixeze complementul și la fagocitarea lor

prin mecanismele mediate de Fc.

Asocierea crioglobulinemiei cu alte boli

În ultimii ani, datorită frecvenței hepatitei cronice concomitent cu crioglobulinemia mixtă, s-a sugerat faptul că virusurile hepatotrope ar avea un rol în patogenia bolii. HBV este un factor cauzal al crioglobulinemiei mixte în mai puțin de 5% din indivizi. Nu același lucru însă se întâmplă cu HCV, care se pare că joacă un rol important în patogenia crioglobulinemiei mixte. În ultimii 10 ani s-au semnalat 80% crioglobulinemii mixte tip II asociate cu HCV, comparativ cu 14-26% cu 30 ani în urmă. Legat de aceasta se presupune că stimularea cronică cu HCV a celulelor B duce la mutații somatice ce generează molecule de factor reumatoid de înaltă afinitate, a căror producție are loc sub un control inadecvat. De aceea s-a explorat originea virală a crioglobulinelor, respectiv mecanismul legat de virus al limfoproliferării la bolnavii cu crioglobulinemie, legând infecția virală și autoimunitatea de tulburările limfoproliferative benigne și maligne.

Asocierea între HCV și unele tulburări imunologice este o coincidență sau între ele există o legătură patogenică reală ?

Crioglobulinele mixte sunt cauza sau efectul bolii hepatice ?

Complexele imune din crioglobulinele mixte se pot altera prin activarea celulelor Kupffer; invers, alterarea celulelor Kupffer poate cauza un clearance al complexelor imune sau a crioglobulinelor mixte existente în bolile virale cronice, deci apar modificări imunologice induse de disfuncția hepatică.

Asocierea crioglobulinemiei cu HCV prezintă dovezi etiologice :

- HCVRN din crioprecipitat este de 10 – 1000 ori mai mare ca în supernatant;
- IgG legat de IgM - factor reumatoid este direcționat față de proteina HCV;
- Prezența proteinelor virale în țesuturile lezate.

Detectarea HCV asociat cu crioglobu-

linemie mixtă nu trebuie efectuată cu anticorpi, deoarece în acest fel nu se poate diferenția infecția activă de cea pasivă și mai mult, anticorpii față de HCV poate precipita cu crioglobulinele și poate fi mascat. Determinarea HCV din țesut (ficat) trebuie efectuată sub formă de HCV - ARN prin hibridizare *in situ* sau PCR *in situ*.

HCV-ARN nu se asociază cu severitatea biopsiei hepatice, ceea ce sugerează o cale patogenă extrahepatică a HCV pentru producerea excesivă de crioglobuline. Cum HCV poate răspunde de diverse tulburări hepatice sau extrahepatice mediate imun, crioglobulinemia mixtă poate reprezenta o punte între o tulburare autoimună clasică (hepatita autoimună, glomerulonefrită, tiroidită etc.) și malignitate (limfom de celulă B, carcinom hepatocelular). Este însă greu de demonstrat dacă asocierea HCV cu unele tulburări imunologice este o coincidență sau o legătură patogenă reală. Virusul hepatitei C înrudit cu limfoproliferare variind de la expansiunea celulei B benignă poli- la oligoclonal, frecvent observată în crioglobulinemia mixtă, către limfomul malign, este un proces multifactorial cu multe etape, la care multiple devieri genetice sunt necesare. Deoarece recent s-a arătat existența unei relații de importanță potențială între HCV, crioglobuline și limfom non Hodgkin de grad inferior, se sugerează extinderea determinărilor de crioglobuline în bolile limfoproliferative.

Există însă teorii și în sens contrar asocierii hepatitei C cu crioglobulinemiile. Acestea susțin că prezența HCV împiedică oarecum producerea crioglobulinelor, deoarece complexe de crioglobuline conțin deseori material genetic HCV și Ac anti-HCV.

Diagnosticul de laborator

Crioprecipitatul preparat cu grijă, ținând cont de jocul de temperatură 4 – 37°C, care trebuie respectat cu strictețe cât și de puritatea maximă în ceea ce privește eliminarea oricăror alte elemente sanguine sau proteine aderente, este evaluat prin una din modalitățile cunoscute (criocrit,

diferența proteinelor totale sau a imunoglobulinelor din serul total și supernatant, spectrofotometric la 280 nm). Apoi se continuă cu analiza calitativă, mult mai eficientă decât cea cantitativă, ultima neputând să facă diferențierea dintre mono- sau policlonalitate și chiar să eroneze valorile imunoglobulinelor și ale altor parametri din cauza formei coloidale sub care se prezintă crioglobulinele. Mai mult, în cazul unor crioglobuline, peste o treime din proteine nu sunt imunoglobuline și, pe de altă parte, un procent semnificativ de crioglobuline nu se mai poate dizolva la repetatele încălziri și apoi crioprecipitări.

Metodele clasice de determinare calitativă, în afară de imunofixare, este recomandabil de a fi completate cu: immunoblotting combinat cu imunofixare (separare pe poli-acrilamidă și detectarea imunoglobulinelor cu As de imunoglobuline conținând determinanți de lanțuri ușoare și grele), electroforeză bidimensională cu focalizare izoelectrică sau electroforeză capilară prin subtracție, când se determină curba de γ -globuline înainte și după crioprecipitare.

În contextul multitudinii factorilor ce se corelează cu crioglobulinemia, pe lângă metodologia obligatorie descrisă există și o serie de determinări opționale:

- Vâscozitatea serică a crioprecipitatului la 37°C, temperatura camerei și 4°C, pentru a arăta variațiile ce ar reflecta modificările în reologia sanguină a microcirculației.
- Frațiunile de complement
- Activitatea de factor reumatoid.

Rezultatul final obținut în urma acestei analize complexe permite includerea crioglobulinelor studiate într-unul din tipurile în care acestea se clasifică.

La testarea serului conținând crioglobuline există și capcane:

- Dacă separarea electroforetică de rutină nu se face la temperatura adecvată, proteina monoclonală poate fi omisă și valorile imunoglobulinelor aparent scăzute.
- Cuantificarea nefelometrică a imunoglobulinelor monoclonale poate să nu fie reală, de-

oarece aparatele nu sunt standardizate în raport cu acestea, iar crioprecipitatul, fiind în formă coloidală, afectează măsurătorile prin difracție ale imunoglobulinelor, complementului sau a activității factorului reumatoid.

- Crioglobulinele pot precipita la start în cazul separării electroforetice la rece, creând iluzia unui *peak* monoclonal.

Concluzii

Testarea de laborator a crioglobulinelor nu este standardizată și, în consecință, evaluările seriale nu se pot utiliza ca ghid al activității bolii, sau de eficacitate a terapiei. Până în prezent, există doar o corelație săracă între parametrii de laborator ce indică prezența unei crioglobulinemii. Compoziția crioglobulinelor mixte se poate modifica în timp, în ceea ce privește variațiile IgM cu evoluția bolii, scăderea sa ca urmare a terapiei, sau în cazul unei hipogammaglobulinemii. Efectele acestor modificări asupra amplitudinii termale, stoichiometriei complexelor cu răcirea, sau proprietăților fizice ale crioglobulinelor au fost limitat studiate. Ceea ce s-a urmărit până în pre-

zent a fost variația nivelelor de crioglobuline în funcție de tratamentul aplicat (plasmafereză, agenți citotoxici, interferon α) și aceasta utilizând un singur laborator de referință sau tehnici de înaltă standardizare.

Valorile crioglobulinelor serice, de obicei, nu se corelează cu severitatea și prognoza bolii. Valori foarte mici de criocrit, deseori greu de cuantificat, se pot asocia cu sindrom crioglobulinic sever; din contră, concentrații mari de crioglobuline pot fi caracteristice bolilor oligosimptomatice sau asimptomatice.

Corelația HCV cu crioglobulinemia mixtă poate constitui un model interesant de virus ce dirijează o boală autoimună și neoplazică; în acest fel, se aruncă o nouă lumină asupra legăturii strânse între tulburările limfoproliferative - boala autoimună și a interpretării fenomenului autoimun din cursul infecției virale. Valoarea pre- și postferezei cantitative pentru crioglobuline sau imunoglobuline (în particular pentru IgM) și a nivelelor HCV RNA pentru prezicerea evoluției clinice de lungă durată rămâne o problemă de viitor.