

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Crioglobulinas: detección, cuantificación, tipificación inmunoquímica y expresión clínica

Ramos, Silvia Graciela; Ingénito, Fernanda; Lessa, Carmen; Carballo, Orlando Gabriel

Laboratorio de Inmunología, Unidad de Inmunología e Histocompatibilidad, Hospital de Agudos Dr. Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina.

Los autores declaramos no tener conflictos de intereses.

Dirección Postal: Dra. Silvia Graciela Ramos. Ambrosetti 920 4º A, CABA, Argentina. Fax: 4982-0625

Contacto: e-mail: sgramos58@hotmail.com

## Resumen

Las crioglobulinas son inmunoglobulinas simples o complejos inmunes, formados por dos o más inmunoglobulinas que precipitan del suero en frío.

Se las clasifica en tres tipos: I (monoclonales); II (mixtas monoclonales/policonales) y III (mixtas policlonales).

El objetivo del trabajo fue la detección, cuantificación y tipificación inmunoquímica de crioglobulinas en pacientes con enfermedades asociadas a crioglobulinemia sintomáticos.

Se estudiaron 140 pacientes, de 42 años de edad promedio (rango: 16-76), relación de sexo Femenino/Masculino 110/30. Presentaron crioglobulinas 63/140 pacientes (45%). El rango de criocritos encontrados en todos los pacientes fue de 0,5 a 30%. De los 63 pacientes con crioglobulinas positivas 3 (5%) fueron de tipo I con un rango de 0,5 a 30%; 6 (10%) fueron de tipo II con un rango de 0,5 a 16% y 54 (85%) fueron de tipo III con un rango de criocrito de 0,5 a 16%.

En este estudio se encontró una elevada frecuencia de crioglobulinas tipo III concordando con las enfermedades asociadas a crioglobulinemia incluidas en la serie. Aunque hubo superposición, la mayoría de las crioglobulinas tipo III presentaron criocritos bajos, mientras las tipo I y II tuvieron mayor concentración.

El estudio de crioglobulinas es necesario en enfermedades autoinmunes, linfoproliferativas e infecciosas crónicas y resulta una importante ayuda para realizar el diagnóstico en pacientes con síntomas asociados a ellas.

**Palabras Claves:** Crioglobulinemia. Crioglobulinas. Criocrito.

## Abstract

Serum cryoglobulins consist of single monoclonal immunoglobulin or immune complexes composed of two or more classes of immunoglobulins that reversibly precipitate from serum on cooling. Cryoglobulins are immunochemically categorized into three types: type I, containing a single monoclonal immunoglobulin; type II, mixed monoclonal/polyclonal immunoglobulins, and type III, composed of polyclonal immunoglobulins.

Our goal was to detect, quantify and immunochemically characterize cryoglobulins in patients with diseases and symptoms associated with cryoglobulinemia, to determine the incidence of diseases and symptoms observed in patients with cryoglobulinemia.

We studied 140 patients, mean age 42 years (range: 16-76), sex ratio Female / Male 110/30. Cryoglobulins were present in 63 out of the 140 patients (45%). The cryocrit range found in all patients was 0.5 to 30%. Of the 63 patients with positive cryoglobulins, three (5%) were type I with a cryocrit range of 0.5 to 30%, six (10%) were type II with a cryocrit range of 0.5 to 16%, and 54 (85%) were type III with a cryocrit range of 0.5 to 16%.

We found high frequency of type III cryoglobulins in concordance with the diseases associated with cryoglobulinemia included in this study. Although we found superposition, the majority of type III cryoglobulins had low cryocrites, while type I and II had high concentration.

Investigations of cryoglobulins are necessary in autoimmune, lymphoproliferative and chronic infectious diseases, resulting in an important support for diagnosis in patients with symptoms associated with cryoglobulinemia.

**Key Words:** Cryoglobulinemia. Cryoglobulins. Cryocrite.

## Introducción

Las crioglobulinas son inmunoglobulinas simples o complejos inmunes formados por dos o más inmunoglobulinas que precipitan del suero en frío. Fueron por primera vez observadas en neoplasias reticuloendoteliales<sup>1</sup>. Las investigaciones siguientes estudiaron la naturaleza fisicoquímica de la crioprecipitación y las propiedades inmunoquímicas que determinan sus características únicas de solubilidad<sup>2</sup>. Una década después de la observación original, se describió un paciente con crioglobulinemia en ausencia de neoplasia, cuyas características clínicas sugerían una enfermedad mediada inmunológicamente<sup>3</sup>. En los últimos años el entusiasmo de los investigadores con respecto a estas proteínas ha cambiado. Actualmente, ellas son consideradas como complejos inmunes circulantes porque se demostró que contienen antígenos, anticuerpos y otros inmunoreactivos, que pueden estar relacionados a la patogénesis de la enfermedad que acompañan<sup>4</sup>. Por ejemplo, las crioglobulinas aparecen regularmente en el suero de pacientes con enfermedades de etiología infecciosa conocida, asociadas a características autoinmunes, tales como, lepra<sup>5</sup>, glomerulonefritis postestreptocócica<sup>6</sup>, endocarditis bacteriana subaguda<sup>7,8</sup>, malaria crónica<sup>7</sup>, infección por citomegalovirus<sup>10,11</sup>, virus de Epstein Barr<sup>10,12</sup>, virus de hepatitis B<sup>13</sup> y virus de hepatitis C<sup>9,14-16</sup>. Las crioglobulinas, además, se han descrito en enfermedades reumáticas de etiología desconocida como lupus eritematoso sistémico<sup>17</sup> en ratones New Zealand Black<sup>18</sup> y en una forma primaria o esencial<sup>19</sup>.

La tipificación inmunoquímica de las crioglobulinas ha permitido clasificarlas en tres grupos principales<sup>20</sup>.

**Crioglobulinas tipo I:** inmunoglobulina monoclonal (m) simple. Son inmunoglobulinas monoclonales simples, frecuentemente de clase IgM o IgG, raras veces de clase IgA y muy raros casos de cadenas livianas monoclonales.

**Crioglobulinas tipo II:** inmunoglobulinas mixtas monoclonal/policlonal (m/p). Están formadas por inmunoglobulinas mixtas compuestas por dos o más inmunoglobulinas de diferentes clases. Un componente del complejo es una proteína monoclonal, en la que se encuentra una elevada proporción de clase IgM, la que tiene actividad anti-gammaglobulina, es decir, lo que se denomina factor reumatoideo (FR), asociada a una inmunoglobulina policlonal, frecuentemente IgG.

**Crioglobulinas tipo III:** inmunoglobulinas mixtas policlonales (p). Son crioglobulinas mixtas constituidas por dos o más inmunoglobulinas de diferentes clases, pero, cada uno de los componentes es una inmunoglobulina policlonal.

Se ha postulado que la patogénesis de la crioglobulinemia mixta tendría un mecanismo semejante a la reacción de Arthus o a la enfermedad del suero, causando vasculitis<sup>21</sup>. La vasculitis asociada a crioglobulinemia mixta, varía desde una vasculitis cutánea benigna, responsable de púrpura palpable, que ocurre en casi todos estos pacientes, a vasculitis severa, que involucra órganos vitales. Aunque la asociación de crioglobulinemia mixta con vasculitis de vasos de pequeño y mediano calibre se estableció hace más de 40 años<sup>4</sup>,

la patogénesis aun no ha sido bien dilucidada. La vasculitis cutánea se ha clasificado como vasculitis leucocitoclástica, mediada por complejos inmunes<sup>22</sup>. La enfermedad renal en crioglobulinemia mixta, generalmente asociada con los tipos II y III, es una glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP). Los pacientes con crioglobulinemia mixta, por lo general, tienen niveles bajos de complemento en suero, en la que se observa una correlación inversa entre la concentración de C3 y la severidad de la nefritis<sup>23</sup>. Además, se ha demostrado que las crioglobulinas activan el componente C3 tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>23</sup>. Cuando los complejos generados, son capaces de activar los últimos componentes del complemento, la permeabilidad de la membrana de las células endoteliales vasculares se altera, facilitando el depósito de complejos inmunes.

Si bien, se ha encontrado una fuerte asociación de infección por virus de hepatitis C (HCV) con crioglobulinemia mixta<sup>14-16</sup>, hay pocos estudios sobre el rol directo de HCV en la patogénesis de esta enfermedad.

Una de las hipótesis sobre la patogénesis de la crioglobulinemia mixta sostiene que una enfermedad linfoproliferativa maligna de bajo grado es la base de esta enfermedad. Algunos indicios son: la apacición de FR monoclonal en crioglobulinas tipo II, la presencia de crioglobulinas tipo II en pacientes con neoplasias linfoides, la detección de células linfoplasmocitoides aparentemente malignas en el hígado y medula ósea de pacientes con crioglobulinemia mixta. La segunda hipótesis, teniendo en cuenta la presencia de crioglobulinas mixtas en varias infecciones, es que los FR en crioglobulinemia mixta se producen por la estimulación crónica del sistema inmune por complejos formados por IgG específica, unida a antígenos del agente infeccioso; aunque la producción de FR es común en enfermedades crónicas por complejos inmunes como artritis reumatoidea, LES y endocarditis bacteriana subaguda, la producción de FR monoclonal en éstas entidades es rara.

### Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Realizar la detección, cuantificación y tipificación inmunoquímica de crioglobulinas en pacientes sintomáticos con enfermedades asociadas a crioglobulinemia.
2. Determinar las enfermedades asociadas a crioglobulinemia.
3. Estimar la prevalencia de los síntomas asociados a la presencia de crioglobulinas en circulación.

### Materiales y métodos

1. Obtención de la muestra. Se extrajo sangre venosa del paciente en ayunas, teniendo la precaución de calentar la jeringa y los tubos de recolección de la muestra a 37°C. Se obtuvo 20 ml de sangre y los tubos se dejaron en un baño de agua a 37°C hasta coagulación completa. No se debe usar anticoagulante porque el plasma puede producir criofibrinógeno o proteínas que precipitan con heparina. Se centrifugó a 37°C y el suero fue transferido

- a 2 tubos de vidrio graduados de 5 ml cada uno, lo que permitió la fácil detección de mínimas cantidades de crioprecipitado.
- Aislamiento, cuantificación y purificación de crioglobulinas. El suero se almacenó en la heladera a 4°C durante 7 días, luego, se procedió a centrifugar los tubos a 4°C y medir el criocrito, que es el % de crioprecipitado con respecto al volumen total de suero. Fue descartado el sobrenadante y las crioglobulinas fueron lavadas cinco veces con solución fisiológica a 4°C.
  - Estudio inmunoquímico. Luego de aislar y purificar las crioglobulinas, estas fueron resuspendidas en solución fisiológica y la crioprecipitación fue revertida colocando los tubos a 37°C hasta redisolución completa.

La tipificación inmunoquímica fue realizada por inmunofijación electroforética, utilizando antisueros anti-humano mono-específicos, anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-Kappa y anti-Lambda (Sebia), utilizando un equipo HYDRASYS 2® agarose gel electrophoresis system Sebia. Este estudio permitió conocer la composición inmunoquímica de las crioglobulinas, pudiéndolas clasificar según Brouet20 en, crioglobulinas tipo I, II o III, según se trataran de inmunoglobulinas monoclonales simples, inmunoglobulinas mixtas monoclonales/policionales o inmunoglobulinas mixtas policlonales, respectivamente.

### Pacientes estudiados

Las muestras fueron obtenidas de 140 pacientes, los cuales se encontraban en seguimiento ambulatorio o estaban hospitalizados por complicaciones clínicas de su enfermedad. Los procedimientos utilizados se realizaron tras la obtención del consentimiento informado. Los criterios para la inclusión de los pacientes estudiados fueron, que tuvieran diagnóstico de enfermedades asociadas a crioglobulinemia y/o que en el momento del estudio presentaran síntomas característicos de la presencia de crioglobulinas séricas. De cada paciente se confeccionó una ficha con datos filiatorios, manifestaciones clínicas, estudios de laboratorio y complementarios (Anexo I)

La edad promedio de los 140 pacientes incluidos en la serie fue 42 años (rango 16 - 76); y la distribución de sexo fue 110 mujeres / 30 hombres.

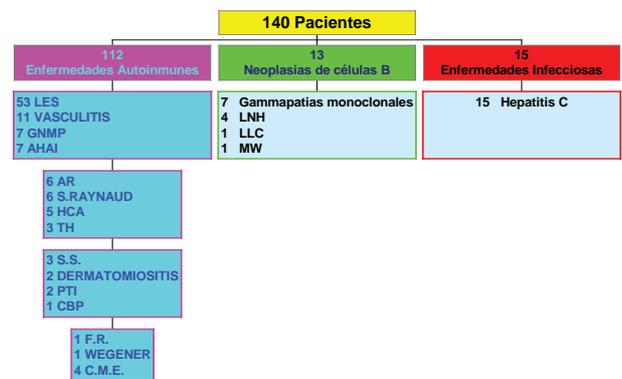
Fueron estudiados 112 pacientes con enfermedades autoinmunes, de los cuales 53 fueron diagnosticados como -Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y cumplían cuatro o más criterios de American Rheumatism Association (ARA); 11 pacientes con vasculitis de etiología desconocida; 7 glomerulonefritis proliferativa mesangial (GNPM) sin causa aparente; 7 anemia hemolítica autoinmune (AHA); 6 artritis reumatoidea (AR); 6 síndrome de Raynaud (SR); 5 hepatitis crónica activa (HCA); 3 tiroiditis de Hashimoto (TH); 3 síndrome de Sjögren (SS); 2 dermatomiositis (DM); 2 púrpura trombocitopénica idiopática (PTI); 1 cirrosis biliar primaria (CBP); 1 fiebre reumática (Fr); 1 Vasculitis de Wegener; 4

crioglobulinemia mixta esencial (CME).

Se incluyeron en la serie 13 pacientes con neoplasias de células B, 7 gammopatías monoclonales (Gmo), 4 linfomas no Hodgkin (LNH), 1 leucemia linfocítica crónica (LLC) y 1 macroglobulinemia de Waldenström (MW).

De 15 enfermedades infecciosas estudiadas, 15 pacientes tenían hepatitis C con anticuerpos anti HCV IgG reactivo y RNA-HCV positivo por PCR. En el cuadro 1 se muestran los pacientes estudiados. [Cuadro 1].

**Cuadro 1.** Pacientes estudiados.



- LES: Lupus eritematoso sistémico. GNMP: glomerulonefritis membranoproliferativa. AHAI: anemia hemolítica autoinmune. AR: artritis reumatoidea. HCA: hepatitis crónica activa. TH: tiroiditis de Hashimoto. S.S.: síndrome de Sjögren. PTI: púrpura trombocitopenica autoinmune. CBP: cirrosis biliar primaria. F.R.: fiebre reumática. C.M.E.: crioglobulinemia mixta esencial. LNH: linfoma no Hodgkin. LLC: leucemia linfocítica crónica. MW: macroglobulinemia de Waldenström.

### RESULTADOS

Se pudieron detectar crioglobulinas en 63 de los 140 pacientes representando el 45% de la serie estudiada. El rango de criocrito detectados fue de 0.5 a 30%, considerando los tres tipos de crioglobulinas. De los 63 pacientes con crioglobulinemia, 3 presentaron crioglobulinas tipo I o crioglobulinas monoclonales simples; lo cual significó una frecuencia del 5% de los casos de crioglobulinemia. Las 3 se tipificaron inmunoquímicamente como IgM monoclonal. El rango de criocrito encontrado, en este caso, fue de 0.5 – 30%. Crioglobulinas tipo II o mixtas monoclonales/policionales se manifestaron en 6 pacientes. Esto resultó en una frecuencia del 10%; de las cuales 3 se caracterizaron como IgM monoclonal/IgG policlona, 1 IgG monoclonal/IgM policlona, 1 IgA monoclonal/IgM policlona y 1 IgA monoclonal/IgM policlona/IgG policlona. El rango de criocrito encontrado fue de 0.5 al 16%. Crioglobulinas tipo III o mixtas policlonales se encontraron en la mayoría de los pacientes estudiados, 54/63 (85%), lo cual está de acuerdo con el número de pacientes con enfermedades autoinmunes incluidos en el estudio. De estas enfermedades el 30 (48%) fueron IgM policlona/IgG policlona, 22 (35%) IgG policlona/IgG policlona y 2 (3%) IgM policlona/IgG policlona/IgA policlona. En este tipo de

**Tabla 1.** Tipificación inmunológica y cuantificación de crioglobulina en los pacientes estudiados

| CRIOGLOBULINA | Nº CASOS | %  | TIPIFICACIÓN INMUNOQUÍMICA | %    | CRIOCRITO RANGO |
|---------------|----------|----|----------------------------|------|-----------------|
| TIPO I        | 3 / 63   | 5  | 3 IgM m                    | 5    | 0,5 - 30        |
| TIPO II       | 6 / 63   | 10 | 3 IgM m / IgG p            | 5    | 0,5 - 16        |
|               |          |    | 1 IgG m / IgM p            | 1,66 |                 |
|               |          |    | 1 IgA m / IgM p            | 1,66 |                 |
|               |          |    | 1 IgA m / IgM p / IgG p    | 1,66 |                 |
| TIPO III      | 54 / 63  | 85 | 30 IgM p / IgG p           | 47,2 | 0,5 - 16        |
|               |          |    | 22 IgG p / IgG p           | 34,6 |                 |
|               |          |    | 2 IgM / IgA / IgG p        | 3,1  |                 |

► m: monoclonal. -p: policlonal

crioglobulinas el rango de criocrito encontrado fue de 0.5 a 16,0%). Los resultados se resumen en la tabla 1.

La frecuencia de crioglobulinemia en las enfermedades incluidas en la serie (tabla 1) fue: LES 26%; hepatitis C 15%; vasculitis 9%, glomerulonefritis proliferativa mesangial (GNPM) 9%, hepatitis crónica activa (HCA) 5.5%; anemia hemolítica autoinmune (AHA), tiroiditis de Hashimoto (TH), artritis reumatoidea (AR), dermatomiositis (DM) y síndrome de Raynaud (SR) 3% cada una; cirrosis biliar primaria (CBP), linfoma no Hodgkin (LNH) y macroglobulinemia de Waldenström (MW) 1.5% cada una; crioglobulinemia mixta esencial 5%. En 20/53 (38%) de los pacientes con LES se detectaron crioglobulinas, resultando todas de tipo III. La tipificación inmunoquímica de estas crioglobulinas mostró 12/20 (60%) IgGp/IgGp, 7/20 (35%) IgMp/IgGp y 1/20 (5%)

IgGp/IgAp/IgMp. El rango de criocrito encontrado en los pacientes con LES fue de 0.5 a 4%. De los 15 pacientes con Hepatitis C, 12 (80%) tenían crioglobulinemia, 3 de ellos Tipo II (25%) todas IgMm/IgGp y 9 Tipo III (75%), 8 IgMp/IgGp y 1 IgGp/IgGp. El rango de criocrito fue de 0.5 a 16. 7/11 (64%) de los pacientes con Vasculitis presentaron crioglobulinas, todas fueron tipo III; 5 IgGp/IgGp y 2 IgMp/IgGp. El rango de criocrito en los pacientes con vasculitis fue 0.5 a 8.5%. Todos los pacientes con glomerulonefritis proliferativa mesangial (GNPM) tenían crioglobulinas 7/7 (100%), todas tipo III IgMp/IgGp. El rango de criocrito hallado en estos pacientes fue de 3 a 16%.

De las 8 gammopatías monoclonales incluidas detectamos crioglobulinas en 6 (75%); 2 Tipo I IgM monoclonal; 4 Tipo II, 2 IgMm/IgGp, 1 IgGm/IgMp y 1 IgAm/IgMp; el rango de criocrito resulto ser de 0.5 - 16%.

5/5 Hepatitis crónica activa (HCA) tenían crioglobulinas; 2 Tipo I, IgMm; 1 Tipo II IgAm/IgMp/IgGp y 2 Tipo III IgGp/IgGp con un rango de criocrito de 0.5 a 10%.

Los síntomas asociados a crioglobulinemia, observados en los pacientes estudiados fueron los siguientes:

Artralgias/Artritis se presentó en 25/63 (40%) de los pacientes con crioglobulinemia; Raynaud en 22/63 (35%); manifestaciones neurológicas y renales en 21/63 pacientes (33%) respectivamente; púrpura vascular en 18/63 (28%); úlceras y manifestaciones hemorrágicas en 10/63 (16%) cada uno; dolor abdominal en 6/63 (10%); hepatitis crónica 5/63 (8%); urticaria por frío en 4/63 (6%) y livedo reticularis 3/63 (5%). Estos datos se resumen en la tabla 3.

**Tabla 2.** Enfermedades asociadas a crioglobulinemia

| Enfermedad Asociada   | Nº Pac. | Criog. + | Frecuencia % | TIPO I | TIPO II | TIPO III |
|-----------------------|---------|----------|--------------|--------|---------|----------|
| LES                   | 53      | 20       | 26           |        |         | 20       |
| HCV +                 | 15      | 12       | 15           |        | 3       | 9        |
| VASCULITIS            | 11      | 7        | 9            |        |         | 7        |
| GNPM                  | 7       | 7        | 9            |        |         | 7        |
| GAMMAPATIA MONOCLONAL | 8       | 6        | 8            | 2      | 4       |          |
| HCA                   | 5       | 5        | 5,5          | 2      | 1       | 2        |
| AHA                   | 3       | 2        | 3            |        |         | 2        |
| TH                    | 3       | 2        | 3            |        |         | 2        |
| AR                    | 6       | 2        | 3            |        |         | 2        |
| DM                    | 2       | 2        | 3            | 2      |         |          |
| SINDROME RAYNAUD      | 6       | 2        | 3            |        |         | 2        |
| CBP                   | 1       | 1        | 1,5          |        |         | 1        |
| FR                    | 1       | 1        | 1,5          |        |         | 1        |
| LNH                   | 4       | 1        | 1,5          |        |         | 1        |
| MW                    | 1       | 1        | 1,5          | 1      |         |          |
| WEGENER               | 1       | 1        | 1,5          |        |         | 1        |
| CME                   | 4       | 4        | 5            |        |         | 4        |

► LES: lupus eritematoso sistémico, HCV: hepatitis C, GNPM: glomerulonefritis proliferativa mesangial, HCA: hepatitis crónica activa, AHA: anemia hemolítica autoinmune, TH: tiroiditis de Hashimoto, AR: artritis reumatoidea, DM: dermatomiositis, CBP: cirrosis biliar primaria, FR: fiebre reumática, LNH: linfoma no Hodgkin, MW: macroglobulinemia de Waldenström, CME: crioglobulinemia mixta esencial, Criog.: crioglobulinas.

**Tabla 3.** Síntomas observados en pacientes con crioglobulinemia.

| SINTOMAS                     | Nº CASOS | %  |
|------------------------------|----------|----|
| ARTRALGIAS / ARTRITIS        | 25/63    | 40 |
| RAYNAUD                      | 22/63    | 35 |
| MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS | 21/63    | 33 |
| MANIFESTACIONES RENALES      | 21/63    | 33 |
| PURPURA VASCULAR             | 18/63    | 28 |
| ULCERAS                      | 10/63    | 16 |
| MANIFESTACIONES HEMORRAGICAS | 10/63    | 16 |
| DOLOR ABDOMINAL              | 06/63    | 10 |
| HEPATITIS CRONICA            | 05/63    | 8  |
| URTICARIA                    | 04/63    | 6  |
| LIVEDO RETICULARIS           | 03/63    | 5  |

**DISCUSIÓN.**

Se encontró una elevada frecuencia [85%] de crioglobulinas tipo III o crioglobulinas mixtas policlonales, reflejando el numeroso grupo de pacientes con enfermedades autoinmunes, especialmente LES, incluidos en la serie (Figura 1).

La prevalencia de crioglobulinemia en LES varía de 7 – 90% en series informadas previamente<sup>24,25</sup>. El tipo más frecuente de crioglobulinemia descrito en LES es el tipo III, en estos pacientes la presencia de crioglobulinemia fue relacionado a actividad y severidad de la enfermedad, disminuyendo severamente los niveles del complemento<sup>24, 25,27</sup>.

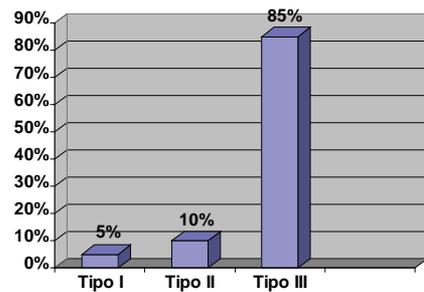
La tipificación inmunoquímica de las crioglobulinas permitió encontrar una elevada frecuencia de isotipos de inmunoglobulinas IgG (53%) e IgM (43%) y sólo 3% de IgA. Estos hallazgos concuerdan con la literatura circulante<sup>22,23</sup> (Figura 2). Las asociaciones de Isotipos de inmunoglobulinas en las crioglobulinas que se caracterizaron, arrojaron una elevada frecuencia de IgMp/IgGp (48%) y de IgGp/IgGp (35%), concordando con la bibliografía de consulta<sup>13</sup>. (Figura 3).

Aunque hubo superposición entre los niveles de los criocritos de los diversos tipos de crioglobulinemia, la mayoría de las crioglobulinas tipo III presentaron criocritos bajos, mientras las crioglobulinas tipo I y II tuvieron mayor concentración. (Figura 4). Estos resultados están de acuerdo con lo publicado en la serie de Brouet y col.<sup>20</sup>.

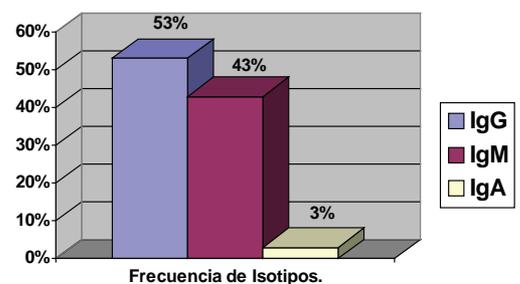
Se observó que el tiempo que demora en formarse el crioprecipitado es inversamente proporcional a la concentración de crioglobulinas. De acuerdo con esta observación, se registró que las crioglobulinas tipo I y II alcanzaron la concentración máxima de crioprecipitado en 48 a 72 horas a 4°C, a diferencia de las crioglobulinas Tipo III que tardaron en precipitar de 5 a 7 días.

En la mayoría de los pacientes con crioglobulinemia estudiados, los principales síntomas de presentación, fueron artralgias/artritis, Raynaud, manifestaciones neurológicas, renales y púrpura vascular. La exacerbación de los síntomas por frío fue referida por menos de la mitad de estos

**Figura 1.** Frecuencia de crioglobulinas tipo I, II y III en la serie estudiada.

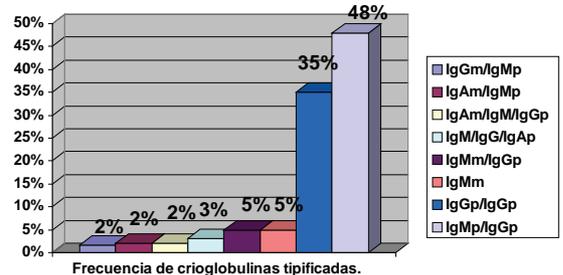


**Figura 2.** Frecuencia de isotipos de inmunoglobulinas tipificadas en las crioglobulinas detectadas en la serie estudiada.



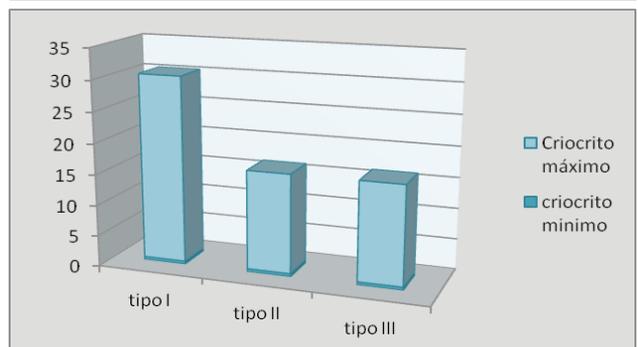
► IgG: inmunoglobulina G, IgM: inmunoglobulina M, IgA: inmunoglobulina A

**Figura 3.** Frecuencia de crioglobulinas según la tipificación inmunoquímica en la serie estudiada.

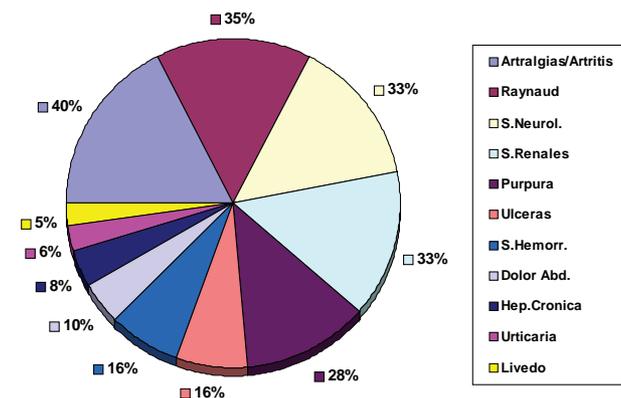


► IgGm: inmunoglobulina G monoclonal, IgGp: inmunoglobulina G policlonal, IgMm: inmunoglobulina M monoclonal, IgMp: inmunoglobulina M policlonal, IgAm: inmunoglobulina A monoclonal, IgAp: inmunoglobulina A policlonal.

**Figura 4.** Rango de criocrito en crioglobulinemias de tipo I, II, III en la serie estudiada.



**Figura 5.** Frecuencia de síntomas observados en pacientes con crioglobulinemia.



► S. Neurol: síntomas neurológicos, S. Renales: síntomas renales, S. Hemorr: síntomas hemorrágicos, Dolor Abd: dolor abdominal, Hep. Crónica: hepatitis crónica.

pacientes. Con menor frecuencia los síntomas iniciales consistieron en úlceras, manifestaciones hemorrágicas, dolor abdominal, hepatitis crónica, urticaria y livedo reticularis. (Figura 5). Estos hallazgos están de acuerdo con informes previos.<sup>20, 23-25</sup>

La importancia patogénica de las crioglobulinas, muchas veces, resulta difícil de evaluar porque algunos signos y síntomas, usualmente considerados como directamente relacionados a la crioglobulina, pueden ser debidos a la enfermedad asociada o pueden encontrarse en pacientes con inmunoglobulinas monoclonales no crioprecipitables o en pacientes con factores reumatoideos.

En algunos casos, la sospecha de crioglobulinemia la sugirió el particular trazado electroforético, que fue observado en algunos sueros con marcada precipitación en el punto de siembra del soporte utilizado para realizar un proteinograma de rutina.

Los mecanismos responsables de los síntomas encontrados en los pacientes con crioglobulinemia de la serie podrían deberse al depósito intravascular de crioglobulinas, lo que se sospechó por hallazgos clínicos como insuficiencia vascular inducida por el frío y otros de carácter histológicos, como oclusión de vasos de diferente calibre. Se cree, que la crioprecipitación ocurre in vivo porque la hiperviscosidad local de la sangre facilita el depósito de injuria vascular en los pequeños vasos sobre todo en las extremidades, las cuales son más sensibles al frío. No obstante, similares depósitos intravasculares pueden encontrarse en vasos viscerales, los cuales están protegidos de las variaciones térmicas.

La demostración de la naturaleza de los complejos inmunes de la mayoría de las crioglobulinas mixtas llevó a postular que tales complejos pueden ser responsables de vasculitis aguda. Esta hipótesis está basada en varios datos: Similares características histológicas entre las lesiones cutáneas y renales encontradas en pacientes con crioglobulinemia mixta y aquellos con enfermedad del suero aguda.

Demostración por inmunofluorescencia de depósitos específicos en la pared vascular de las mismas inmunoglobulinas encontradas en el crioprecipitado.

Disminución del nivel de complemento sérico cuando se produce daño visceral en crioglobulinemia mixta.

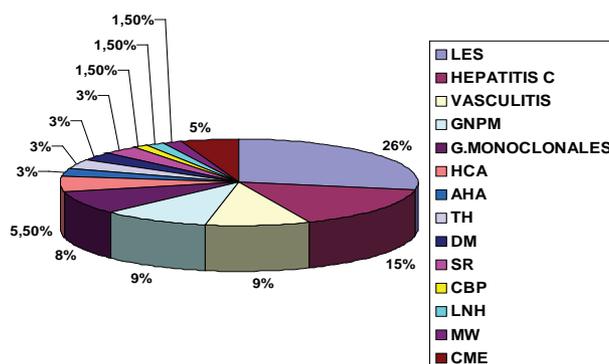
Sin embargo, no se ha podido encontrar correlación entre el nivel de complemento, la concentración de crioglobulinas o criocrito y el grado de injuria tisular.

Según hallazgos obtenidos y los postulados por la literatura, los síntomas relacionados con insuficiencia vascular se encuentran, principalmente, en pacientes con crioglobulinemia tipo I y II, cuya concentración es generalmente elevada. Por otro lado, la vasculitis cutánea aguda y la glomerulonefritis son más frecuentes en los tipos II y III de crioglobulinemia mixta. Los pacientes con crioglobulinemia tipo II pueden presentar características de los dos tipos de injuria, vasculitis de piel y obstrucción glomerular. Sin embargo, se encontraron excepciones: algunos pacientes con mínimas cantidades de crioglobulinas tipo III tenían importantes síntomas de insuficiencia vascular.

Es por esto, que la importancia patogénica de las crioglobulinas es muy difícil de probar, ya que algunos síntomas y signos asociados a crioglobulinas, pueden deberse a la enfermedad asociada o pueden encontrarse en pacientes con inmunoglobulinas monoclonales o con factores reumatoideos que no precipitan en frío, pero igualmente forman complejos inmunes, que llevan a la injuria vascular.

Con respecto a las enfermedades asociadas a crioglobulinemia se observó una elevada frecuencia de LES y hepatitis C. La frecuencia encontrada refleja que la mayoría de los pacientes de la serie tenían diagnóstico de enfermedades autoinmunes. Figura 6. La incidencia de varias enfermedades asociadas con crioglobulinemia en estos pacientes, difiere de lo hallado en otras series<sup>28, 29</sup>, que reflejan la se-

**Figura 6.** Frecuencia de enfermedades asociadas a crioglobulinemia.



► GNPM: glomerulonefritis proliferativa mesangial, G MONOCLONALES: gamopatías monoclonales, HCA: hepatitis crónica activa, AHA: anemia hemolítica autoinmune, TH: tiroiditis de Hashimoto, DM: dermatomiositis, SR: síndrome de Raynaud, CBP: cirrosis biliar primaria, LNH: linfomas no Hodgkin MW: macroglobulinemia de Waldenström, CME: crioglobulinemia mixta esencial.

lección de pacientes de una unidad dedicada a estudiar a aquellos con patologías inmunológicas, tanto autoinmune como linfoproliferativas e infecciosas crónicas y la sensibilidad y especificidad de los métodos utilizados para realizar el estudio inmunoquímico. Claramente, se muestra en la Tabla 2 que los pacientes estudiados en esta serie con enfermedades principalmente linfoproliferativas presentaron crioglobulinas tipo I o II, a diferencia de la mayoría de los pacientes con enfermedades autoinmunes que presentaron crioglobulinas Tipo III y Tipo II en menor proporción. No es sorprendente que ambos grupos de enfermedades asociadas se encuentren en pacientes con crioglobulinemia Tipo II. La actividad de autoanticuerpo de la IgM monoclonal en este tipo de crioglobulinas y su alta incidencia entre Macroglobulinemia de Waldenstrom puntualiza la relación posible entre autoinmunidad y linfoproliferación. En la serie, en 6 pacientes (10%) coexistían una enfermedad linfoproliferativa y una autoinmunes.

De 15 pacientes estudiados con Hepatitis C, 12 (80%) presentaron crioglobulinemia, 3 de ellos Tipo II y 9 Tipo III. Las prevalencias informadas en la literatura varían desde 25 a 83%, dependiendo del año en que se realizó el estudio y de la sensibilidad de los métodos utilizados<sup>10-27</sup>. La incidencia que se encontró en nuestros pacientes está de acuerdo con las publicaciones recientes<sup>9-30</sup>. Desde 1990 y luego del descubrimiento de HCV, se ha informado de la asociación entre crioglobulinemia mixta e infección por HCV, determinando que la mayoría de las crioglobulinemias denominadas "esenciales" estaban asociadas a la infección por HCV. Es razonable suponer que la infección de linfocitos B, la expansión clonal de células B y la producción de factores reumatoideos (FR) son eventos estrechamente relacionados con la historia natural de la hepatitis C crónica y que la formación de FR, complejos inmunes IgM/anti-IgG, es el paso principal que precede a la crioprecipitación. La confirmación de la relación entre infección HCV y crioglobulinemia mixta demuestra la fuerte asociación entre una infección viral y una enfermedad autoinmune y, así, una asociación potencial entre enfermedades autoinmunes sistémicas y linfoproliferativas.

El estudio de crioglobulinas en enfermedades autoinmunes, linfoproliferativas e infecciosas crónicas resulta una importante ayuda para realizar el diagnóstico en pacientes con síntomas asociados a ellas.

## Conclusiones

1. Se encontró elevada frecuencia de crioglobulinas tipo III, concordando con las enfermedades asociadas a crioglobulinemia incluidas en la serie, en su gran mayoría enfermedades autoinmunes mediadas por complejos inmunes.
2. Aunque hubo superposición, la mayoría de las Crioglobulinas tipo III presentaron criocritos bajos, mientras las TIPO I y II tuvieron mayor concentración.
3. Los síntomas más frecuentes fueron: artralgiar/artri-

tis; fenómeno de Raynaud; neurológicos; renales y púrpura vascular.

4. Las enfermedades asociadas con mayor incidencia fueron: LES y hepatitis C.
5. El estudio de crioglobulinas es útil como un dato más para realizar el diagnóstico de: enfermedades autoinmunes, linfoproliferativas e infecciosas crónicas.
6. El estudio de crioglobulinas resulta una importante ayuda para realizar el diagnóstico de enfermedad en pacientes con síntomas asociados a ellas, por lo que se sugiere incluir este parámetro inmunológico en el seguimiento de pacientes con enfermedades autoinmunes, linfoproliferativas e infecciosas crónicas.

## Referencias Bibliográficas

1. Wintrobe MM, Buell MV. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1933; 52:156-65.
2. Grey HM, Kohler PF. Cryoimmunoglobulins. *Semin Hematol.* 1973 Apr; 10(2):87-112.
3. Lerner AB, Watson CJ. Studies of cryoglobulins. I. Unusual purpura associated. *Am J Med Sci* 1947; 214:410-415.
4. Barnett EV, Bluestone R, Cracchiolo A 3rd, Goldberg LS, Kantor GL, McIntosh RM. Cryoglobulinemia and disease. *Ann Intern Med.* 1970 Jul; 73(1):95-107.
5. Bonomo L, Dammacco F. Immune complex cryoglobulinemia in lepromatous leprosy: a pathogenetic approach to some clinical features of leprosy. *Clin Exp Immunol.* 1971 Aug; 9(2):175-181.
6. McIntosh RM, Kaufman DB, Kulvinskis C, et al. Cryoglobulins. I. Studies on the nature, incidence, and clinical significance of serum cryoproteins in glomerulonephritis. *J Lab Clin Med.* 1970 Apr; 75(4):566-577.
7. Lerner AB, Barnum, Watson CJ. Studies of cryoglobulins. *Am J Med Sci* 1947; 214:416-421.
8. Hurwitz D, Quismorio FP, Friou GJ. Cryoglobulinemia in patients with infectious endocarditis. *Clin Exp Immunol.* 1975 Jan; 19(1):131-141.
9. Edgar D, Charles, Rashidah M, Green, Svetlana Marukian, et al. Clonal expansion of immunoglobulin M<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood,* Feb 2008; 111: 1344 - 1356.
10. Kaplan ME. Cryoglobulinemia in infectious mononucleosis: quantitation and characterization of the cryoproteins. *J Lab Clin Med.* 1968 May; 71(5):754-765.
11. Kantor GL, Goldberg LS, Johnson BL Jr, et al. Immunologic abnormalities induced by postperfusion cytomegalovirus infection. *Ann Intern Med.* 1970 Oct; 73(4):553-558.
12. Wager O, Räsänen JA, Hagman A, et al. Mixed cryoimmunoglobulinemia in infectious mononucleosis and Cytomegalovirus mononucleosis. *Int Arch Allergy Appl*

- Immunol. 1968; 34(4):345–361.
13. La Civita L, Zinniego AL, Lombardini F, et al Exacerbation of peripheral neuropathy during alpha-interferon therapy. *J of Rheumatol* 1996 23:1641–1643.
  14. Agnello V, Romain P. Mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis c virus infection. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 1996, Volume 22, Issue 1, Pages 1 – 21.
  15. Wei G, Yano S, Kuroiwa T, et al Hepatitis C virus (HC)-induced IgG-IgM rheumatoid factor (RF) complex may be the main causal factor for cold-dependent activation of complement in patient with rheumatic diseases. *Clin. Exp. Immunol*, 1997. 107(1): 83-88.
  16. De Vita S, Sacco C, Sansonno D, et al. Characterization of Overt B-Cell Lymphomas in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Blood*, Jul 1997; 90: 776 – 782.
  17. Hurwitz D, Quismorio FP, Friou GJ. Cryoglobulinemia in patients with infectious endocarditis. *Clin Exp Immunol*. 1975 Jan; 19(1):131–141.
  18. Hijmans W, Radema H, Van Es L, et al. Cryoglobulins in New Zealand black mice. *Clin Exp Immunol*. 1969 Feb; 4(2):227–239.
  19. Golde D, Epstein W. Mixed cryoglobulins and glomerulonephritis. *Ann Intern Med*. 1968 Dec; 69(6):1221–1227.
  20. Brouet, J. C., J. P. Clauvel, F. Danon, et al 1974. Biological and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. *Am. J. Med*. 57: 775-788.
  21. Sell; *Immunology, Immunopathology and Immunity*. 5<sup>o</sup> ed. 1996: 353-384.
  22. Weisman M, Zvaifler N. Cryoimmunoglobulinemia in rheumatoid arthritis. Significance in serum of patients with rheumatoid vasculitis. *J Clin Invest*. 1975 September; 56(3): 725–739.
  23. Chattopadhia D, Ravindran B, Prakash K. Cryoglobulins in cases of rheumatoid arthritis. 1985. *Rheumatol Int*. 5: 181-184.
  24. Garcia-Bragado F, Ilardell M, Fonolosa, et al. Crioglobulinas en enfermedades sistémicas y reumáticas. Estudio en 70 casos. *Med Clin (Barcelona)* 1980; 74: 209-213.
  25. Ortega G, Molina M, Bermuda J, et al. Significado de las crioglobulinas en el curso clínico del lupus eritematoso sistémico. *Med Clin* 1984; 83: 358-360.
  26. Agnello V, Koffler D, Eisenberg, et al. C1q precipitins in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and other hypocomplementemic states: characterization of high and low molecular weight types. *J Exp Med* 1971; 134: 228.
  27. Winfield JB, Koffler D, Kumkel HG. Specific concentration of polynucleotide immune complexes in the cryoprecipitates of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1975; 56: 563.
  28. Meltzer M, Frankling EC, Elias k, et al. Cryoglobulinemia. A clinical and laboratory study. Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med* 40: 837, 1966.
  29. Meltzer M, Frankling EC. Cryoglobulinemia. A study of twenty-nine patients: IgG and IgM cryoglobulins and factors affecting cryoprecipitability. *Am J Med* 40: 828, 1966.
  30. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood*, May 2004; 103: 3428 – 3430.