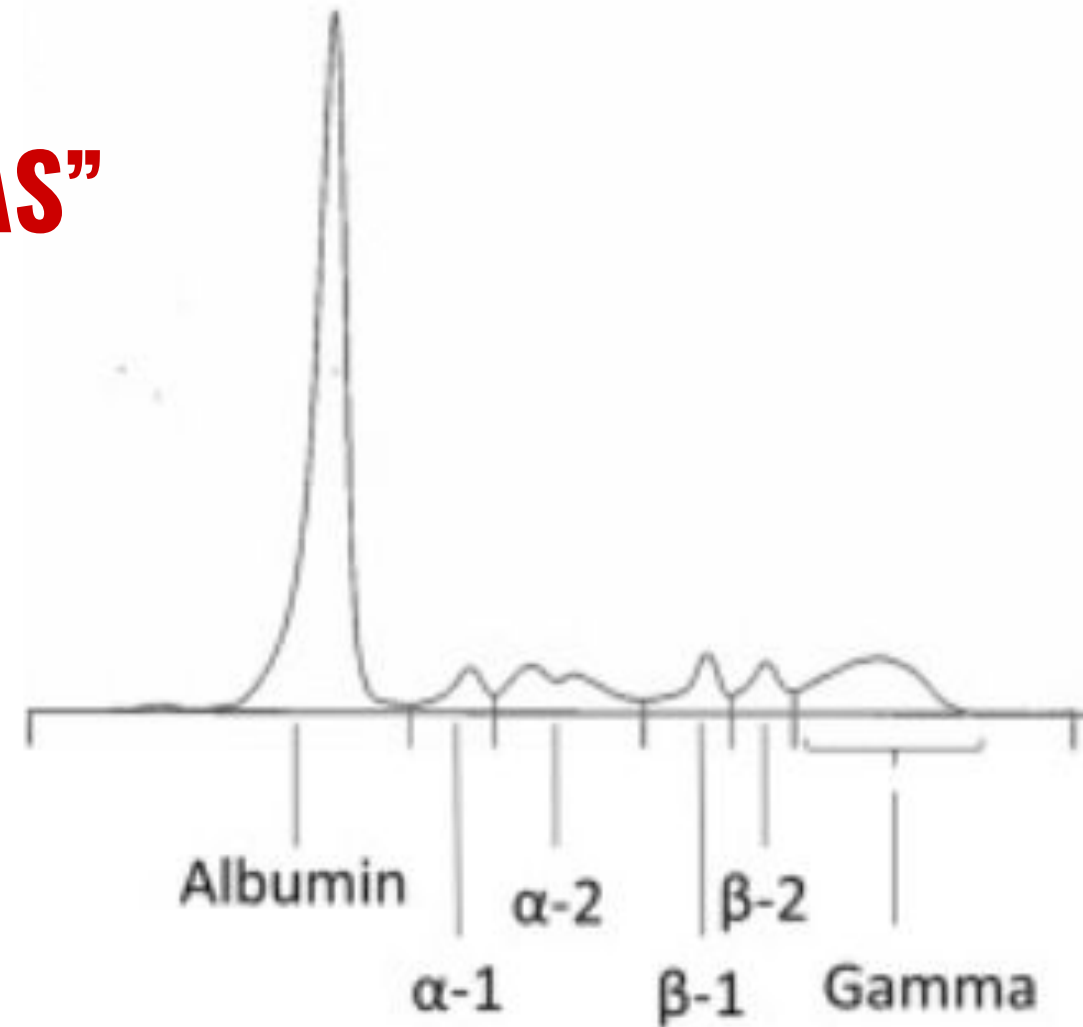


“El estudio de las PROTEÍNAS”

Bioq. Especialista en Inmunología
María Agustina Racca

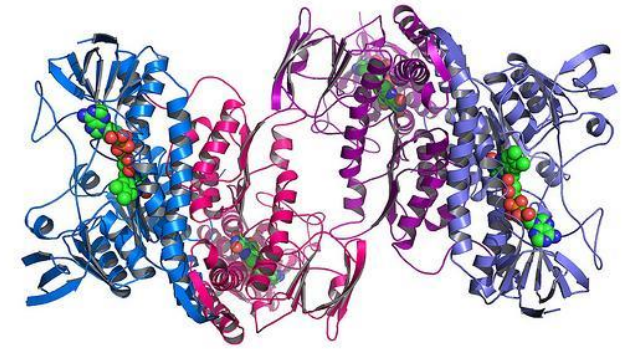
Laboratorio Central del Hospital Córdoba
Sección Inmunología



PROTEÍNAS

Son moléculas complejas que cumplen muchas funciones importantes en el organismo. Cadenas de aa.

Son vitales para la mayoría de las actividades celulares y necesarias para mantener la estructura, función y regulación de los tejidos y órganos.

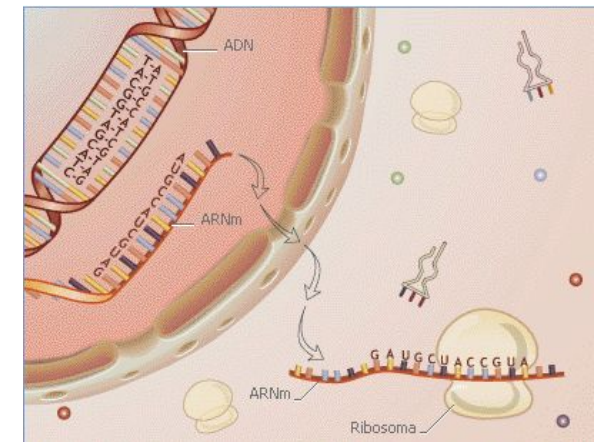


FUNCIONES PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

- o Transporte de compuestos endógenos/exógenos poco solubles en agua (hormonas, calcio, medicamentos, ...)
- o Regulación de la presión oncótica y el balance de agua, del estado ácido-base, de la hemocoagulación, entre otras.
- o Respuesta inflamatoria y control de la infección (PCR, Fibrinógeno, Ferritina, Igs ...)

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

- La mayor parte se sintetizan en el **hígado**.
- Las **células plasmáticas** son los responsables de la síntesis de las Igs.
- El catabolismo tiene lugar en los **hepatocitos** y **sistema mononuclear fagocítico**.
- Excreción por **filtración glomerular** y **gastrointestinal**.



El estudio las proteínas plasmáticas puede proveer información que refleje estados patológicos en diferentes sistemas.

Proteínas Totales (PT): proporciona información acerca del estado general del paciente

Albúmina (Alb):

- estado nutricional
- capacidad síntesis del hígado
- nefropatía o enteropatía con pérdida de proteínas.

PT – Alb = Globulinas

Métodos Biuret (IFCC método de referencia)

Test colorimétrico

En solución alcalina, el cobre bivalente reacciona con los enlaces peptídicos de las proteínas formando el característico complejo biuret purpúreo. El tartrato sódico potásico impide la precipitación de hidróxido de cobre, mientras que el yoduro potásico inhibe la autorreducción del cobre.

En solución alcalina:



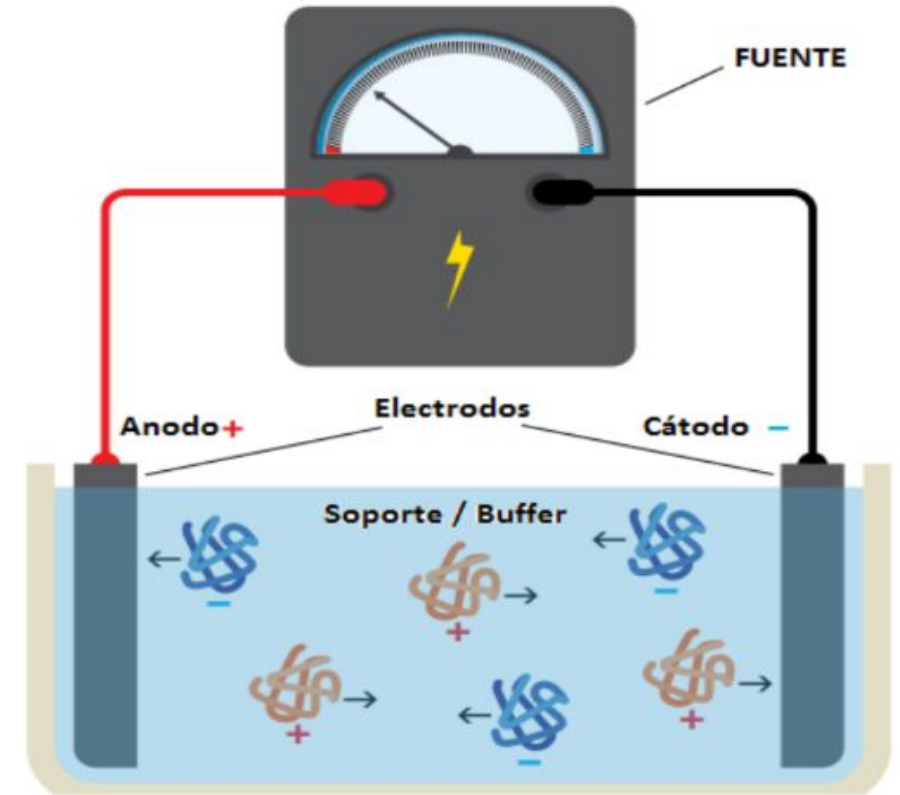
La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de proteína que puede determinarse fotométricamente, relacionado al n° de enlaces peptídicos y no a la **composición de aa de la prot ni su PM**.

Electroforesis

-Se refiere a la migración de moléculas cargadas en un campo eléctrico

**-Cada molécula se mueve hacia el electrodo de carga opuesta
cátodo (-) o ánodo (+)**

En el transporte electroforético, a la fuerza del campo eléctrico se opone la resistencia viscosa del medio, cuando se igualan, se produce el desplazamiento de las partículas a una velocidad constante.



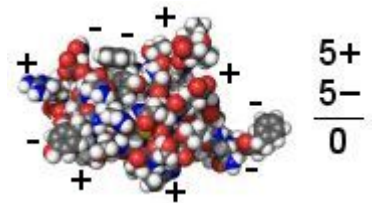
Variables que afectan la corrida electroforética:

- ★ Tipo de soporte
- ★ Temperatura
- ★ Fuerza iónica del Buffer utilizado
- ★ pH
- ★ Intensidad del campo eléctrico
- ★ Siembra de la muestra
- ★ Tiempo
- ★ Flujo electroendosmótico
- ★ Sistemas de separación: automatizado / no automatizado
- ★ Otros

Separación electroforética de proteínas

La electroforesis se aplica en el campo de la bioquímica a la separación de compuestos que poseen grupos ionizables (Ej.: aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos),
teniendo en cuenta que la carga neta de estas moléculas depende del pH del medio:

- Si la molécula **se carga positivamente**, migrará hacia el **cátodo (-)**
- Si **se carga negativamente**, hacia el **ánodo (+)**
- Si su carga neta es “cero”, no se moverá ya que se encuentra en su **punto isoeléctrico (pI)**.



El pI se define como el pH en el cual los grupos ionizables de una molécula se igualan en la cantidad de cargas positivas y negativas

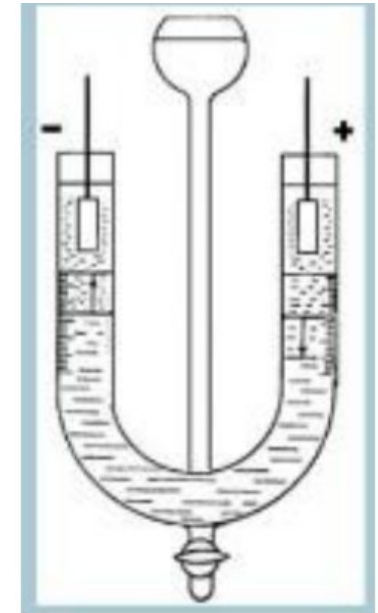
Electroforesis de proteínas séricas

En el laboratorio clínico, la aplicación más importante de la electroforesis consiste en separar las proteínas presentes en los fluidos biológicos.

Método electroforesis introducido por *Arne Tiselius* 1937.

Separó proteínas disueltas en solución de electrolitos mediante la aplicación de corriente eléctrica a través de un tubo de cuarzo en forma de U y llamó a su método “**Electroforesis de límite móvil**”

A pH 7,6 identificó 4 fracciones: **Alb**, α , β y γ .



Tubo de Tiselius

Electroforesis de proteínas séricas

La separación **sobre soportes sólidos** de las proteínas séricas, bajo la acción de un campo eléctrico, y su posterior tinción, dio lugar a lo que se conoce como ***proteinograma***.

En el **proteinograma por electroforesis (PxE)** el movimiento de las proteínas está gobernada por una compleja relación densidad de carga/tamaño.

Los **pI** de las proteínas plasmáticas se encuentran entre 4,9 (Alb) y 7,4 (gammaglobulinas).

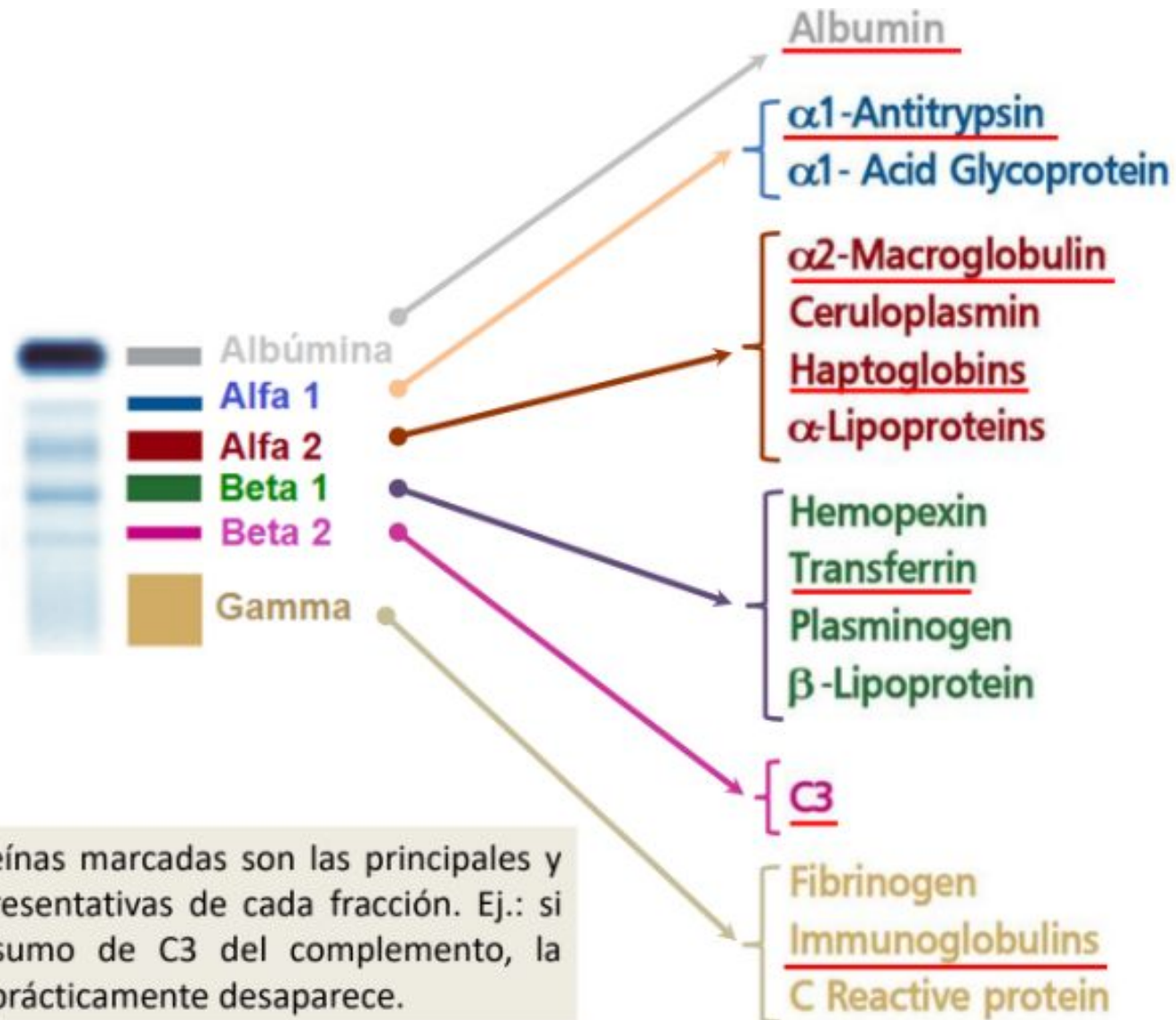
Si en el sistema se utiliza:

Tampón pH= 8,6
Todas las proteínas se cargan negativamente

Electroforesis de proteínas séricas

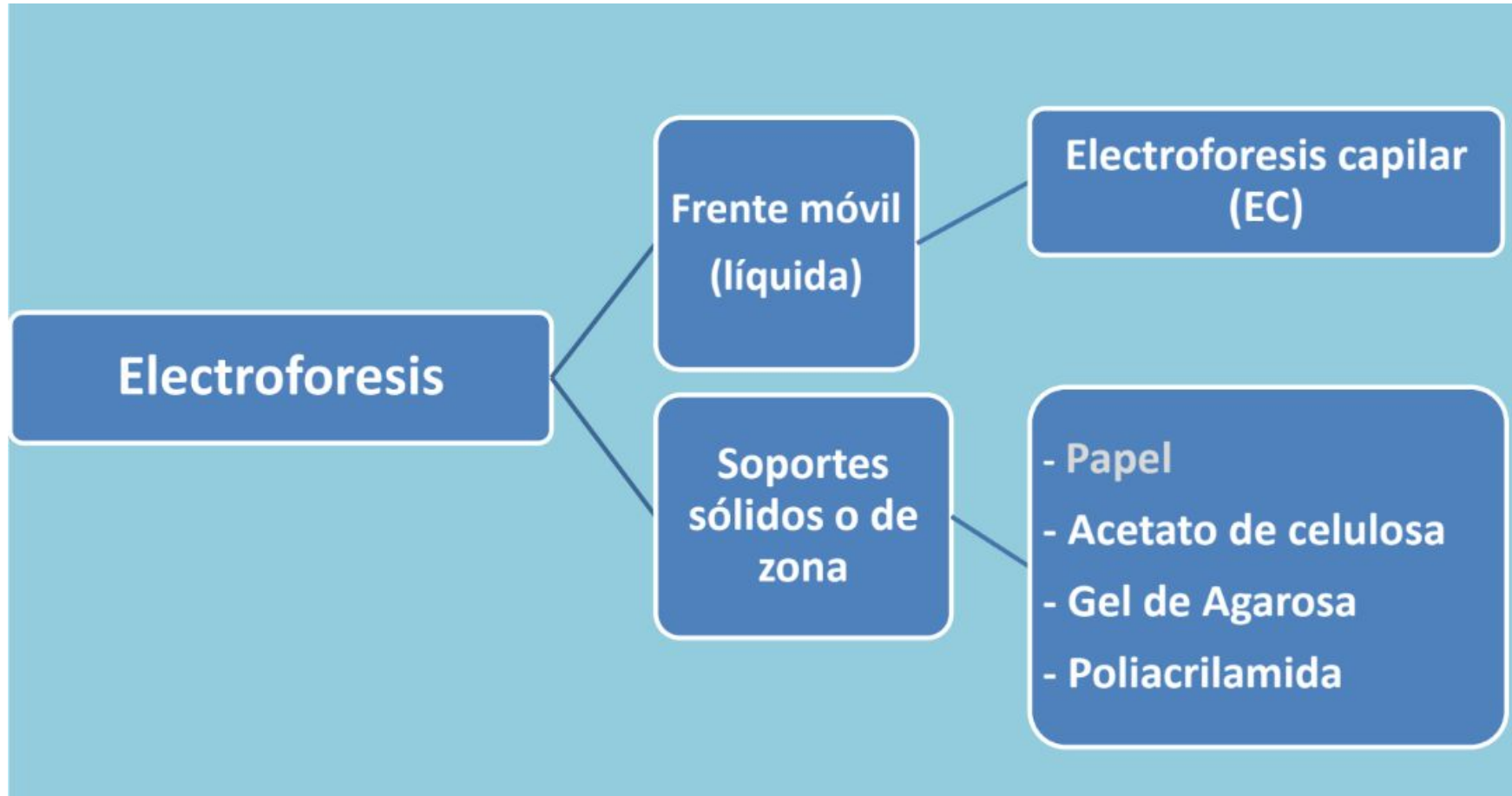
- Separa globulinas de la albúmina definiendo 5-6 fracciones: albúmina, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ - $\beta 2$ y γ .
- Cada grupo de globulinas involucra varias proteínas de migración electroforética similar.
- Resuelve las principales proteínas séricas en patrones que pueden ser específicos para algunas enfermedades.
- La inspección visual del proteinograma permite detectar variaciones sutiles de determinadas proteínas, además de alteraciones en los patrones proteicos.
- La identificación de estos patrones es un método útil de screening y debe ser seguido de procedimientos confirmatorios para identificar y cuantificar las proteínas aberrantes.

Electroforesis de proteínas séricas



Las proteínas marcadas son las principales y más representativas de cada fracción. Ej.: si hay consumo de C3 del complemento, la zona β 2 prácticamente desaparece.

Características físicas del sistema



La evolución de los medios de soporte permitió una electroforesis rápida, con separación nítida de las principales fracciones proteicas, además del escaneo densitométrico para cuantificar las fracciones.

Soporte **no restrictivo** ya que el entramado no interfiere en la migración; el tamaño de las proteínas es muy pequeño en comparación con el tamaño del poro del soporte. Las proteínas se separan principalmente por densidad de carga.



La agarosa es un polisacárido natural altamente purificado derivado del agar, el cual se extrae de las paredes celulares de ciertas algas rojas

Agarosa

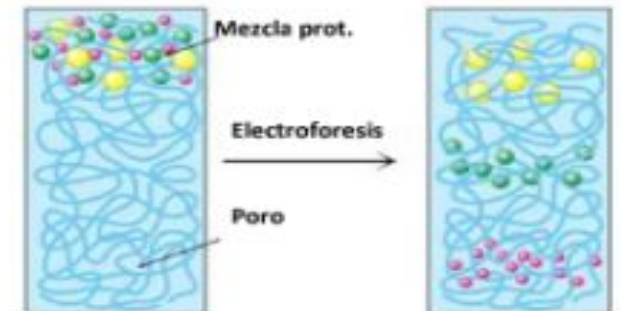


Poro del gel

(estructura macroreticular sostenida por puente de H que le confiere características termo-reversible)

Soporte **restrictivo** (poliacrilamida)

Las proteínas se separan según su tamaño y densidad de carga. El soporte produce un tamiz molecular.



ELECTROENDÓSMOSIS

Movimiento de solvente durante la electroforesis por influencia del campo eléctrico.

Soporte carga – → Contraiones carga + buffer → cátodo → H₂O solvente

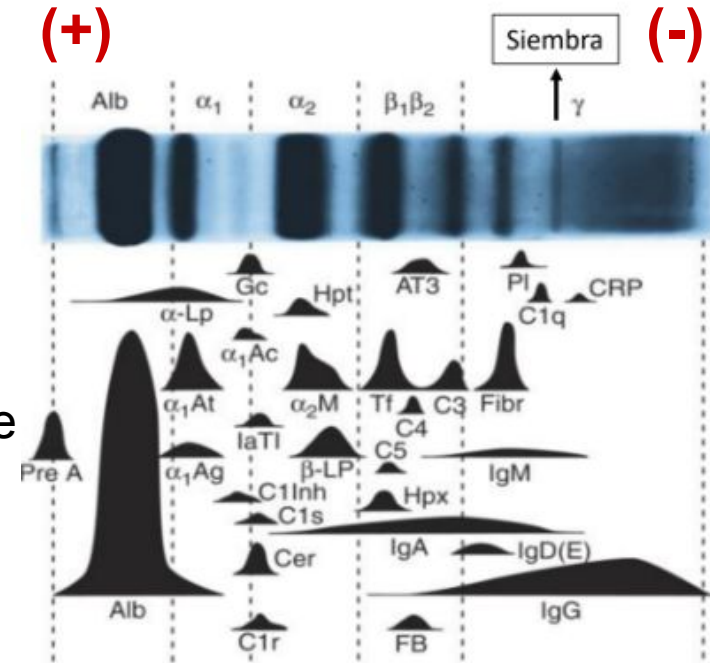
Flujo solvente hacia el cátodo → *Arrastra moléculas por efecto mecánico*

La **distancia real recorrida por una molécula** en la migración en un campo eléctrico se determina por la combinación de la **fuerza electromotriz** (una característica de la propia molécula y el pH) y la **fuerza electroendosmótica** (una función principalmente del medio de soporte).

Fuerza electroendosmótica > Fuerza electroforética



Moléculas débilmente – → Cátodo

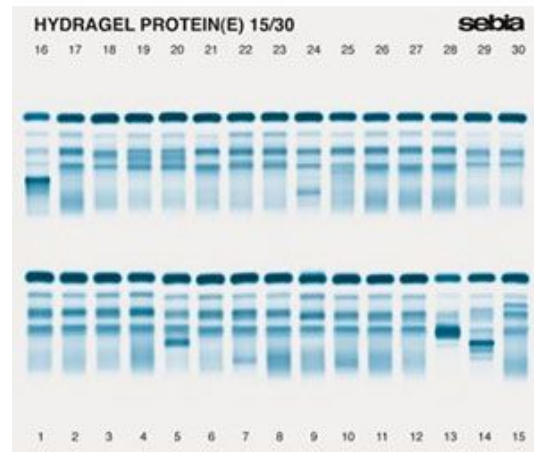


Soportes sólidos

Gel de
Agarosa



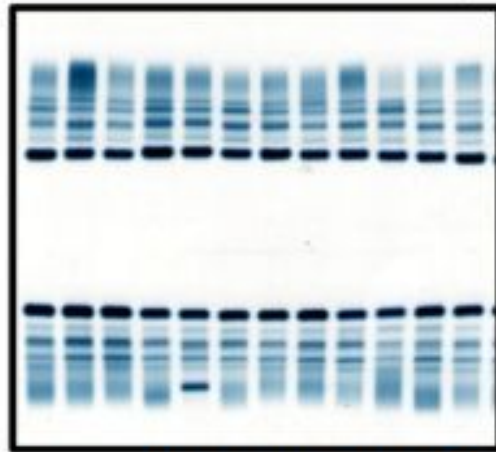
Acetato de
celulosa



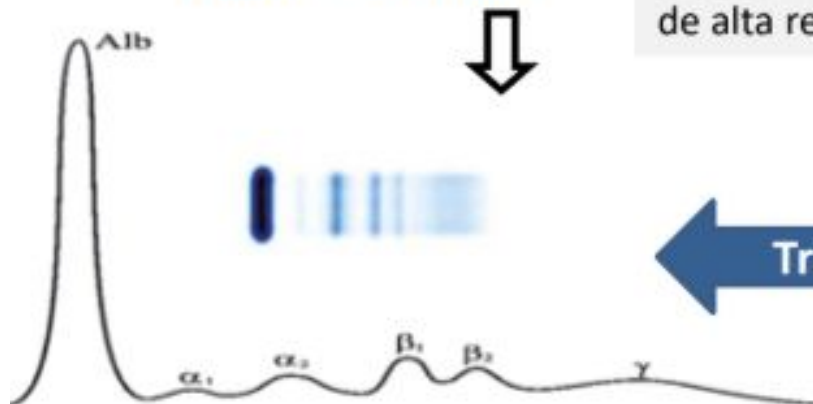
La automatización ha logrado una mejor resolución de la corrida y reproducibilidad de los resultados.

Soportes sólidos

Gel de
Agarosa



Colorante: Azul ácido

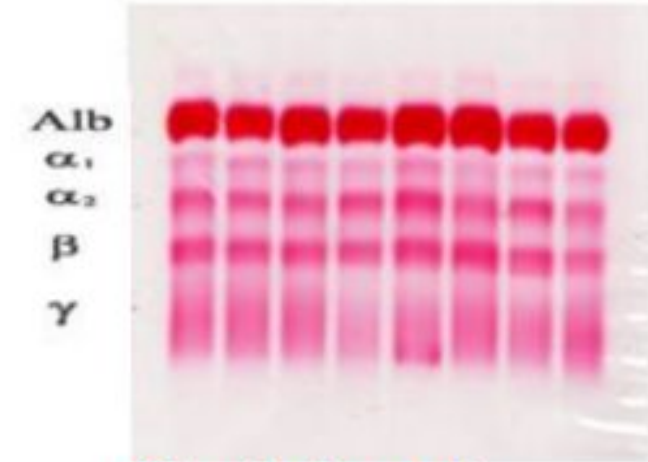


Albúmina
 α 1 globulinas
 α 2 globulinas
 β 1 globulinas
 β 2 globulinas
 γ globulinas

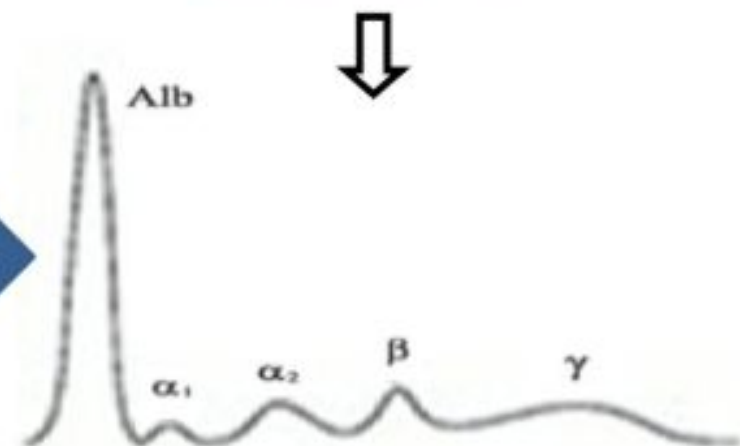
Si discrimina β , se considera de alta resolución

Trazado densitométrico

Acetato de
celulosa



Colorante: Ponceau S



Colorantes para electroforesis

Cuando la incorporación del colorante es proporcional a la cantidad de proteína se considera apto para densitometría.

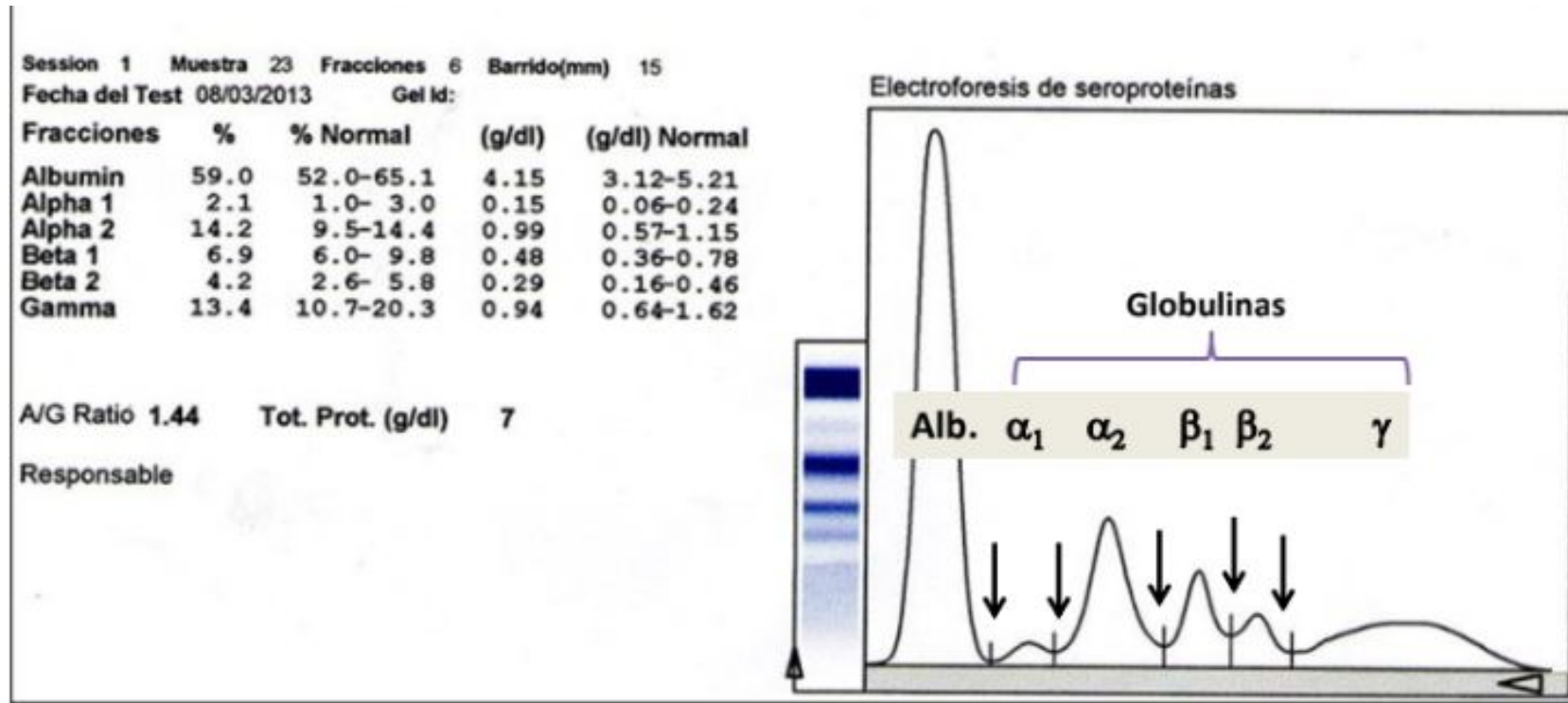
La captación del colorante es heterogénea y **a una determinada concentración de proteína se pierde linealidad para la coloración (saturación de unión al colorante).**

Colorante	Comentario
Ponceau S o Rojo Ponceau S	Tinción general. Unión mas uniforme a todas las proteínas sérica. Apto para densitometría
Amidoblack o Negro amido o Amido Schwartz	Tinción general, mejora con fijación previa. Diferente grado de unión según la proteína. Apto para densitometría
Coomassie Blue R 250	Diferente grado de unión según la proteína. Más utilizado en tinciones cualitativas (Ej.: Inmunofijación)
Violeta ácido	Diferente grado de unión según la proteína. Más utilizado en tinciones cualitativas (Ej.: Inmunofijación)
Tinciones de plata	Método laborioso, varios protocolos según el soporte. Diferente grado de unión según la proteína. Detecta ng de proteína.

INCREMENTO
SENSIBILIDAD



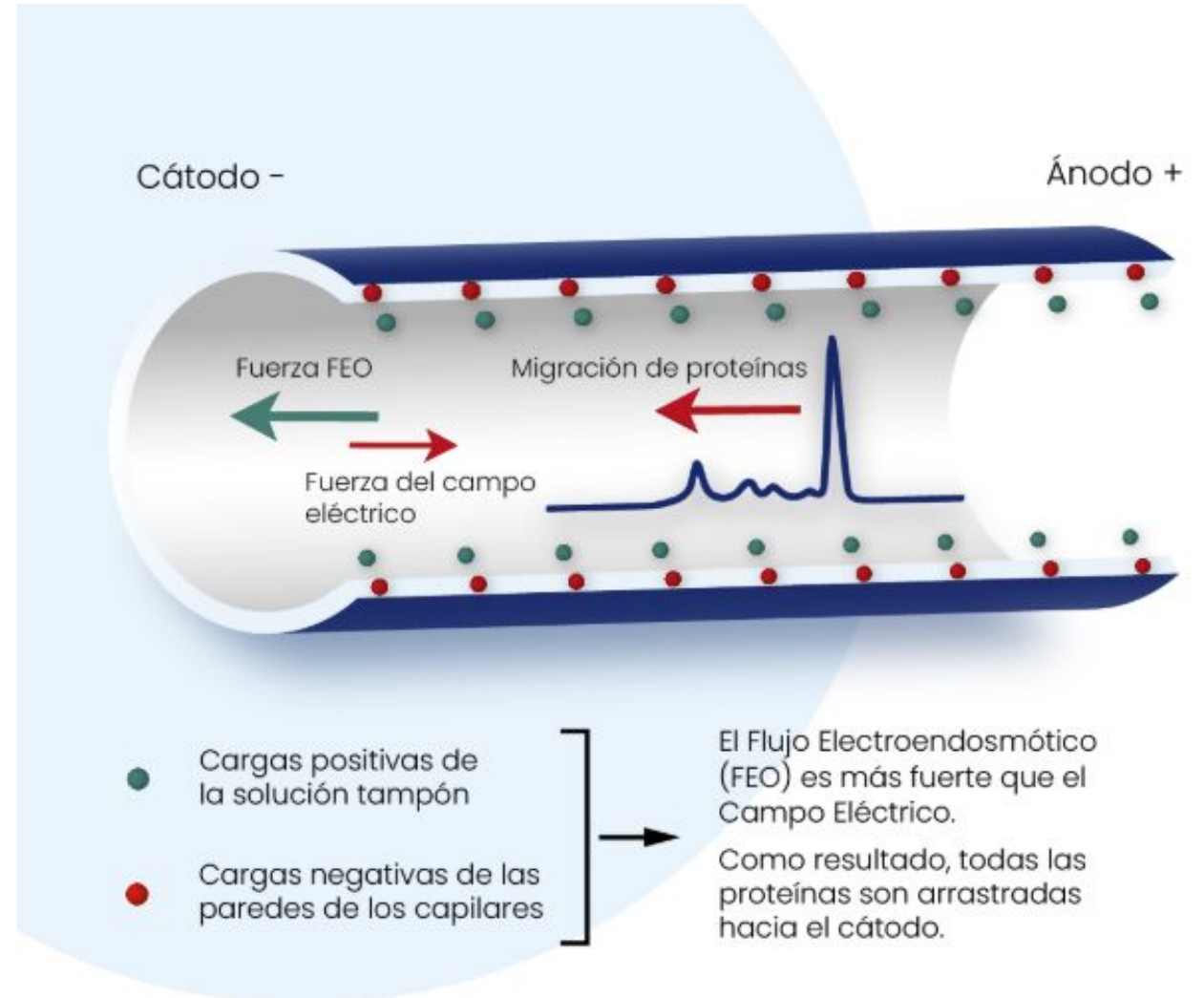
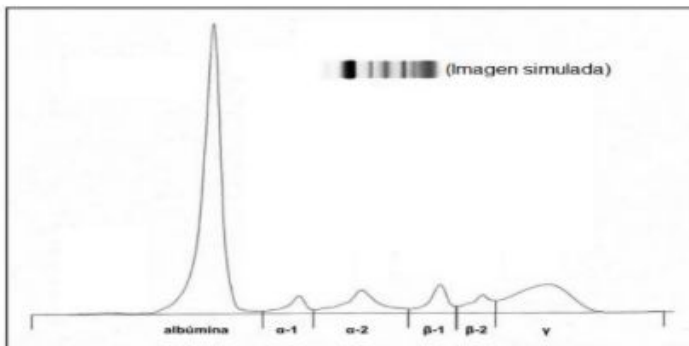
Proteinograma sérico normal en gel de agarosa



- Un densitómetro mide la captación porcentual del colorante de las distintas zonas.
- Se integra el área bajo la curva y se calcula el porcentaje de cada fracción sobre el total.
- La concentración en g/dL de cada fracción se obtiene a partir de las proteínas totales medidas por un método espectrofotométrico. La capacidad de resolución y la sensibilidad analítica en este tipo de electroforesis dependen del tipo de soporte y el colorante empleado respectivamente.

Soporte líquido: electroforesis capilar

La separación de las proteínas séricas se realiza en un **medio líquido que se encuentra en el interior de un tubo capilar de sílice de bajo diámetro**, el cual es expuesto a **voltajes muy altos**. La presencia en la superficie del capilar de **grupos silanol** cargados negativamente origina un elevado flujo electroendosmótico que excede la movilidad electroforética de las proteínas, las cuales migran hacia el cátodo (electrodo negativo). Todas las proteínas migran, a distinta velocidad en función de su relación carga/tamaño, hacia un **detector que mide la absorbancia del enlace peptídico a 200 o 214 nm**. La absorbancia es proporcional al número de uniones peptídicas; la lectura espectrométrica es convertida en una señal gráfica.



Técnicas de alta resolución

Proporcionan una nítida separación de las bandas de transferrina y C3 en la región beta.

El grado de resolución permite la detección de pequeños componentes monoclonales.

La mejor resolución resulta de una combinación de factores:

- El control de la temperatura
- El uso de lactato de calcio en el tampón
- Control del grosor del gel
- Método de aplicación de la muestra
- Otros

Geles de agarosa vs electroforesis capilar

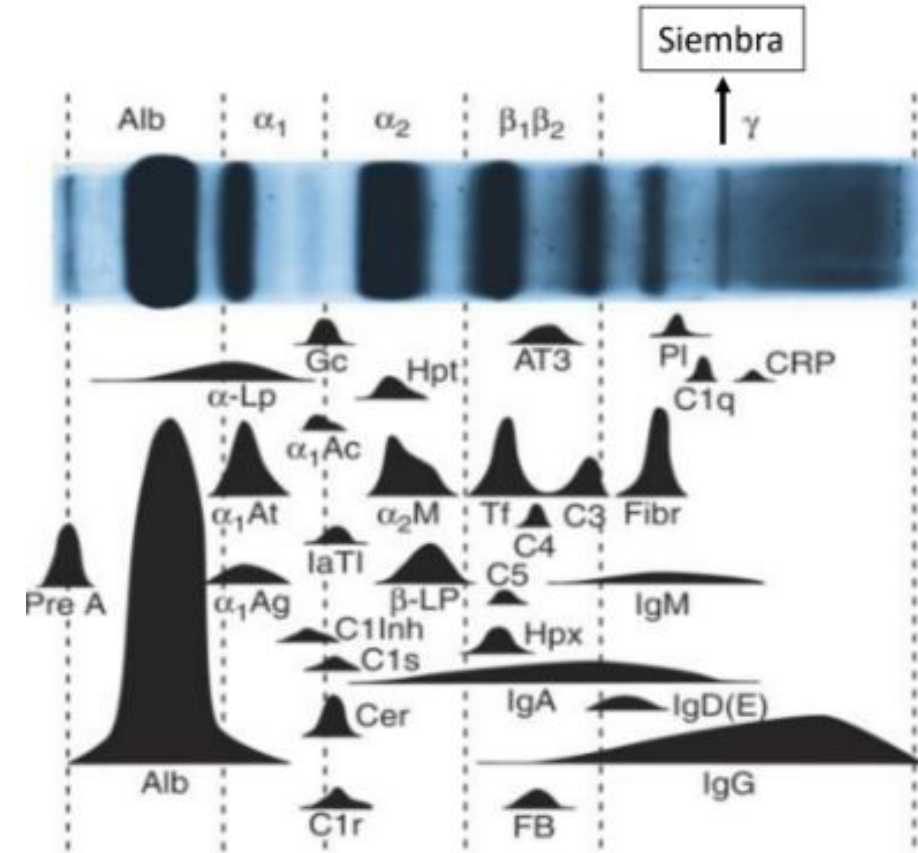
	Gel de agarosa	Electroforesis capilar
<i>Soporte</i>	Sólido (gel + buffer)	Líquido (buffer)
<i>Voltaje</i>	200 V (corre del cátodo al ánodo)	10000 V (corre del ánodo al cátodo)
<i>Coloración</i>	Si	No
<i>Detector</i>	Densitómetro (densitometría de las fracciones coloreadas)	Fotodetector (absorbancia del enlace peptídico a 200 o 214 nm)
<i>Medida del perfil electroforético</i>	Densitometría	Espectrofotometría
<i>Identificación del componente monoclonal (CM)</i>	Inmunofijación	Inmunosustracción
<i>Límite de detección</i>	~ 40 mg/dL	~30 mg/dL
<i>Exactitud diagnóstica para detectar componente monoclonal</i>	Menos sensible (91%) y más específica	Más sensible (95%) y menos específica

Las **limitaciones** del **gel de agarosa** están dadas principalmente por la capacidad de tinción de las proteínas y la sensibilidad del colorante; en la **electroforesis capilar**, por la absorción a 200 nm de moléculas distintas a las proteínas séricas (Ej.: medios de contraste, algunos antibióticos).

Electroforesis de proteínas séricas

En el Pxé las proteínas séricas están sometidas a un campo eléctrico, la separación se produce en función de su migración diferencial, como producto se obtienen diferentes fracciones proteicas constituidas por una o un conjunto de proteínas.

La separación se da por una compleja relación “densidad de carga/masa”: como ej., en gel de agarosa, α_2 macroglobulina con PM ~ 800.000 Da migra en zona α_2 , mientras que las inmunoglobulinas (Igs), con PM entre 150.000 y 900.000 Da, son más sensibles al efecto electroendosmótico y migran pos siembra de la muestra (zona γ y globulinas).



Efecto electroendosmótico: consiste en el flujo del buffer contrario al movimiento electroforético. Se produce por los grupos con carga negativa que presentan los soportes sólidos y la superficie interior de los capilares. Al aplicar un campo eléctrico estos grupos, al estar unidos, no pueden desplazarse hacia el electrodo positivo, sin embargo los contraiones con carga positiva que los rodean se mueven hacia el electrodo negativo y arrastran con ellos el buffer.

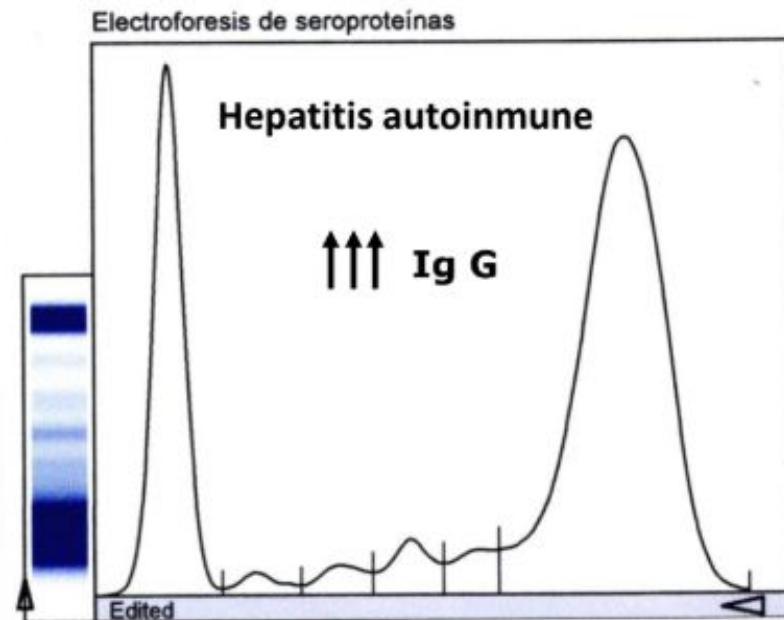
Consideraciones generales del PxE

- **En ausencia de enfermedad, el proteinograma sérico muestra un perfil con una relación entre las distintas fracciones proteicas que se mantienen más o menos constantes.**
- **Alteraciones en este perfil electroforético normal pueden asociarse a una gran variedad de enfermedades y/o condiciones fisiológicas.**
- **Por esta razón, el proteinograma sérico es una herramienta de utilidad en la evaluación del estado general del paciente y fundamental, en el diagnóstico y seguimiento de patologías específicas.**

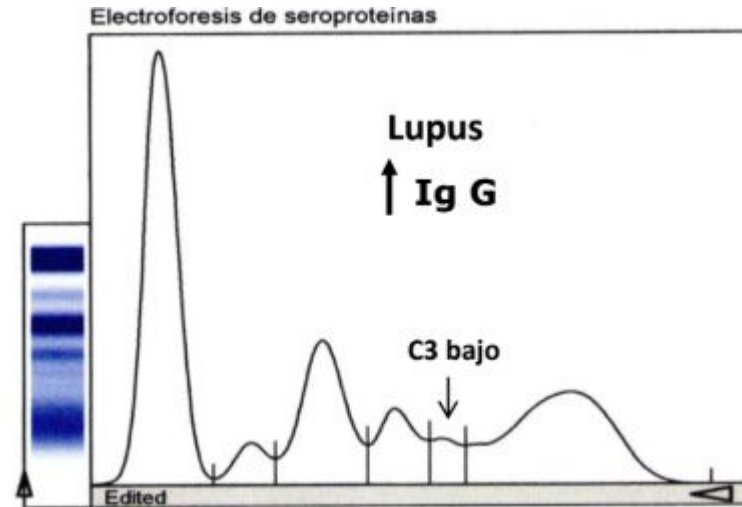
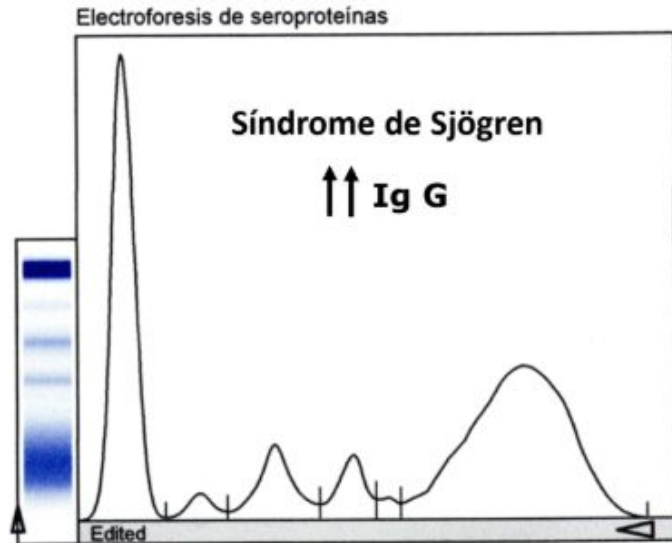
Hipergammaglobulinemia policlonal

Es el incremento de la zona y debido a una producción de Igs policlonales ($>1,80$ g/dL).

La zona y se observa difusa, intensamente coloreada, ensanchada y generalmente simétrica.



Hipergammaglobulinemia policlonal



No necesita ser corroborada con la cuantificación de las Igs, salvo en los casos en donde la concentración de una Ig en particular forme parte de algún criterio diagnóstico o de clasificación (Ej.: IgG en hepatitis autoinmune)

Hipogammaglobulinemia

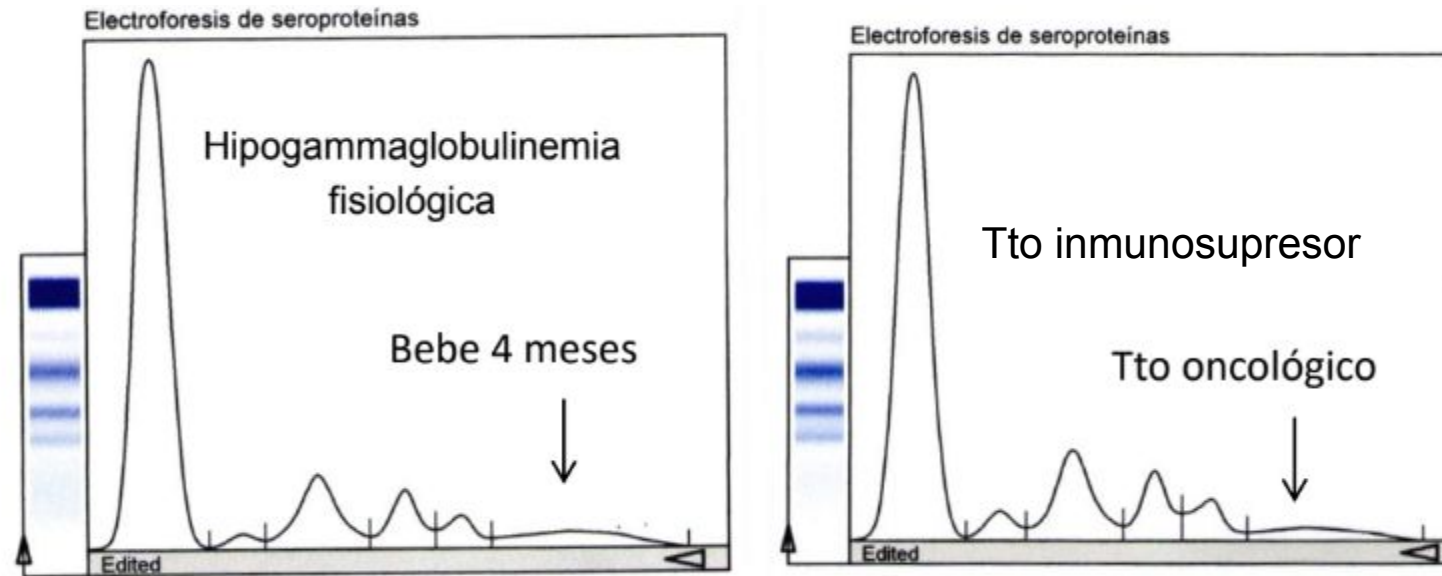
Disminución de la fracción gammaglobulinas ($<0,6$ g/dL)

Esta condición debe ser documentada por la **cuantificación de IgG, IgA e IgM en suero**

Causas:

- ☐ Fisiológica (entre 3-6 meses de vida)
- ☐ Transitoria de la infancia (hasta los dos años de vida)
- ☐ Inmunodeficiencias primarias
- ☐ Secundarias

Hipogammaglobulinemia



- Asociadas a mala absorción o pérdida de proteínas (renal o gastrointestinal)
- Asociadas a GM:

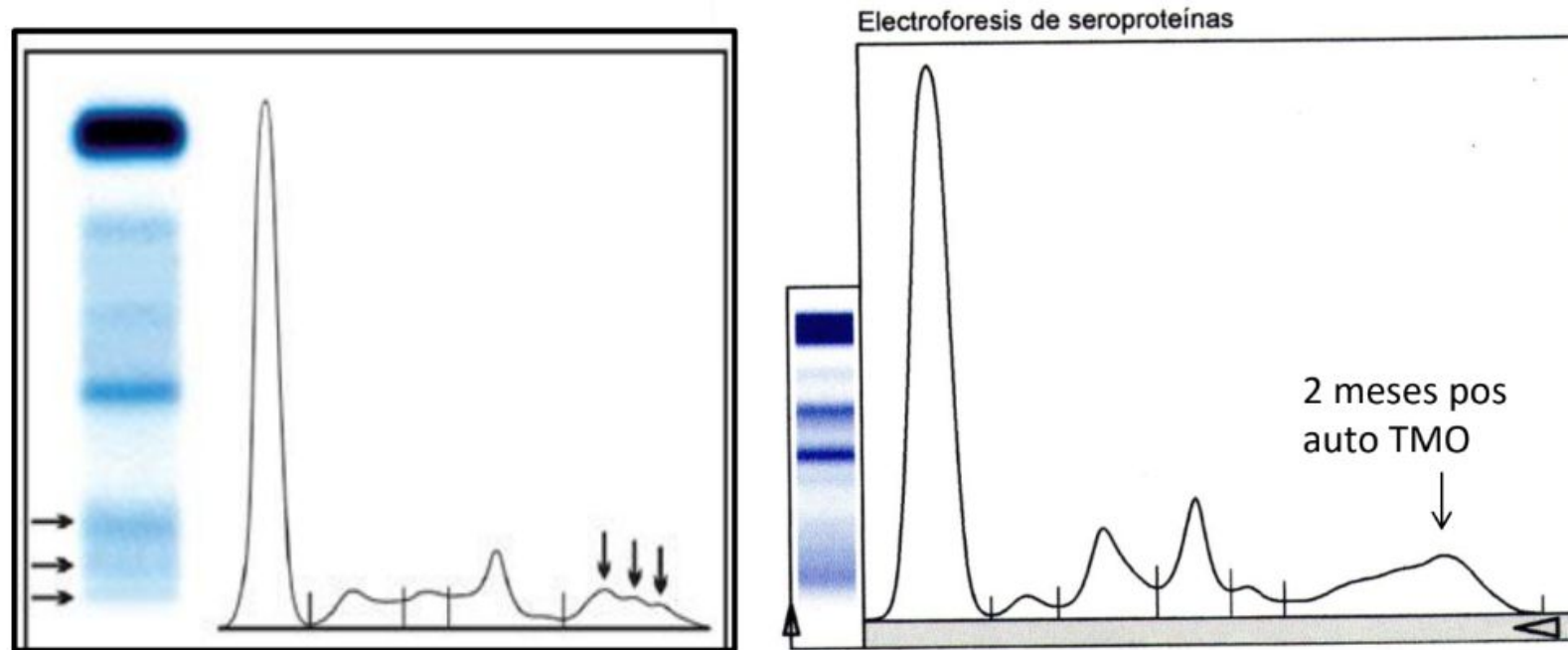
-20% de pacientes con Amiloidosis AL

-10% de pacientes con MM (presencia de CLL)

Estos pacientes suelen presentarse con síndrome nefrótico

En todo paciente adulto que se evidencie una hipogammaglobulinemia sin causa aparente se debe realizar pesquisa para GM en suero y orina

Bandas oligoclonales / Asimetría



varias bandas o como una zona de mayor condensación en zona g globulinas

- Observadas en algunas infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes, VIH
- Frecuentes en pacientes con GM pos tratamiento auto Tx de MO

-Sugerir repetir la determinación en 6 meses (según clínica) o control periódico
-Indicar realizar IF para caracterizar y cuantificar Igs

Proteínas de fase aguda

Proteínas cuya concentración cambia durante la inflamación (cirugías, infartos, infecciones, quemaduras, tumores, etc.)

Síntesis hepática gatillada por acción de IL6, IL1 y TNF- α , secretadas por monocitos y macrófagos

POSITIVAS (aumentan): proteína C reactiva, complemento (C3 y C4), fibrinógeno, procalcitonina, alfa 1 glicoproteína ácida, alfa 1 antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, amiloide A del suero, etc.

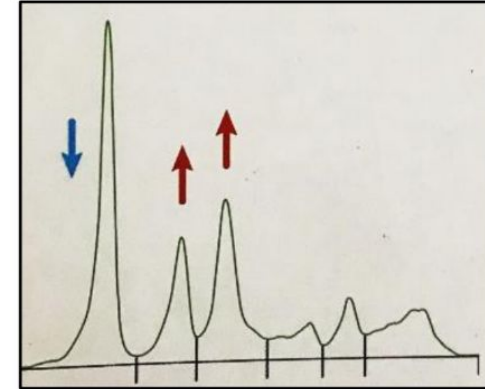
NEGATIVAS (disminuyen): albúmina, prealbúmina y transferrina.

Proteínas de fase aguda

Secuencia de aparición:

1ras horas:

- PCR
- Procalcitonina
- Amiloide A del suero
- α_1 antitripsina



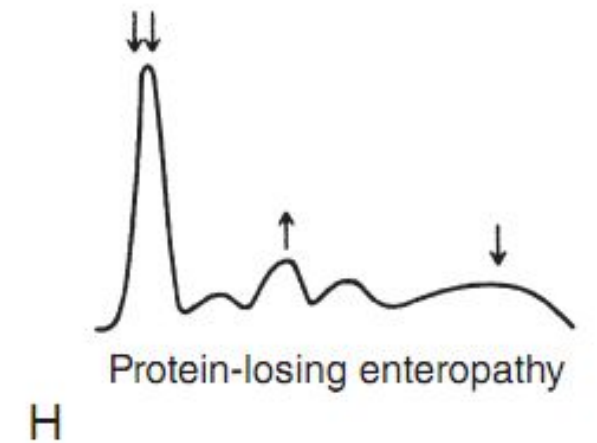
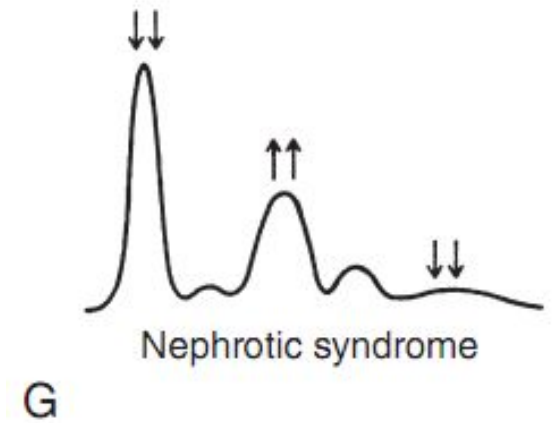
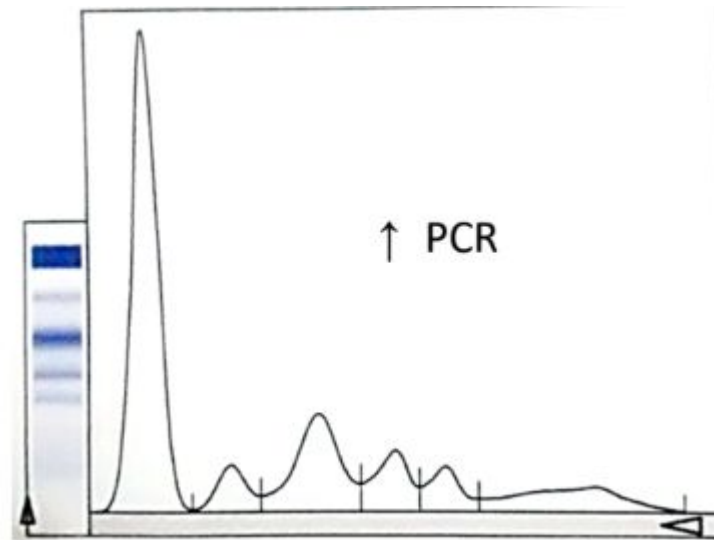
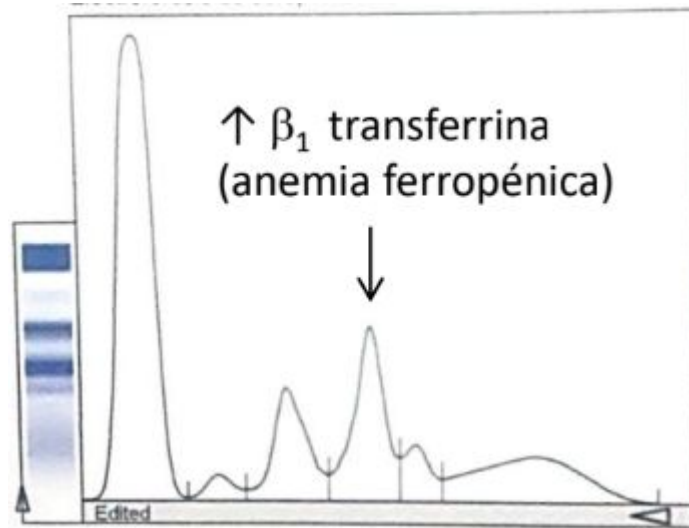
24 horas:

- α_1 glicoproteína ácida
- α_1 antitripsina
- α_2 macroglobulina
- α_2 haptoglobina
- Fibrinógeno
- C4

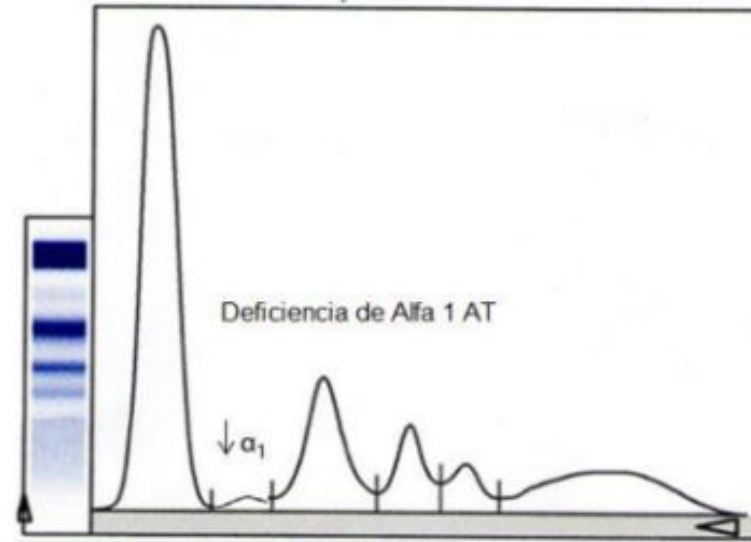
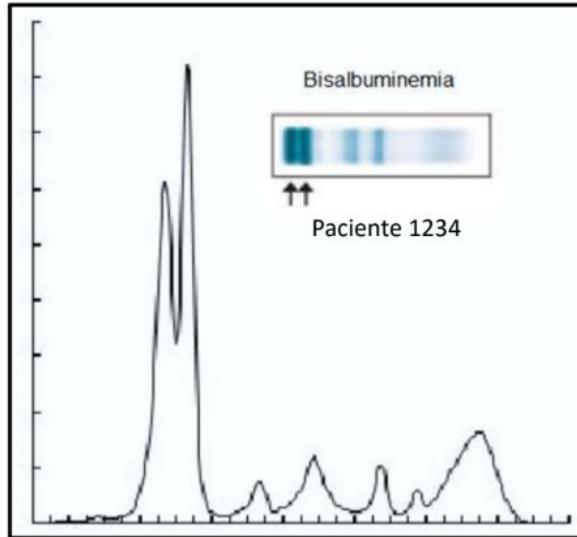
3 días:

- Ceruloplasmina
- Complemente C3

Otras situaciones



Albúmina y zona alfa globulinas



La diferencia es debida a α_1 - glicoproteína ácida. Es una proteína de fase aguda con alto contenido de ácido siálico, lo que le confiere poca afinidad por el colorante.

Proteinograma por electroforesis sérico

En la actualidad la principal utilidad del PxE es la **pesquisa y seguimiento de pacientes con gammopatías monoclonales (GM)**.

Si bien esta afirmación es mencionada en la mayoría de las publicaciones científicas sobre el tema, en nuestro medio es considerado una **valiosa herramienta en distintas condiciones clínico-patológicas: estados inflamatorios agudos y crónicos, hipergammaglobulinemia policlonal, síndrome nefrótico, entre otros**.

En el PxE se considera indicativo de GM el hallazgo de:

- Una banda homogénea adicional
- Hipogammaglobulinemia sin causa
- Aumento de las fracciones α_2 , β_1 o β_2
- Borramiento de la herradura entre fracciones
- Presencia de una banda homogénea en zona γ

**Verdadero
positivo**

**Falsos
positivos**

**Falsos
negativos**

**Proteína Monoclonal
Asociada a GM**

**Proteínas no Ig
que producen
banda
homogénea:**

- Fibrinógeno
- Transferrina
- PCR
- Otros

**Proteína
monoclonal no
asociada a GM:**

- Inf. Virales
(Ej.: CMV, HIV)

**Proteína Monoclonal
NO detectada
en el PxE:**

- Co-migración
- Concentración inferior
al límite de detección
- Banda difusa

Una proteína monoclonal es una Ig secretada por un clon anormal de células plasmáticas o por linfoplasmocitos lo cual puede producir una **hipergammaglobulinemia monoclonal**

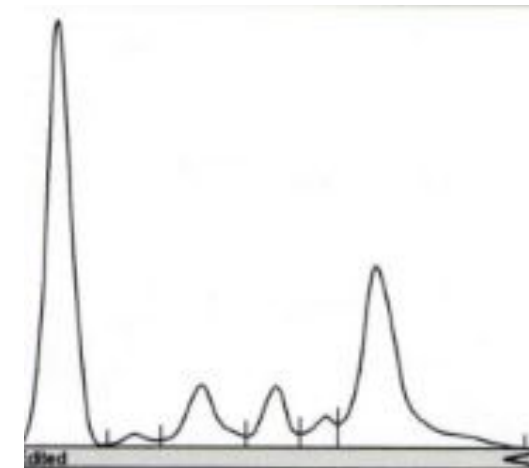
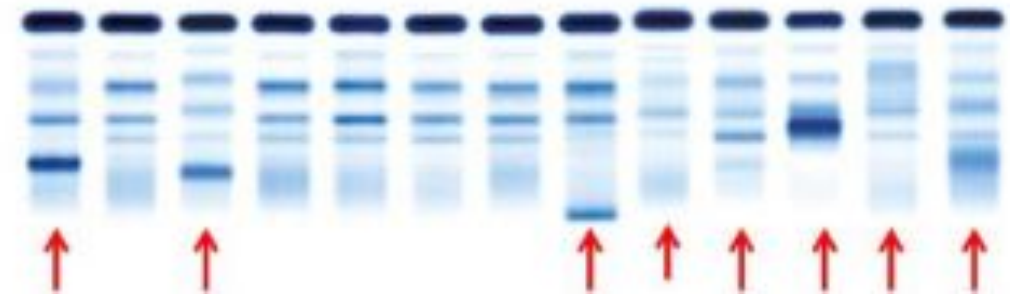
Gammapatías Monoclonales

- ★ Las **GM** son un conjunto de entidades clínicas caracterizadas por la **proliferación de células plasmáticas clonales que secretan inmunoglobulinas monoclonales** que generalmente pueden ser detectadas en suero u orina.
- ★ La **proteína monoclonal** puede consistir de moléculas de Igs intactas, cadenas livianas libres o cadenas pesadas.
- ★ La detección, caracterización y cuantificación del CM, es de utilidad tanto al **diagnóstico** como en el **monitoreo** de la respuesta al tratamiento.
- ★ Las GM representan el 1% de todos los cánceres y el 10% de los cánceres hematológicos.

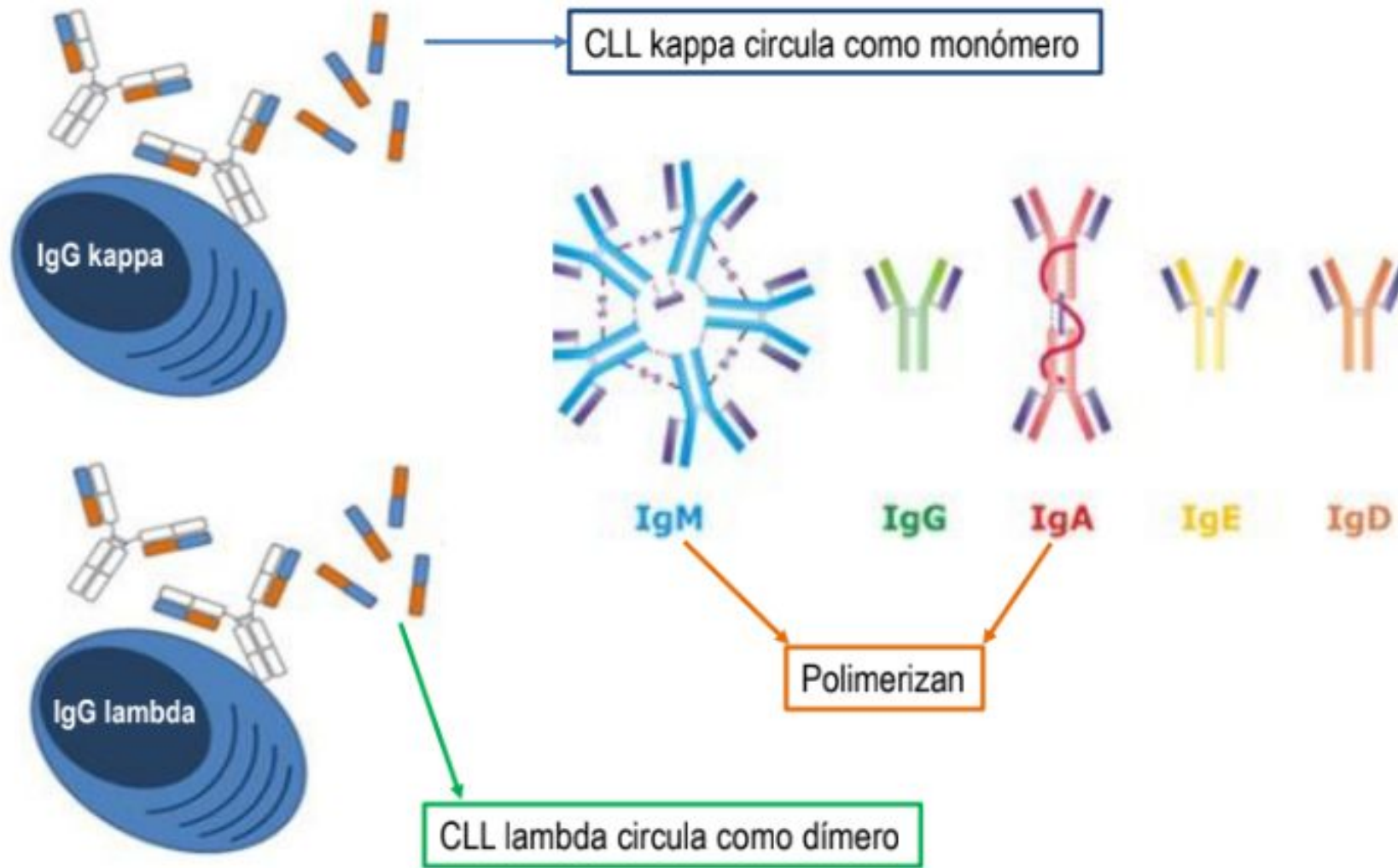
Bandas homogéneas en el PxE

La banda homogénea pesquisada en el PxE debe ser caracterizada para confirmar el hallazgo de una proteína monoclonal y así poder ser denominada como Componente Monoclonal (CM).

La ubicación de la banda en el PxE puede orientar sobre la clase de Ig; la caracterización sólo se realiza con antisueros específicos para poder identificar la Ig involucrada.

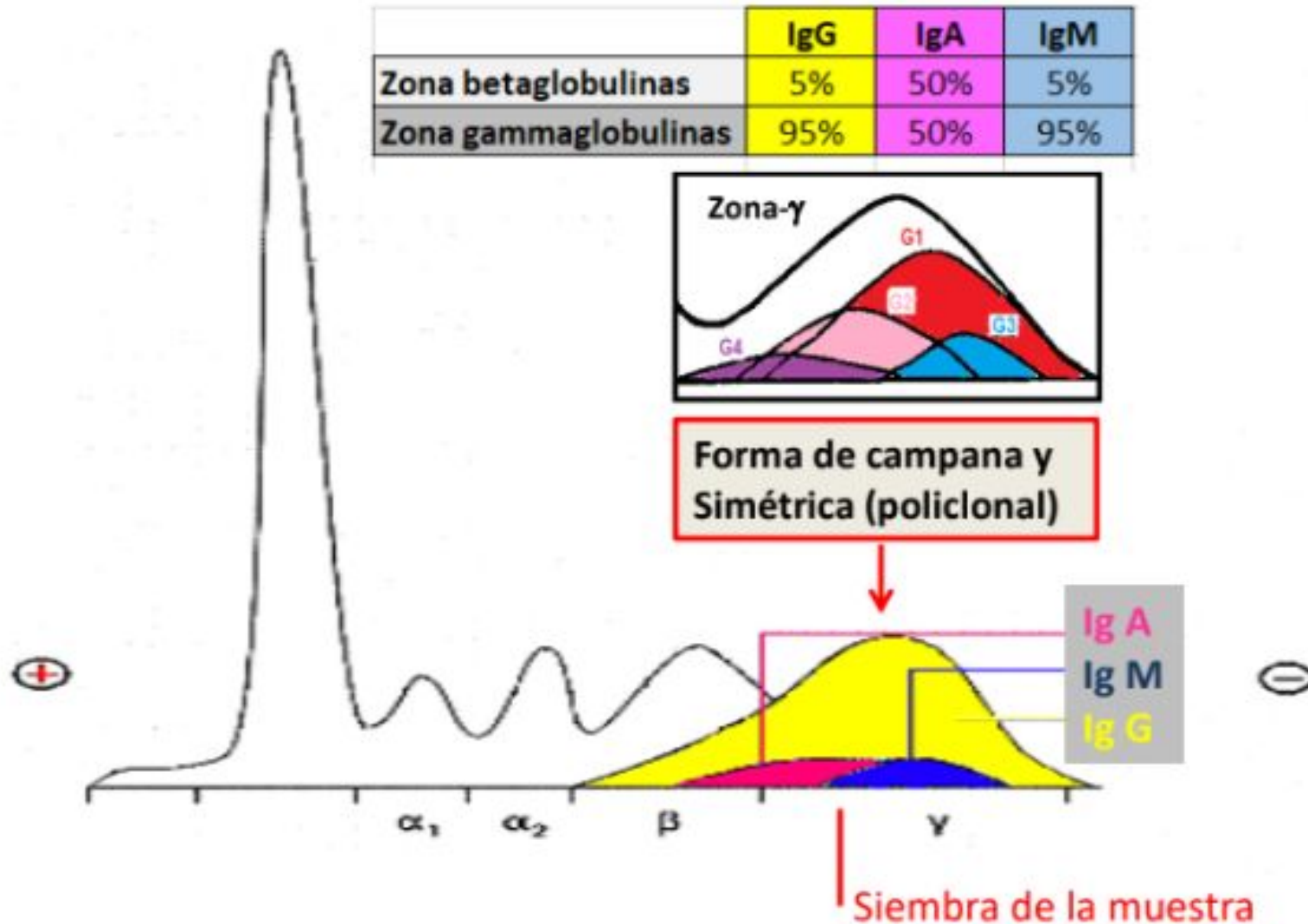


Síntesis de Inmunoglobulinas



Las cadenas livianas (CL) se secretan en exceso (40% en exceso) para asegurar la unión con la cadena pesada. La CL que compone la Ig completa se denomina **CL unida**, la no unida se denomina **cadena liviana libre (CLL)**.

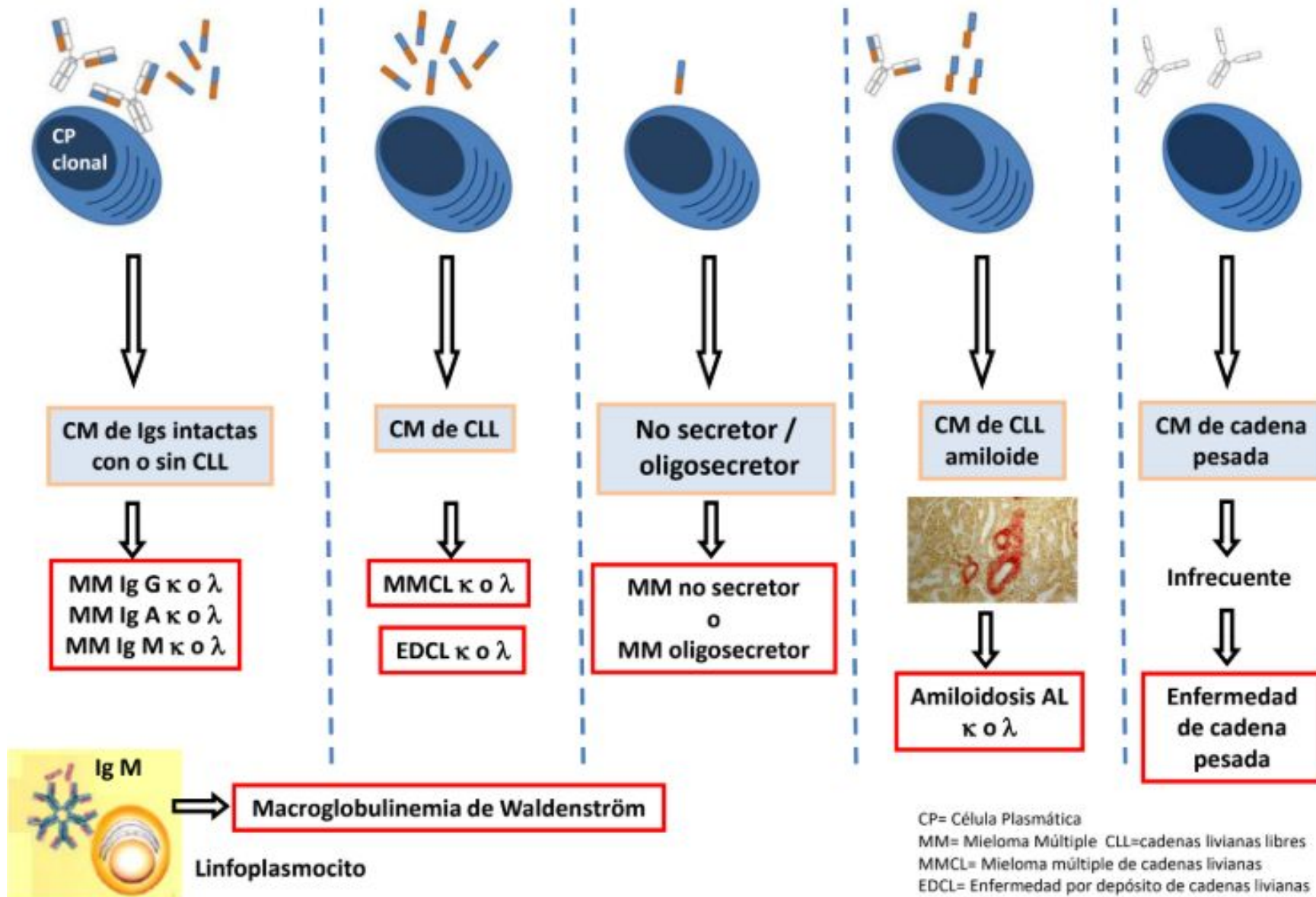
Evaluación de la zona gammaglobulinas



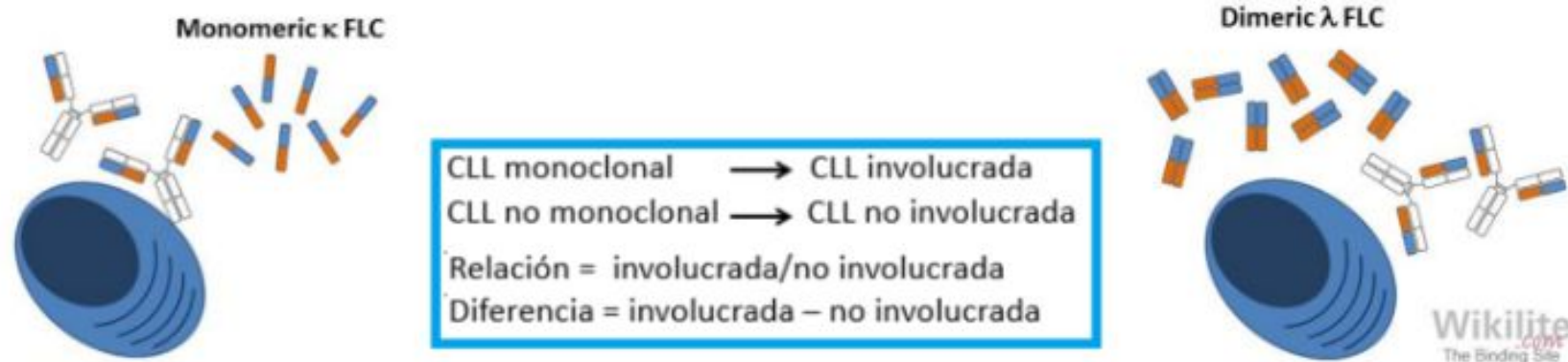
Debido a la baja concentración sérica, la IgE, IgD y CLL no inciden en la fracción gammaglobulinas.

La subclase IgG4 es la más rápida de las inmunoglobulinas (g rápida).

Síntesis de proteína monoclonal



Cadenas livianas libres: Biomarcador tumoral



Katzmann et. *Al Clin Chem* 2002;48: 1437-1444

Valores de referencia para CLL κ y λ Suero

- Kappa libre: 3,3 – 19,6 mg/L
- Lambda libre: 5,6 – 26,3 mg/L

▪ **Relación κ/λ : 0,26 – 1,65 (rango diagnóstico)**

(relaciones κ/λ fuera del rango diagnóstico indican monoclonalidad: por debajo monoclonal λ , por encima monoclonal κ)

PM: 23 Kda

Vida media: 2–4 horas (kappa) / 3–6 hs (lambda)

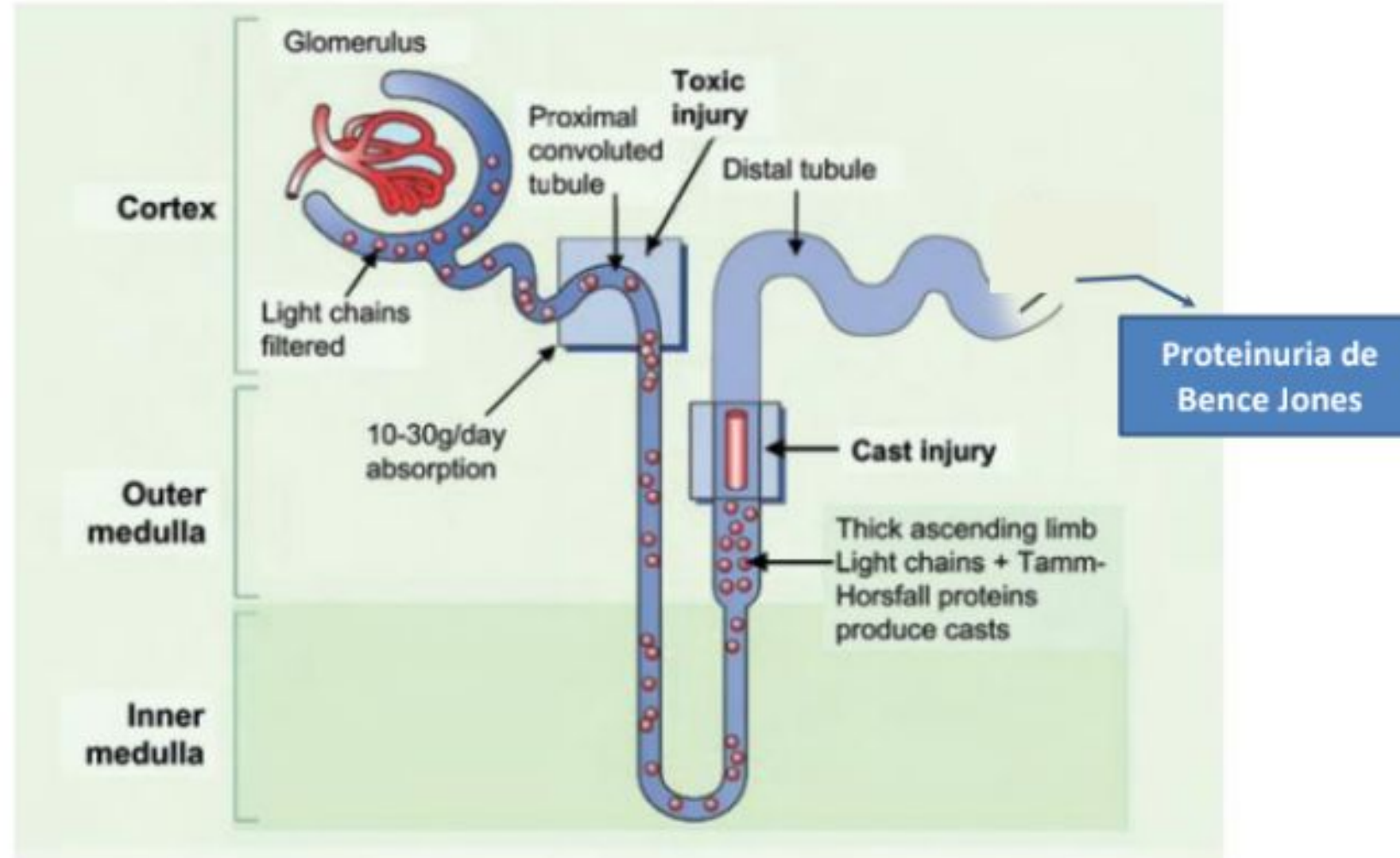
En circulación hay mayor cantidad de CLL lambda (dimérica) con respecto a kappa (monomérica). La concentración plasmática depende de la producción por el tumor y de la función renal.



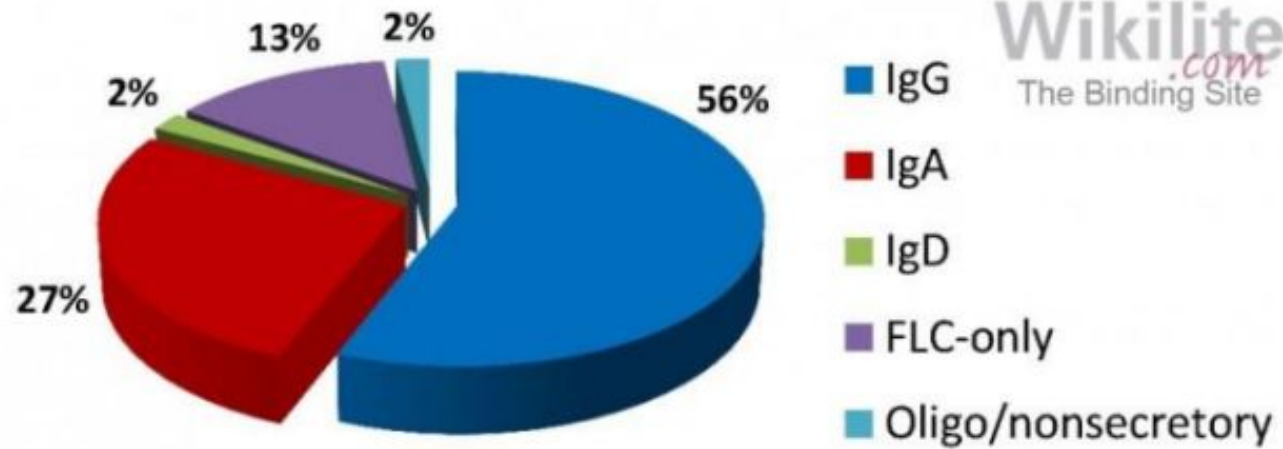
Clearence renal de Cadenas livianas libres

Las CLL filtran libremente por el glomérulo y se reabsorben en el túbulo contorneado proximal (pasan a formar parte del pool de aa). Cuando la síntesis de CLL excede 10-30 g/día (más de 30 veces lo normal) se produce “proteinuria por sobrecarga” (Overflow); en este caso proteinuria de Bence Jones.

A.R. Bradwell 2008.
The Binding Site 5th edition.



Mieloma Múltiple (MM)



IgE $\Rightarrow$ 0,1% de todos los mielomas
(64 casos publicados en la literatura desde 1967 a 2017)

IgM $\Rightarrow$ 0,5%

Criterio diagnóstico para MM

Panel: Revised International Myeloma Working Group diagnostic criteria for multiple myeloma and smouldering multiple myeloma

Definition of multiple myeloma

Clonal bone marrow plasma cells $\geq 10\%$ or biopsy-proven bony or extramedullary plasmacytoma* and any one or more of the following myeloma defining events:

- Myeloma defining events:
 - Evidence of end organ damage that can be attributed to the underlying plasma cell proliferative disorder, specifically:
 - Hypercalcaemia: serum calcium >0.25 mmol/L (>1 mg/dL) higher than the upper limit of normal or >2.75 mmol/L (>11 mg/dL)
 - Renal insufficiency: creatinine clearance <40 mL per min† or serum creatinine >177 μ mol/L (>2 mg/dL)
 - Anaemia: haemoglobin value of >20 g/L below the lower limit of normal, or a haemoglobin value <100 g/L
 - Bone lesions: one or more osteolytic lesions on skeletal radiography, CT, or PET-CT‡
 - Any one or more of the following biomarkers of malignancy:
 - Clonal bone marrow plasma cell percentage* $\geq 60\%$
 - Involved:uninvolved serum free light chain ratio ≥ 100
 - >1 focal lesions on MRI studies¶



Significado de CRAB-SLiM

HiperCalcemia: > 11 mg/dL

Insuf. Renal: ClCr <40 mL/min o Cr > 2 mg/dL

Anemia: Hb < 10 mg/dL

Bone: 1 o más lesiones osteolíticas

S (Sixty)

Li (Free Light Chain)

M (MRI)

Pesquisa, caracterización y cuantificación de la proteína monoclonal

✓ Pesquisa de banda homogénea

Proteinograma por Electroforesis

- Gel de Agarosa
- Electroforesis capilar

✓ Caracterización de la banda homogénea ¿es una proteína monoclonal?

- Inmunofijación (detección positiva)
- Inmunosustracción (detección negativa)

✓ Cuantificación de la proteína monoclonal

- Integración del CM
- Inmunoturbidimetría / Nefelometría: Igs y CLL
- Proteinograma urinario + Inmunofijación (cuantificación del CM en orina)

Pesquisa de una proteína monoclonal

Se puede realizar:

Observando una banda homogénea en el PxE (suero) o en el Uroproteinograma (orina), luego caracterizando dicha banda con IF o inmunosustracción (con la identificación se confirma que es una proteína monoclonal) .

Cuando el CM co-migra con las fracciones habituales del PxE, cuando es de baja concentración, en PxE con hipogammaglobulinemia, en PxE de pacientes con síndrome nefrótico, cuando el PxE es normal pero hay altas sospechas de una GM: en todos los casos mencionados la pesquisa se realiza solicitando IF (suero y orina) y cuantificación de CLL.

En el MM no secretor (<1% de los MM), las células plasmáticas son incapaces de secretar o producir Igs. En estos pacientes hay ausencia de CM en el PxE e IF negativa, tanto en suero como en orina, asimismo, la relación de CLL k/l es normal. En la mayoría de los casos se puede demostrar la presencia de la proteína monoclonal en el citoplasma de las células plasmáticas.

Utilidad de pesquisar una proteína monoclonal

En las guías del International Myeloma Working Group (IMWG) se define lo que se considera “enfermedad medible”, lo cual hace referencia a la cantidad de proteína monoclonal cuantificable con un determinado CV%, con el fin de lograr reproducibilidad en las sucesivas mediciones (Ej.: CM sérico ≥ 1 g/dL; CM en orina ≥ 200 mg/24 hs; CLLi ≥ 100 mg/L con relación k/l anormal).

Cada GM tiene su recomendación diagnóstica, además de factores pronósticos, de seguimiento y tratamiento (guías del IMGW).

Determinaciones de la química clínica son de utilidad en la pesquisa y estadificación de estas patologías: VSG, proteinuria (albuminuria), NT-proBNP, creatininemia, hemoglobina, calcemia, b2-microglobulina y LDH. La cuantificación de las Igs no implicadas (Igs policlonales) es de importancia en el manejo clínico de los pacientes con GM; la disminución por debajo de una determinada concentración se denominada inmunoparesia.

Tanto la concentración del CM (integrado desde el proteinograma), concentración sérica de las Igs, IF en suero y orina, como la cuantificación de CLL, se emplean para el monitoreo de la enfermedad, como así también para la toma de decisiones terapéuticas.

Utilidad de la cuantificación de CLL

-La concentración de CLL en suero depende de la producción por la célula plasmática tumoral y de la función renal del paciente, pacientes con enfermedad renal crónica tienen un clearance renal de CLL disminuido con incremento sérico de dichas CL (se deben considerar valores de referencia para pacientes con deterioro de la función renal).

Sólo una determinada proporción de pacientes con MM a Ig completa (cadena pesada + CL) secretan CLL; podemos observar considerables bandas monoclonales de Ig completa con una concentración CLL normal (relación CLL k/l normal).

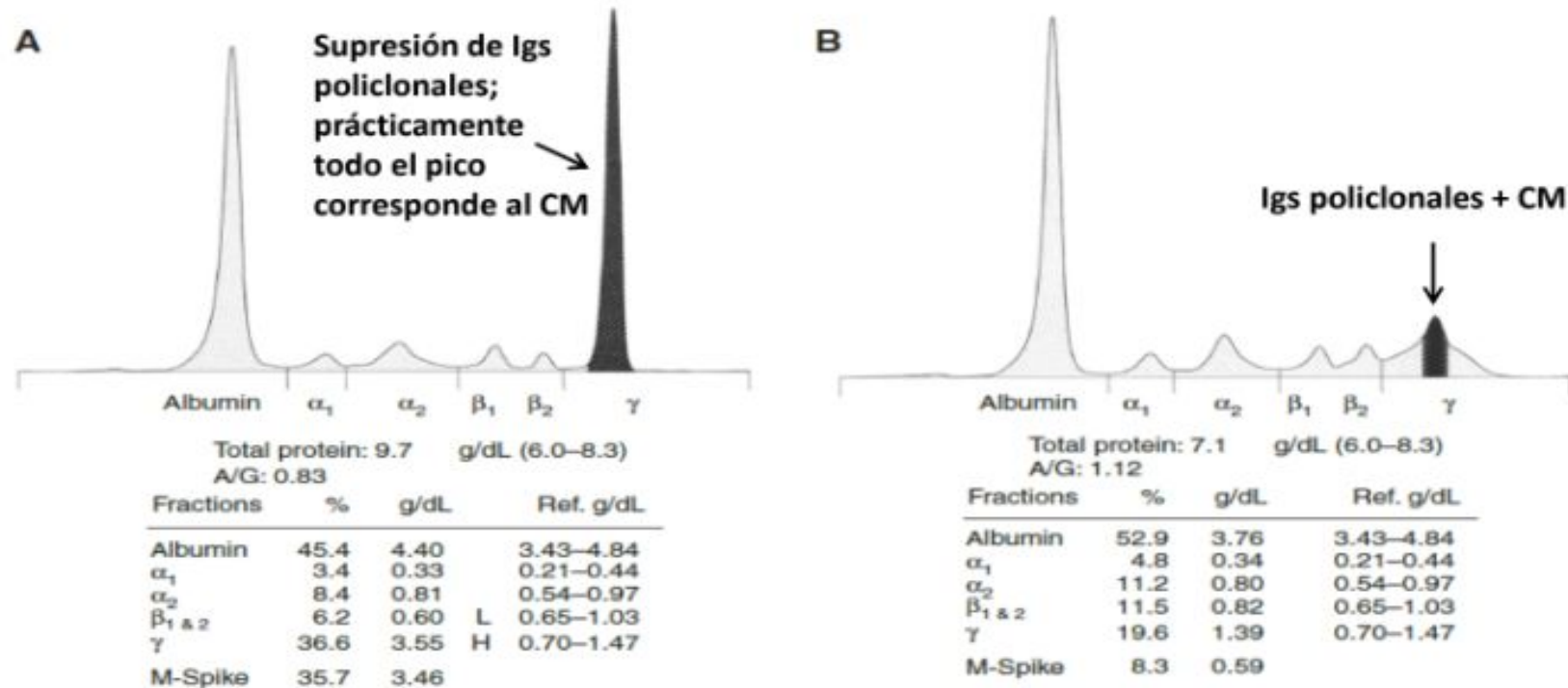
-Las hipergammaglobulinemias policlonales incrementan tanto CLL kappa como CLL lambda, por lo tanto la relación de CLL k/l permanece normal.

-La determinación de CLL en suero es de utilidad tanto para el diagnóstico como para el pronóstico y monitoreo de las GM, cobrando importancia en las GM de CLL (Amiloidosis, MM de CL) y en los MM oligosecretores.

-Los resultados obtenidos de CLL con reactivos de las distintas marcas comerciales actualmente disponibles no son intercambiables, por tal motivo, el seguimiento de la enfermedad se debe realizar con la misma marca de reactivo y en las mismas condiciones analíticas (ej.: igual plataforma analítica).

-Las recomendaciones de las guías del IMWG están basadas en el equipo Freelite® (The Binding Site).

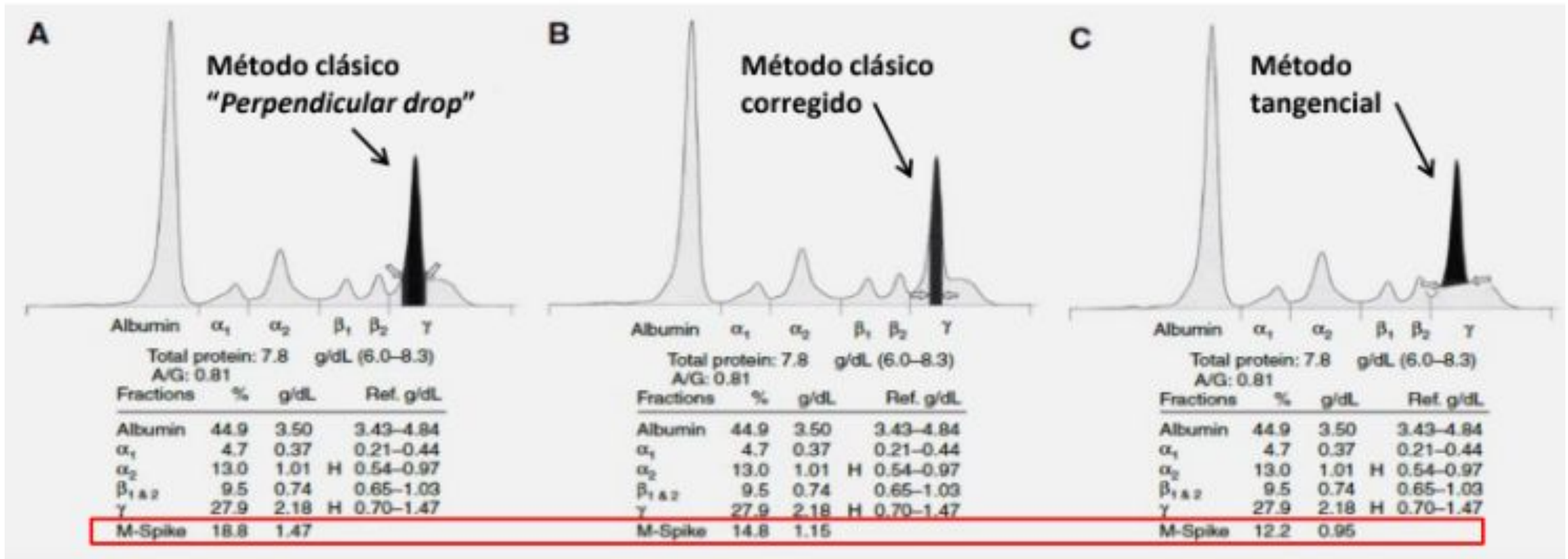
Método para cuantificar el CM



Clin Chem Lab Med 2016; aop. DOI 10.1515/cclm-2015-0862

El método más utilizado es el que **mide el tamaño del pico observado, por integración del área bajo la curva** del trazado densitométrico en los geles de agarosa o del electroferograma en la electroforesis capilar.

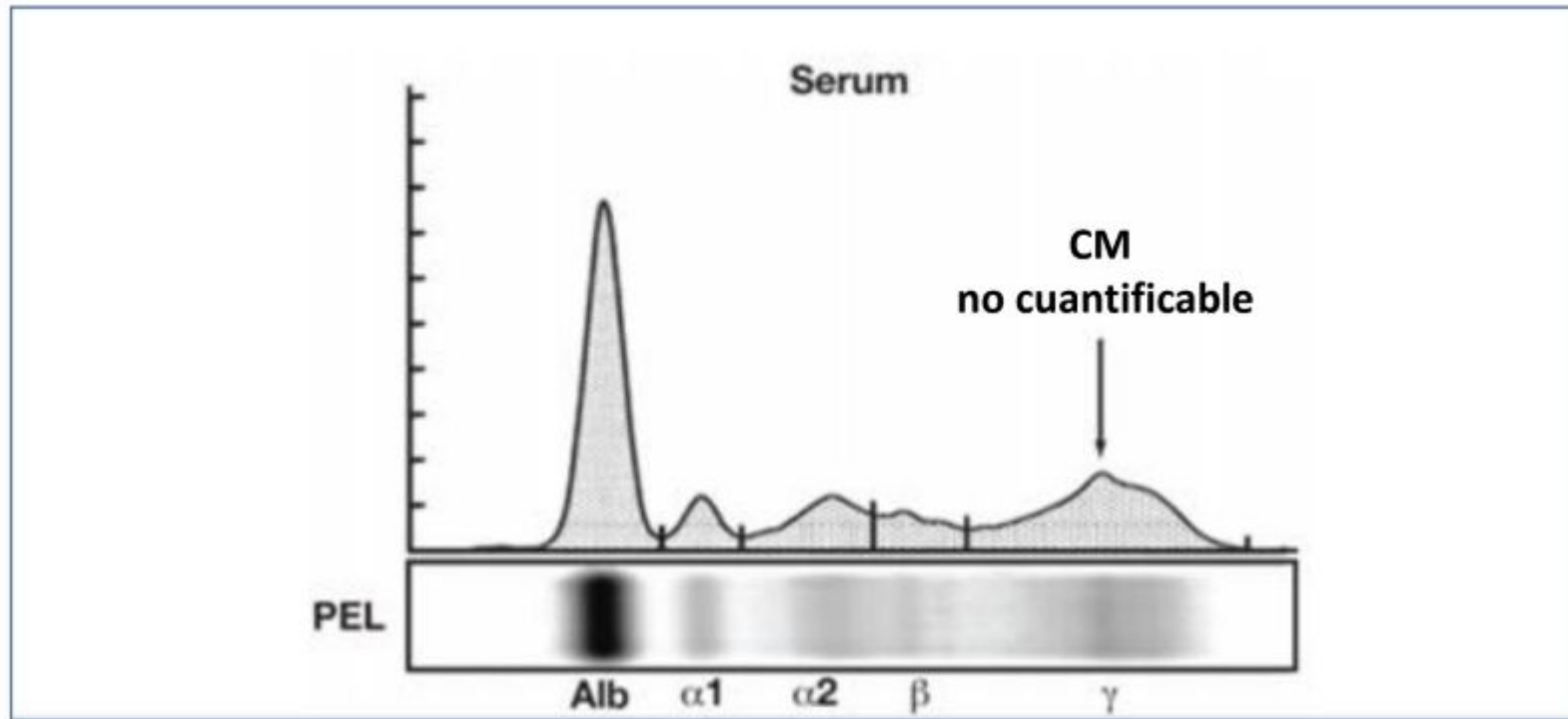
Método para cuantificar el CM



Clin Chem Lab Med 2016; aop. DOI 10.1515/cclm-2015-0862

El método de elección será **el de menor error en la medición**, considerando las Igs policlonales, y el que demuestre mejor desempeño analítico. Para **seguimiento** se recomienda **utilizar siempre el mismo procedimiento** (se deberá definir que es lo “medible” o “no medible”).

Cuantificación del CM



En los casos en donde no se pueda integrar el CM, se debería informar la presencia del mismo con una **leyenda** que haga referencia a la imposibilidad de cuantificación

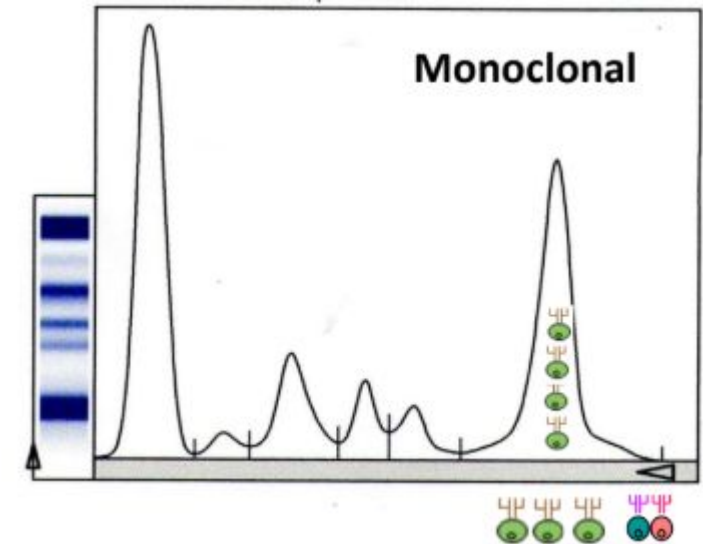
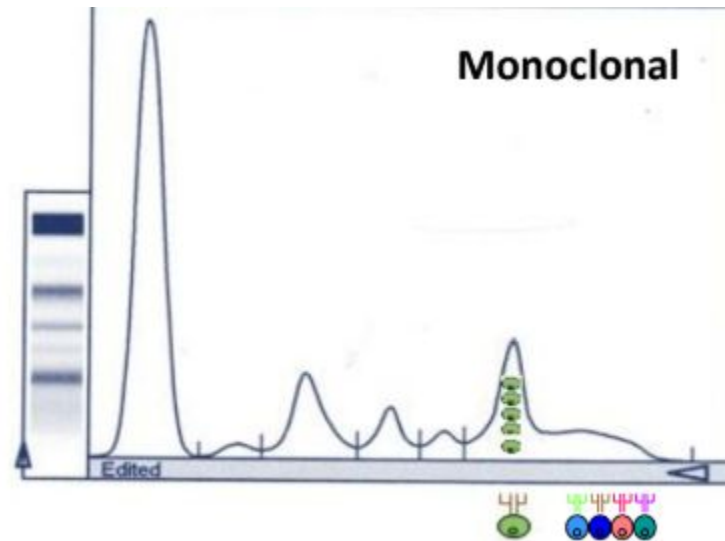
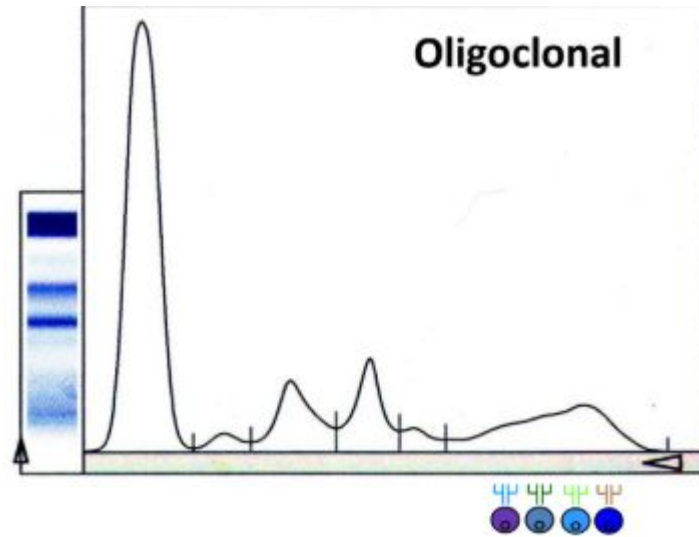
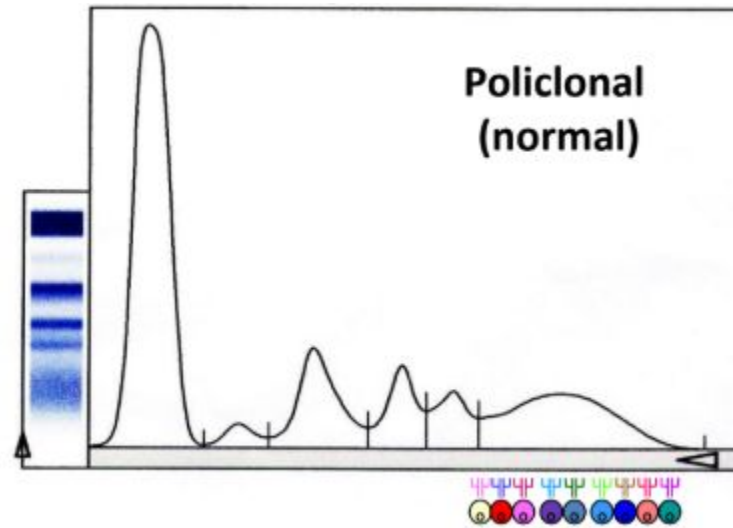
Una **fracción gammaglobulina asimétrica** puede ocultar un pequeño CM; se deben informar las asimetrías observadas en la fracción gammaglobulina.

Métodos para cuantificar la proteína monoclonal

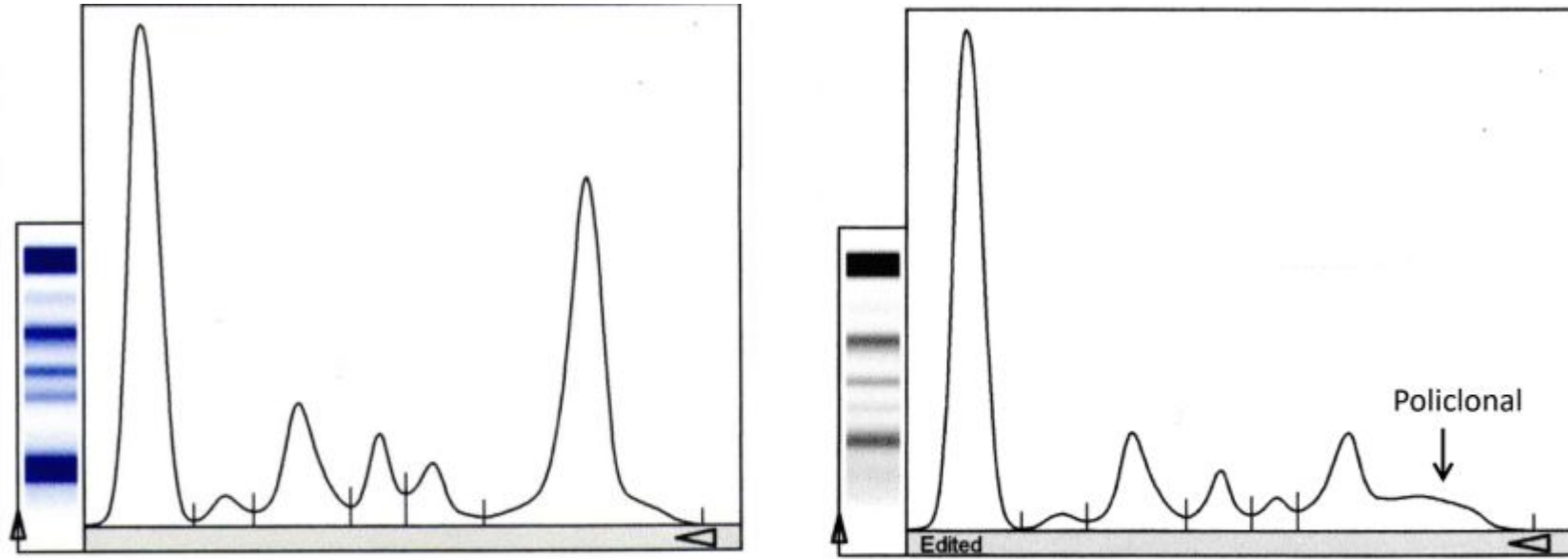
Ig Monoclonal	Método de cuantificación para seguimiento
Ig G	▪ Integración del CM (en gel de agarosa el colorante satura ~3000 mg/dL de IgG) ▪ Inmunoturbidimetría ▪ Nefelometría ▪ IDRS
Ig A	▪ Inmunoturbidimetría ▪ Nefelometría ▪ IDRS
Ig M*	▪ Integración del CM
CLL	▪ Inmunoturbidimetría / Nefelometría / ELISA ▪ Uroproteinograma + IF

* La concentración de Ig M monoclonal es sobreestimada en ~1,8 veces por cuantificación con métodos inmunoquímicos.

Alteraciones en la zona gamma (γ)

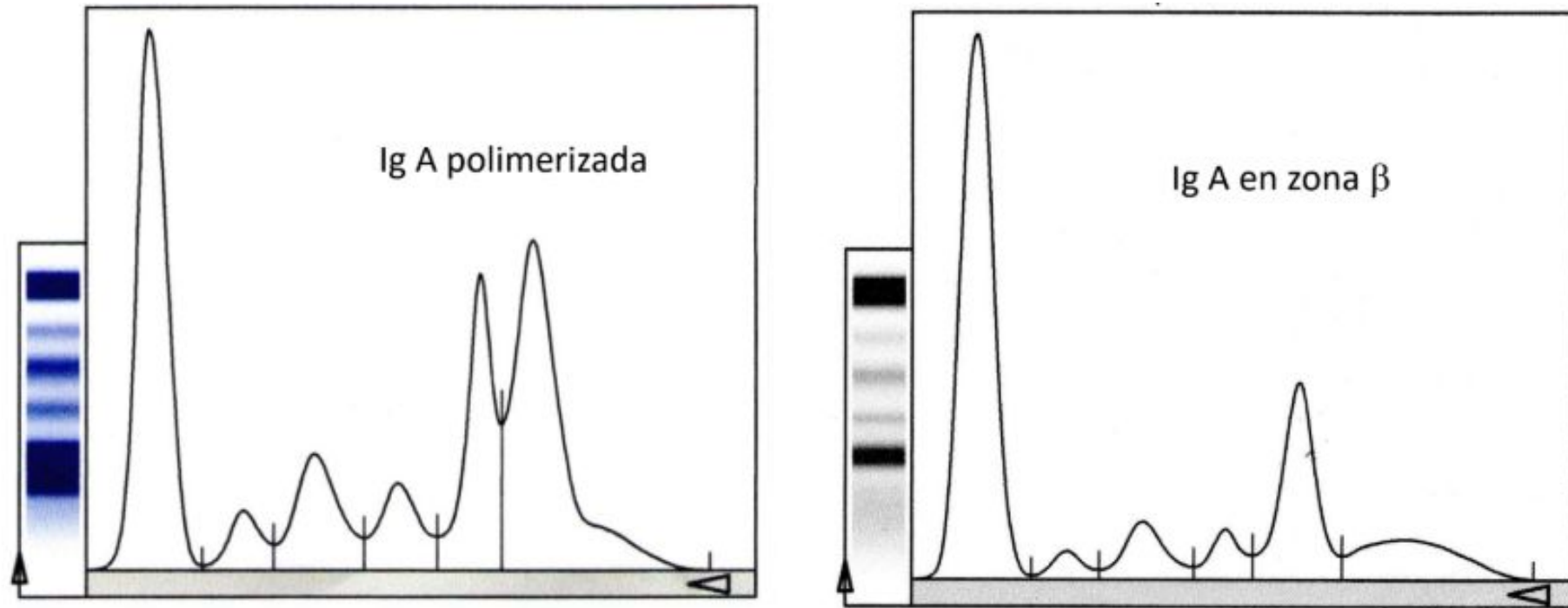


Banda monoclonal de IgG



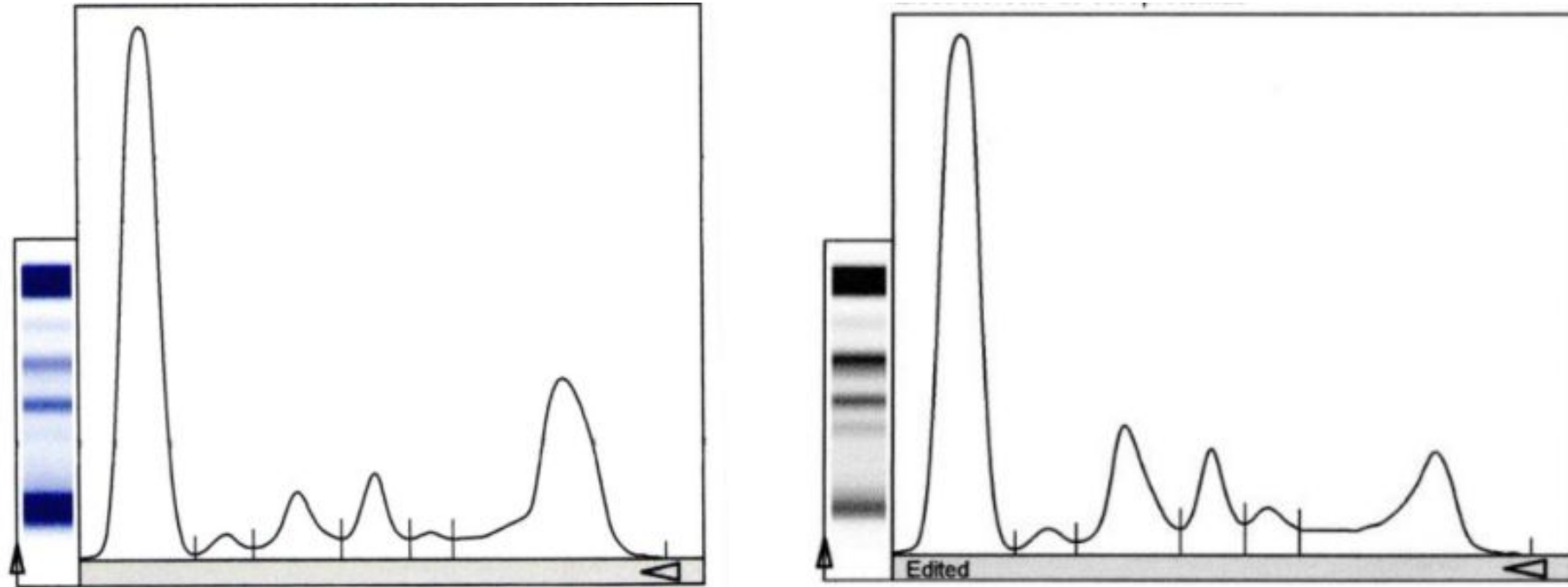
Ig G migra generalmente en zona γ , no polimeriza.

Banda monoclonal de IgA



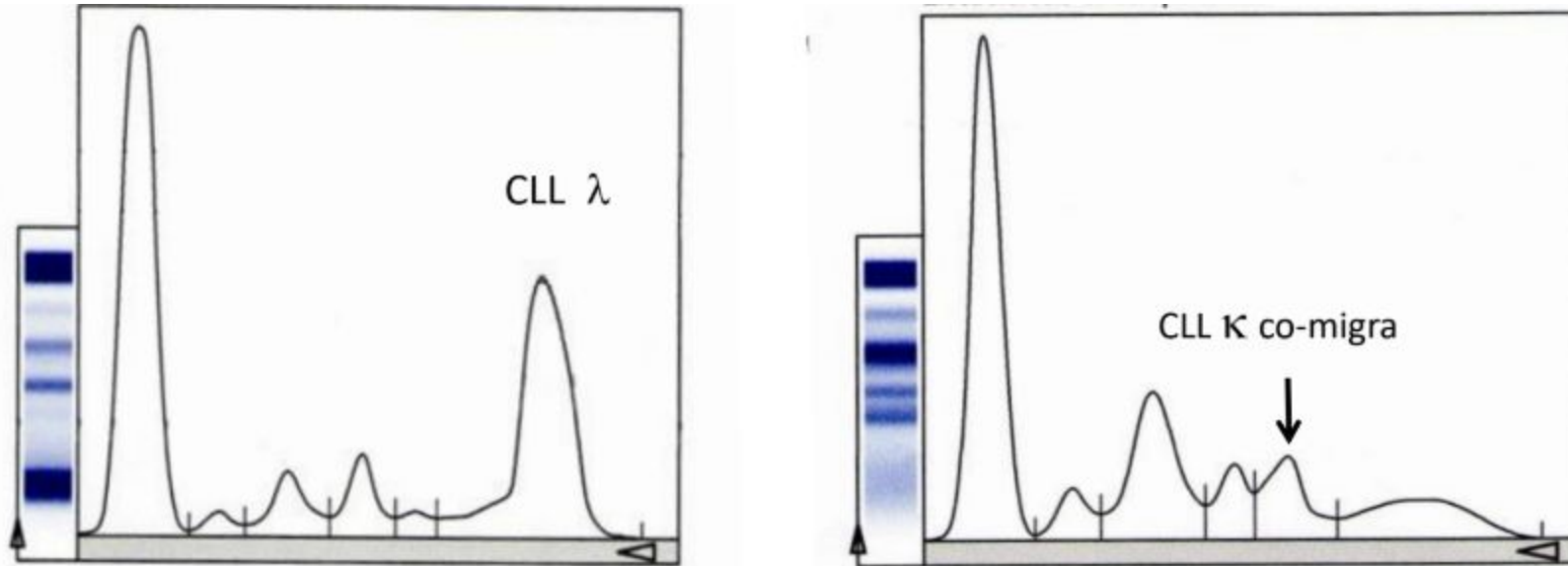
Ig A migra principalmente en la zona β_1 o β_2 . El 30% de las Ig A monoclonales pueden ocultarse en zona β (co-migran). IgA puede polimerizar lo cual generalmente da origen a dos picos.

Banda monoclonal de IgM



Ig M migra principalmente en la zona γ y pos γ . Puede polimerizar lo cual generalmente da origen a dos picos.

Banda monoclonal de CLL



Las CLL producen una banda monoclonal cuando están en altas concentraciones, ya sea por el aumento en la producción o por el deterioro de la función renal. En algunos casos co-migran, sin modificar las fracciones del PxE o se presentan con hipogammaglobulinemia.

Localización del CM

En una cohorte de 1027 pacientes, diagnosticados con MM, la movilidad del CM tuvo la siguiente localización:

- 54% en γ
- 12% en β - γ
- 13% en β
- 1% en α_2

Se observó:

- 2% biclonalidad
- 8% hipogammaglobulinemia

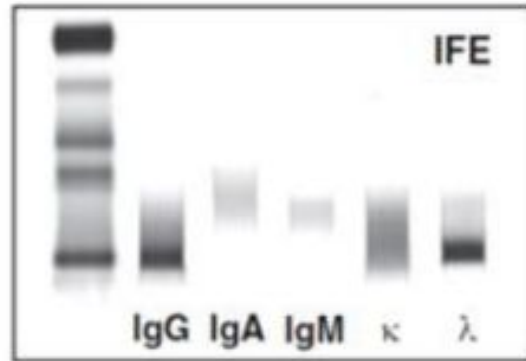
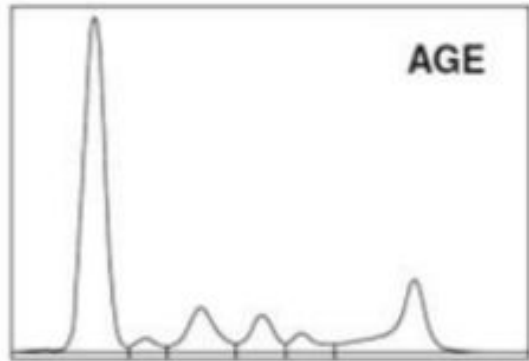
—> **El CM migra entre α_2 y γ globulinas**

—> En 11% de nuevos casos de MM se observó un CM a pesar de que todas las fracciones y las Igs estuvieron dentro del valor de referencia

Caracterización de la proteína monoclonal

Identificación en geles de agarosa

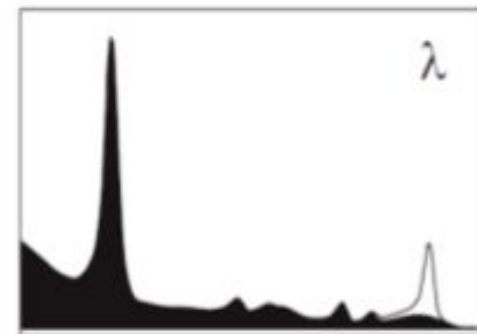
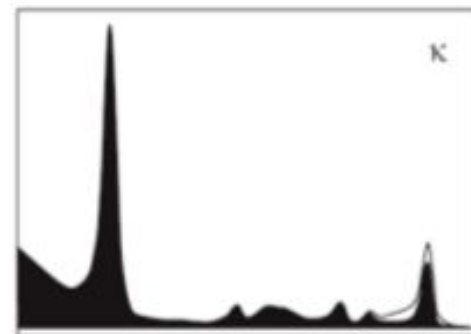
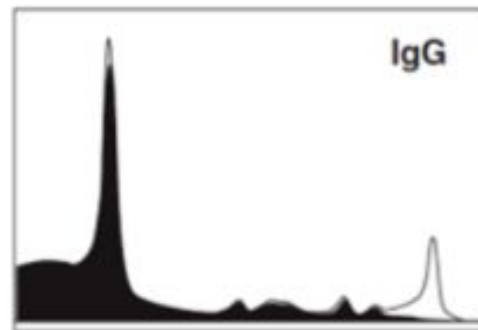
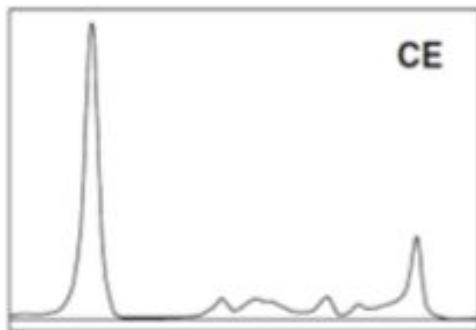
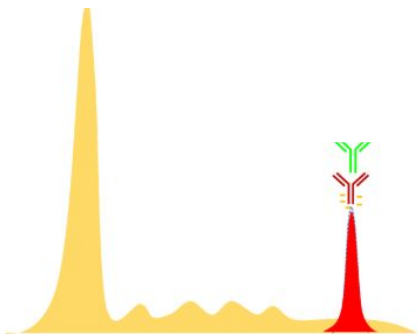
Inmunofijación (IF) → *Identificación positiva*



Método más difundido y utilizados en el laboratorio clínico (método recomendado)

Identificación en electroforesis capilar (“Immunotyping”)

Inmunosustracción → *Identificación negativa*



Principio de la técnica



Inmunoglobulina
del suero



Antisuero

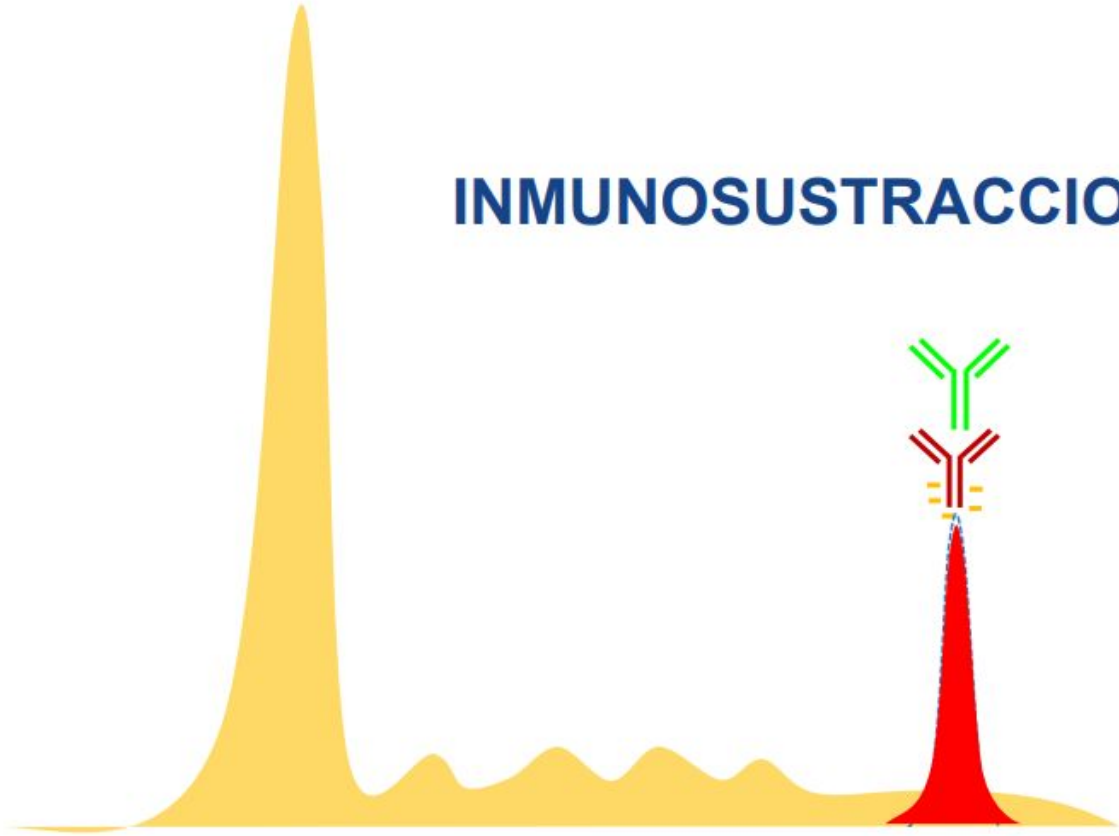


INMUNOCOMPLEJO
con elevada carga negativa

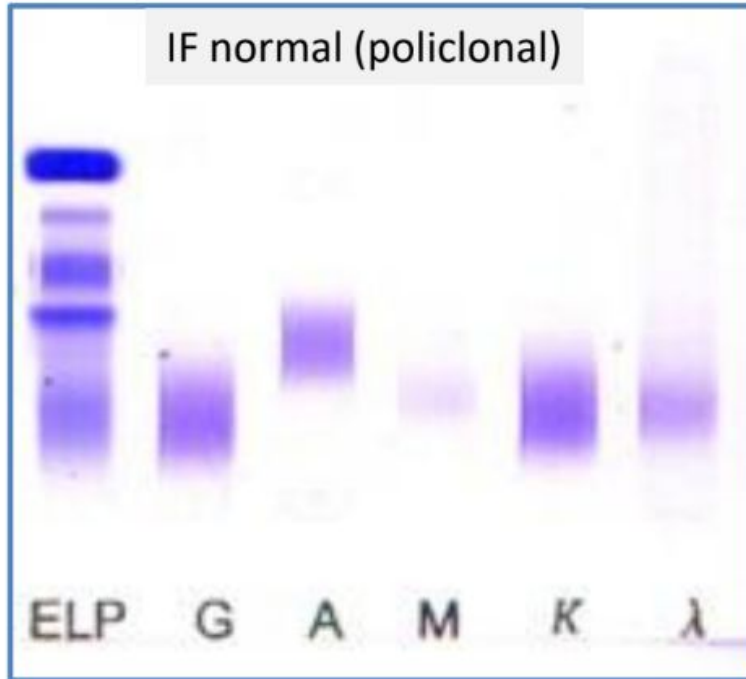


Migración del
INMUNOCOMPLEJO cercano
a la fracción albúmina

INMUNOSUSTRACCION



IF en gel de agarosa: suero

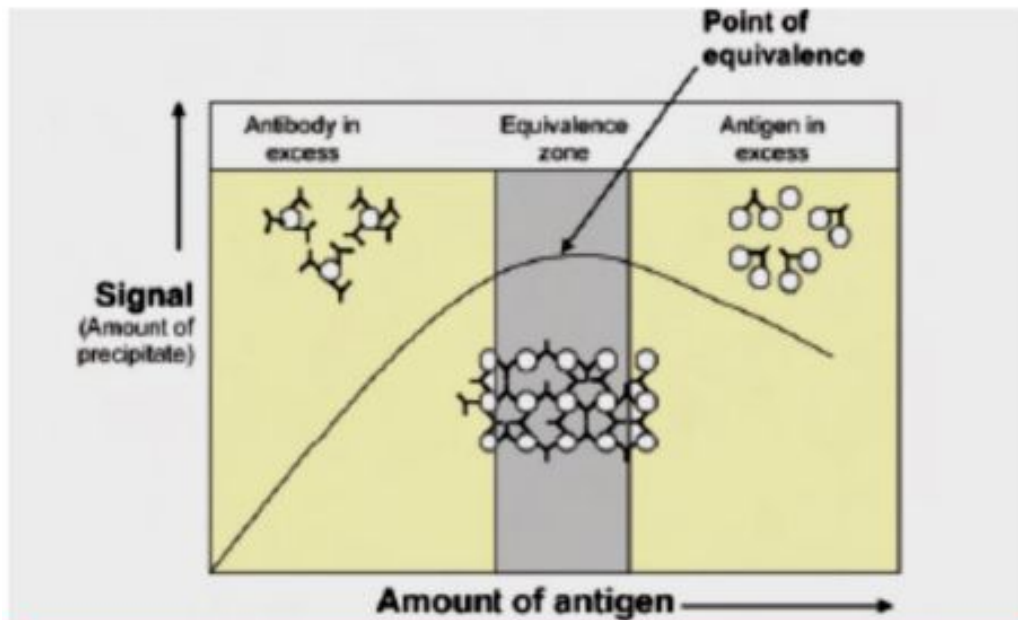


- El suero del paciente se diluye
- se siembra
- se realiza la corrida electroforética,
- luego se individualizan las calles (máscara o plantilla) para la colocación de los antisueros y solución fijadora:
 - 1° Calle) Solución fijadora (proteinograma de referencia)
 - 2° Calle) Antisero anti-IgG
 - 3° Calle) Antisero anti-IgA
 - 4° Calle) Antisero anti-IgM
 - 5° Calle) Antisero anti-kappa (libre + unida a cadena pesada)
 - 6° Calle) Antisero anti-Lambda (libre + unida a cadena pesada)
- se colorea

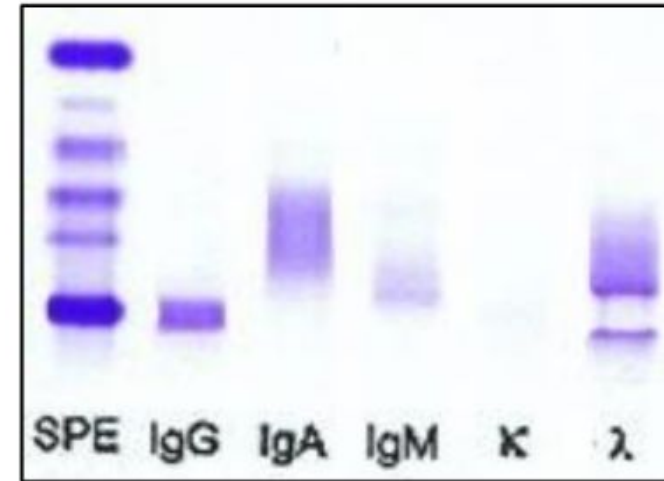
Los antisueros difunden dentro del gel y se produce la precipitación de los complejos Ag-Ac los cuales quedan inmunofijados en la matriz de agarosa

IF en gel de agarosa

Interacción primaria: precipitación Ag-Ac



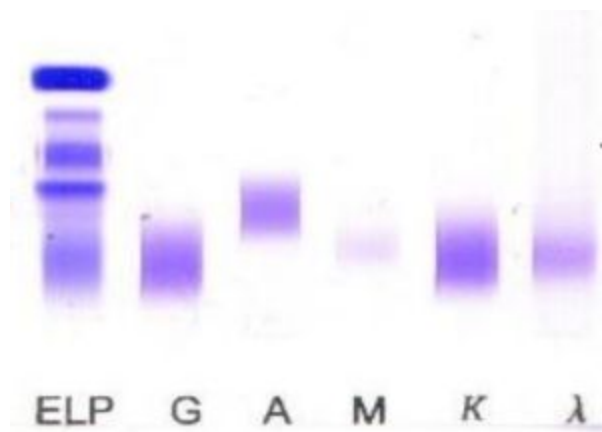
Es muy importante la dilución de la muestra para lograr la zona de equivalencia.



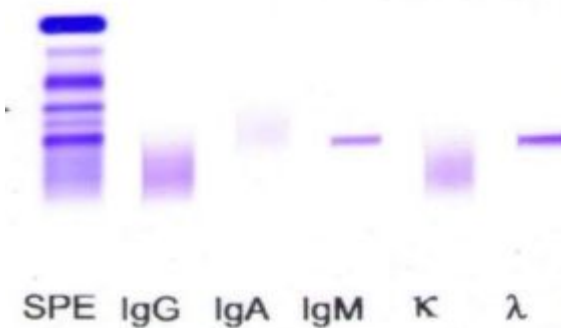
Los antisueros comerciales reaccionan en la zona de equivalencia con una concentración de proteína entre 50–150 mg/dL (precipitación óptima). El suero debe ser diluido y las orinas concentradas para obtener aproximadamente esa concentración de Igs.

La potencia de los antisueros varía según la marca comercial.

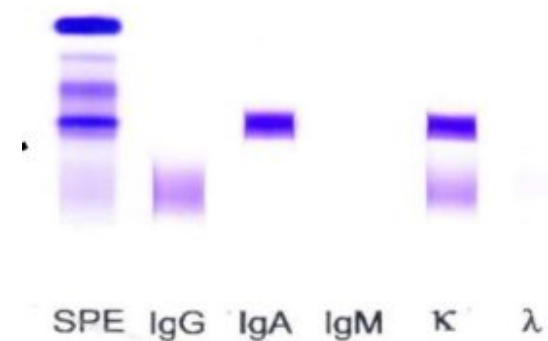
IF en gel de agarosa: suero



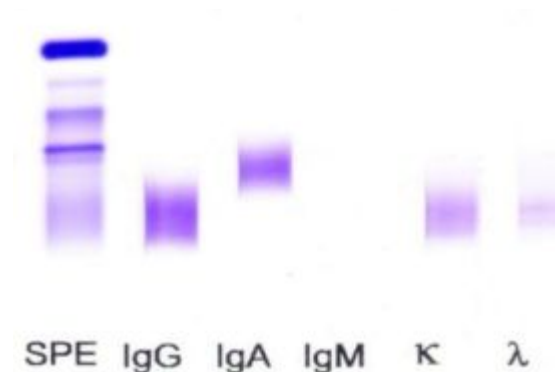
Policlonal
(normal)



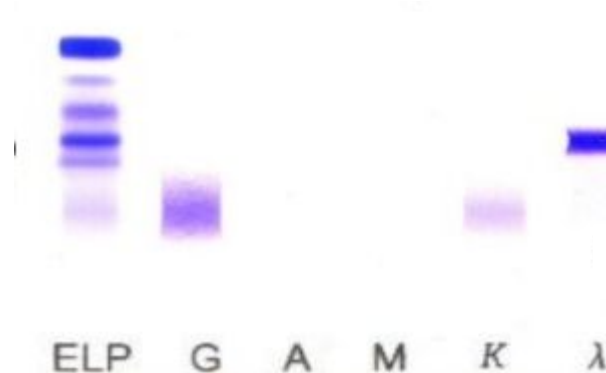
IgM/λ
monoclonal
y policlonal de
las otras Igs



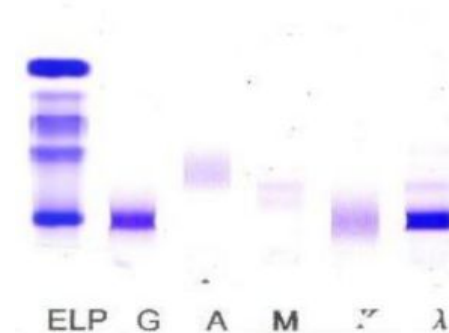
IgA/k monoclonal
y policlonal de las
otras Igs
(co-migra en beta)



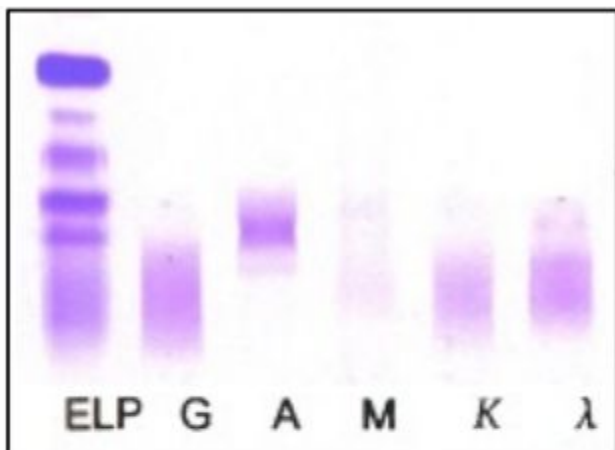
IgG/λ
monoclonal
+ policlonal



CLL λ *
monoclonal
(debería
realizar IF con As
anti-IgD y anti-IgE)

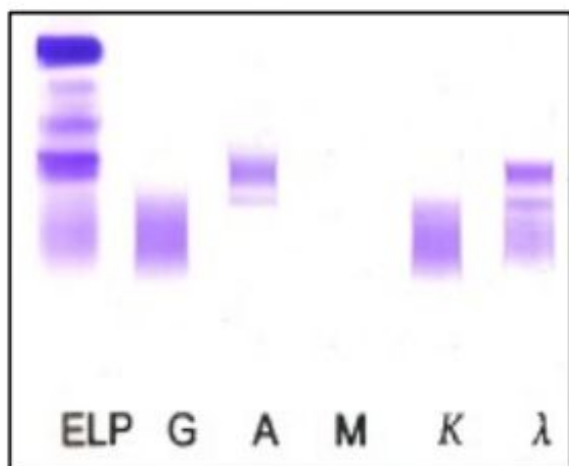


IgG/λ *
monoclonal
e IgM/λ
monoclonal
(biclonalidad)



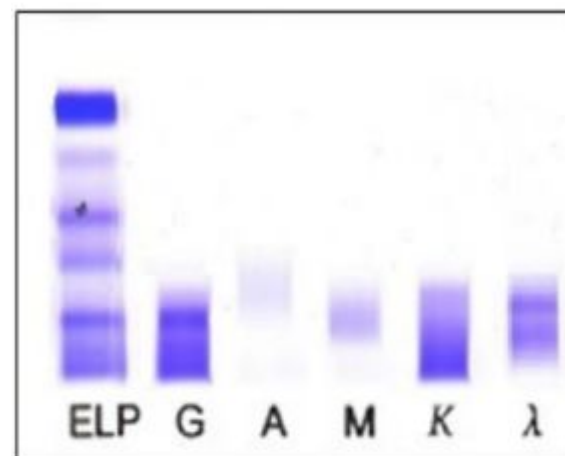
Ig A sin correspondencia
con CL

Precaución con
bandas monoclonales
IgA/λ o IgA/k (puede
verse sólo la banda de
IgA y no la
correspondiente
banda de CL).



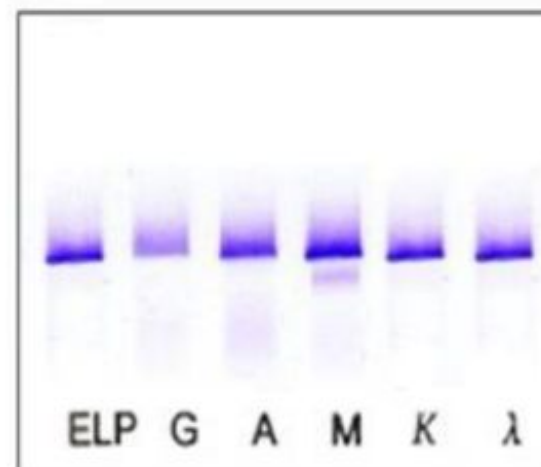
Ig A polimerizada

Tener en cuenta que
tanto Ig A como Ig M
pueden polimerizar;
se observará doble
banda de la
misma cadena
pesada con la
misma CL.



Bandas oligoclonales

Puede observarse
oligoclonalidad (Ej.: pos
trasplante autólogo de
MO, nuevos
tratamientos
para MM, algunas
infecciones virales).

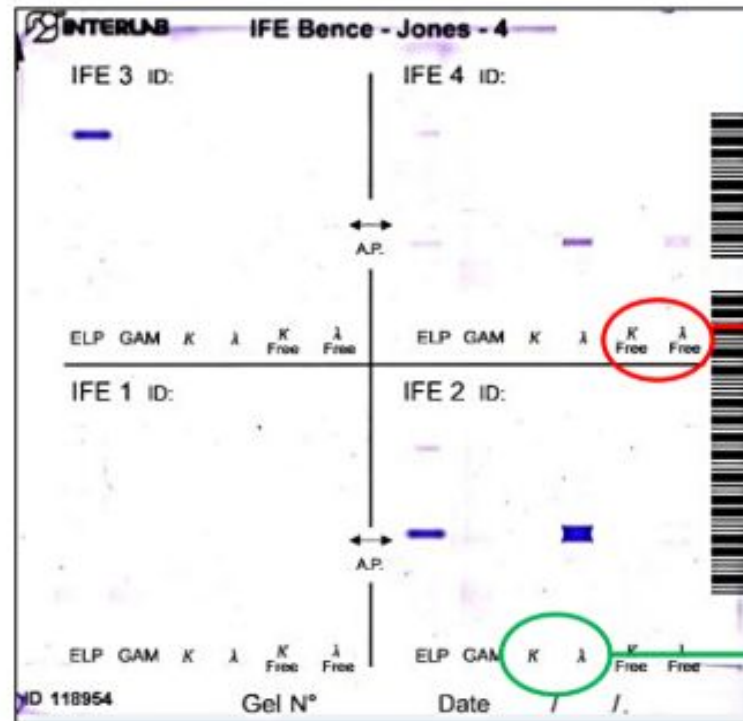
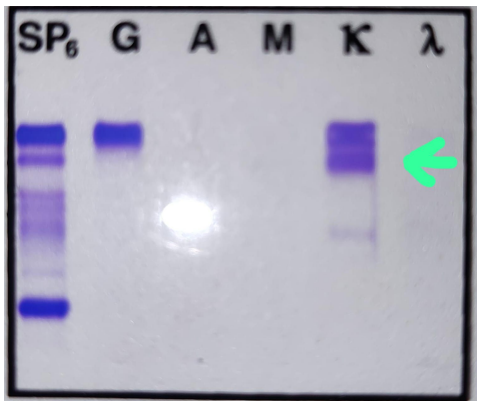


Crioglobulinemia

Las crioglobulinas pueden
producir un artefacto en el
lugar de siembra (se
recomienda calentar el
suero a 37°C antes de
realizar la corrida
electroforética).

IF en gel de agarosa: orina

- ✓ Para pesquisa se puede realizar en primera orina de la mañana.
- ✓ Para cuantificación, sólo en orina de 24 hs (uroproteinograma + IF).
- ✓ Tener en cuenta que las CLL no son detectadas con las tiras reactivas de orina (precipitan con el agregado de una sol. de ac. sulfosalicílico al 20%)
- ✓ Muestras sin proteinuria: concentrar la orina.



Antisueros anti-CLL
NO son de utilidad para IF

Antisueros anti-CLL + Unidas a Igs
son de utilidad para IF

Aspectos preanalíticos - Interferentes

Tipo de muestra: Suero fresco

(sangre sin anticoagulante, permitir coagulación completa, centrifugar y separar del paquete globular).

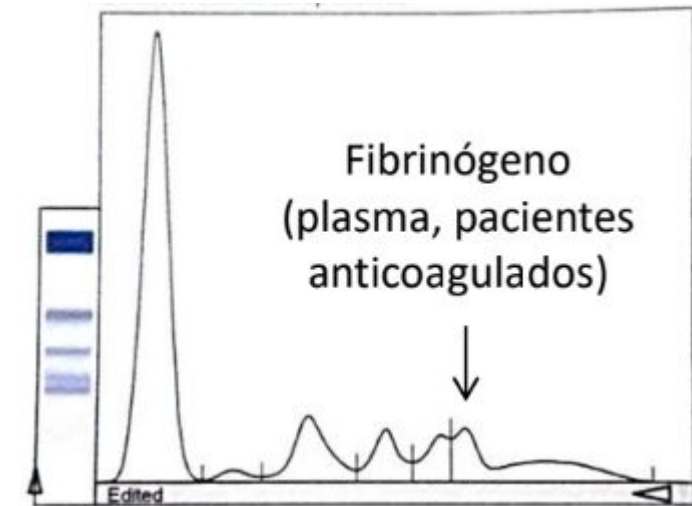
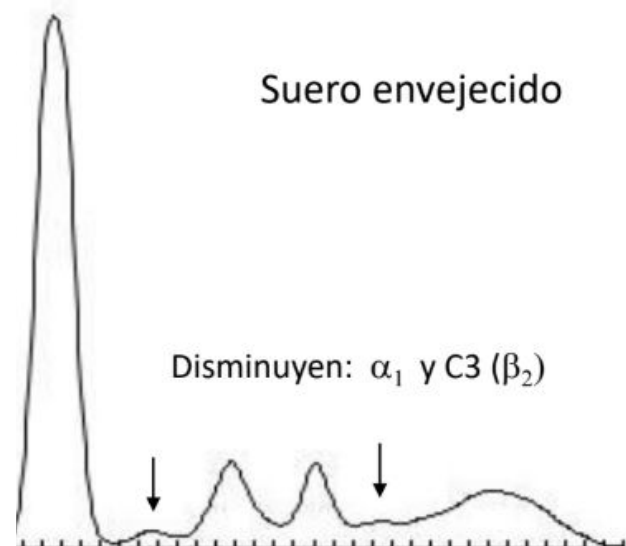
Ayuno: 8 horas

Estabilidad y temperatura de conservación de la muestra:

- un día a temperatura ambiente (20 - 25 °C)
- hasta 7 días a 4-8 °C
- hasta 3 semanas a -20 °C

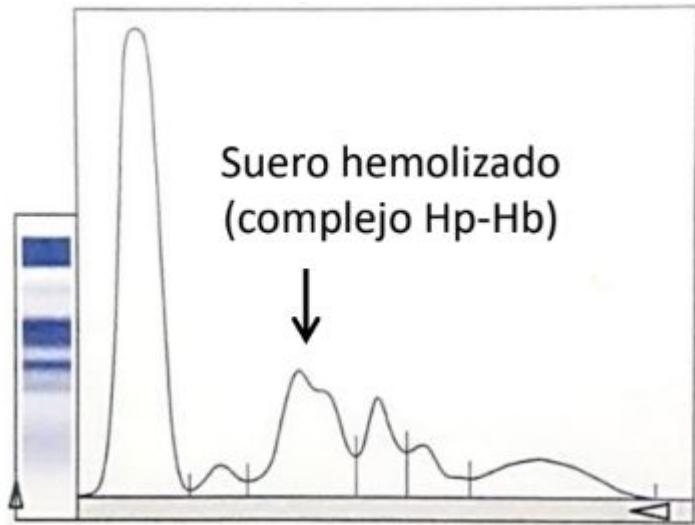
Interferencias

1. Fibrinógeno
2. Lipemia



Aspectos preanalíticos - Interferentes

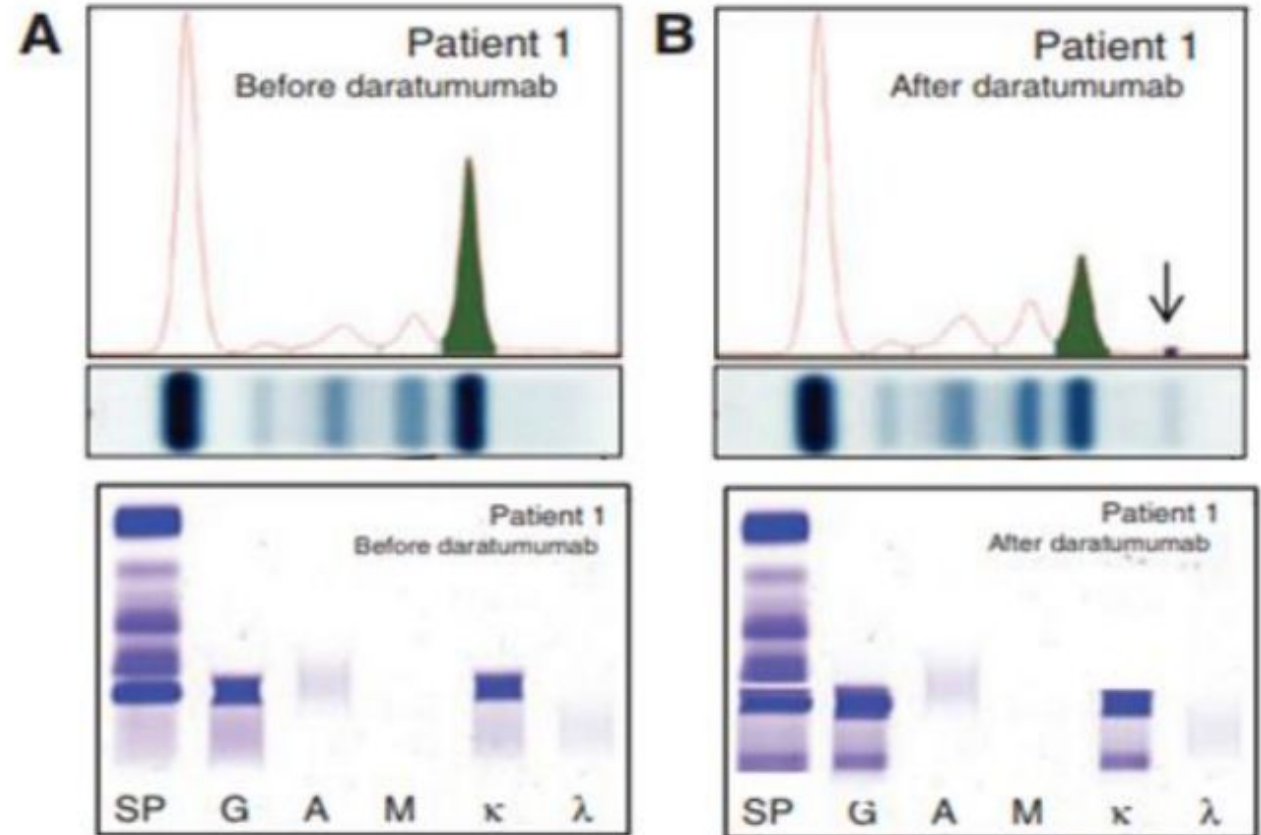
3. Hemólisis



4. Anticuerpos monoclonales en pacientes con terapia biológica (Daratumumab, Elotuzumab, Isatuximab..etc.)

5. Compuestos radiopacos y medicamentos

Acs monoclonales IgGk (anti-CD38);
en concentraciones terapéuticas interfieren en el PxE e IF.



Aspectos Posanalíticos: Informe

-**Título:** Proteinograma sérico

-**Método:** Electroforesis en gel de agarosa

-Se recomienda incluir el **trazado densitométrico** en el informe de los resultados.

-**Valores de referencia** para cada fracción y para las proteínas totales (Unidades y %).

-**Interpretación** sobre hallazgos relevantes en el proteinograma:

- Normal
- Hipergammaglobulinemia policlonal
- Hipogammaglobulinemia
- Banda homogénea (con la ubicación de la banda)
- Hipoalbuminemia
- $\alpha 1$ marcadamente disminuida
- $\beta 2$ marcadamente disminuida
- Fracciones $\alpha 1$ y $\alpha 2$ aumentadas

Aspectos Posanalíticos: Informe

- Es de utilidad para el seguimiento de la enfermedad informar la concentración de la proteína monoclonal integrada desde el trazado densitométrico (**CM**), aclarando método de cuantificación.
- La **IF** es una técnica **cualitativa**.
- Informar las bandas monoclonales como así también la presencia de bandas policlonales.
- Ante resultados no concluyentes adjuntar **nota aclaratoria o con recomendación** (Ej.: Se sugiere repetir la determinación en 6 meses / Se recomienda solicitar IF en suero y orina / Se sugiere solicitar cuantificación de CLL en suero)
- Adherir a recomendaciones nacionales / internacionales a los fines de armonizar el informe de los resultados.

Recomendaciones del Foro de Proteínas con sede en la Asociación Bioquímica Argentina (ABA)

60 Arco y col. Recomendaciones del laboratorio clínico en el estudio de las proteínas séricas a partir del proteinograma electroforético.

GUÍA DE REVISIÓN

Recomendaciones del laboratorio clínico en el estudio de las proteínas séricas a partir del proteinograma electroforético

*Recommendations for the clinical laboratory for the study of serum proteins
from the electrophoretic proteinogram*

Arco, Silvia Estela¹; Baquio, María Isabel²; Bovone, Nora Silvia³; Crispiani, Isabel Amalia³; De Marco, Beatriz⁵; Desimone, Isabel Viviana⁶; Factorovich, Adriana Marcela⁷; Fernández, Diego Javier⁸; García, Mónica Alicia⁹; Giani, Miriam Patricia³; Lorenzon, María Victoria¹⁰; Lunazzi, Graciela¹¹; Madalena, Leticia Bibiana¹²; Nieves Luciano David⁶; Osatinsky, Raquel¹³; Pijuan, María Carla¹⁴; Ríos, María de Lourdes¹⁵; Santoro, Silvina Andrea⁵; Tavella de Del Río, Ofelia¹⁶

ByPC sep-dic 2023; 87(3):60-70 // ISSN-e 2684-0359

La difusión de este documento tiene por objeto divulgar los aspectos metodológicos y de formato de informe recomendados para la electroforesis de proteínas, con la finalidad de que puedan ser utilizados por todos los laboratorios del país en pos de la armonización.

Consideraciones finales

- Se puede pesquisar una proteína monoclonal en pacientes con un trazado electroforético normal, con hipergammaglobulinemia o con hipogammaglobulinemia.
- El hallazgo de una banda homogénea no implica el diagnóstico de una GM.
- En sujetos adultos con hipogammaglobulinemia sin causa se debe realizar pesquisa para GM.
- No se justifica realizar IF en hipergammaglobulinemias policlonales.
- Realizar seguimiento de la proteína monoclonal o CM con un mismo método y plataforma analítica.
- Ante sospecha de Amiloidosis se debe ser exhaustivo en la pesquisa (PxEs, IFs, IFor y CLLs).
- Se observa falta de armonización en las distintas publicaciones y presentaciones al hacer referencia a la Ig monoclonal (Ej.: proteína-M, proteína monoclonal, CM, banda monoclonal, pico monoclonal, pico-M)
- Revisar periódicamente las publicaciones sobre el tema: Foro Argentino de Proteínas, International Myeloma Working Group (IMWG).
- Participar en programas de evaluación externa de la calidad.