

SESSÃO CLÍNICA

IMUNOPROTEINAS



IPANEMA PARK HOTEL
Porto, 27 de Junho de 2002



Quinta-feira, 27 de Junho, 2002

- | | |
|----------|--|
| 10,30 h. | Introdução.
Mário Pinto |
| 10,40 h. | Sistemas Beckman para análise de Imunoproteínas – Electroforese Capilar e Nefelometria.
Aplicação de sistemas inteligentes no Laboratório Clínico.
Miguel Ángel Marín
Product Manager IZASA, S.A. |
| 11,25 h. | Café. |
| 12,00 h. | Análise das cadeias ligeiras livres mediante Nefelometria.
Dr. Leonardo Massaro
New Scientific Company (Italia). |
| 12,45 h. | PCRh: Expectativas e realidades.
Dr. Luis Borque de Larrea
Chefe de Serviço de Bioquímica
Hospital San Millán (Logroño). |
| 13,30 h. | Colóquio. |
| 14,00 h. | Almoço. |

Quinta-feira, 27 de Junho, 2002

HOTEL IPANEMA PARK
SALA ARRABIDA
RUA DE SERRALVES, 124

PORTO

Tel. 225322100



Cadenas Ligeras Libres y Proteínas de Bence Jones

Revisión y actualidad

Leonardo Massaro

Presenta

Salvador Portas

New Scientific Company

16/12/2004

Historia de las CLL: desde Henry Bence Jones hasta hoy (1)

Saturday, Nov. 1, 1845

Dear Dr. Jones,

The tube contains urine of very high specific gravity.

When boiled, it becomes slightly opaque.

On addition of nitric acid, it effervesces, assumes a reddish hue, and becomes quite clear, but as it cool, assumes the consistency and appearance which you see. Heat relliquifies it.

What is it ?

El uno de noviembre de 1845 el Dr. Henry Bence Jones, importante "Patólogo" de Londres (el mismo se definía como "The best 'Chemical Doctor' in London"), recibía del Dr. Thomas Watson primero y poco después del Dr. William MacIntyre, ambos importantes "Clínicos", una muestra de orina de un paciente (un importante y rico comerciante Londinense) afectado de "Mollities Ossium". La muestra le había sido enviada porque a los test químico-físicos de la época presentaba un comportamiento desconocido. La autopsia del paciente evidenció las lesiones típicas del Mieloma Múltiple.

La carta que el Dr. Watson envió al Dr. Jones junto a la muestra de orina no tiene sólo valor histórico sino que además **pone en evidencia:**

- **cual era el nivel de colaboración entre clínico y patólogo**
- **de qué importancia pueden ser los resultados de tal colaboración**

16/12/2004

Historia de las CLL: desde Henry Bence Jones hasta hoy (2)

En 1847 H.B. Jones

- describía las particulares características químico-físicas de la muestra.
- hipotetizaba que eran atribuibles a la presencia de una proteína anómala. (¡ cierto !)
- un deutósido hidrato de albúmina. (¡ falso !)
- sugería la búsqueda de tal proteína en los pacientes con sospecha clínica de "Mollities Ossium" (Mieloma Múltiple). (¡ cierto !)

Jones había descubierto el primer marcador tumoral

16/12/2004

Historia de las CLL: desde Henry Bence Jones hasta hoy (3)

Jones había descubierto el primer marcador tumoral

Jones había intuido el
papel central de la BJP
en el diagnóstico y seguimiento
del "Mollities Ossium", de los mielomas

A la genial intuición de H.B. Jones hay que imputar, al menos en parte, el haber relegado el estudio de las CLL al ámbito de los mielomas.

Hoy la importancia de la BJP se ha extendido a:

- todas las enfermedades inmunoproliferativas
- Amiloidosis AL
- Enfermedad de Depósito de las Cadenas Ligeras Libres
- Marcador de funcionalidad del túbulo renal

16/12/2004

Historia de las CLL: desde Henry Bence Jones hasta hoy (4)

• **1955 (100 años después)** - experimentos con plasmacélulas in vitro demostraron que aminoácidos marcados con radioisótopos eran incorporados en las BJP y en las proteínas mielomatosas.

• **1962** - Edelman y Gally demostraron que las CL obtenidas de las proteínas del suero de un mieloma IgG y las BJP del mismo paciente tenían idénticas características químico-físicas. Edelman formuló la teoría de que las BJP y las CL eran la misma cosa.

• **1963** - Porter proponía para la IgG el modelo estructural de 4 cadenas; dos cadenas pesadas más dos cadenas ligeras.

• **1966 y 1967** - Putnam et al. publicaron la secuencia aminoacídica completa de una BJP.

16/12/2004

Las CLL hoy (150 años después) – puntos demostrados

- **En el sujeto normal se encuentran presentes CLL en todos los líquidos biológicos**, sangre, orina y líquido cefalorraquídeo, y es posible **determinarlas cuantitativamente** con métodos oportunos.
- Las CLL del sujeto normal y las BJP son **sintetizadas "de novo"** y no son productos de degradación de las Inmunoglobulinas.
- Las BJP, las CLL y las Cadenas Ligeras de las Inmunoglobulinas son la **misma identidad molecular** en todos los líquidos biológicos.
- Las BJP y las CLL se encuentran en forma de **monómeros, dímeros y polímeros** de mayor peso molecular en todos los líquidos biológicos.
- Las BJP, las CLL y las CL de las Ig, al igual que las Ig enteras y que las Cadenas Pesadas, constituyen un **"pool" extremadamente heterogéneo**.

16/12/2004

Las CLL hoy (150 años después) – puntos demostrados

- Al menos en el **80%** de los Mielomas está presente la BJP
- El **20%** de los mielomas es micromolecular, excreta sólo BJP (Cadenas Ligeras Libres Monoclonales), y se evidencian en la orina y casi siempre no son demostrables en el suero.
- La primera causa de muerte en los Mielomas es la **insuficiencia renal ligada fundamentalmente a la presencia de BJP**

Por ello, consiguientemente:

- El estudio cualitativo y cuantitativo de la BJP tiene una importancia fundamental en el diagnóstico y seguimiento de los mielomas
- La presencia de BJP es uno de los criterios fundamentales para distinguir entre Mieloma y MGUS
- Es indispensable proceder siempre al estudio de la orina, tanto en el Mieloma como en el MGUS

Las CLL hoy (150 años después) – Interrogantes Teóricos

Teóricos

- ¿porqué existen **dos tipos** de Cadenas Ligeras ?
- ¿porqué producimos y catabolizamos **170 mg/día de CLL** ?
- ¿cual es la **función de las CLL** ?

Las CLL hoy (150 años después) – Interrogantes Prácticos

Prácticos – objeto de amplio y vivaz debate

Nomenclatura

Fase preanalítica – **tipo de muestra (orina)**

- alícuota de la recogida de las 24 horas
- de primera o segunda micción de la mañana
- de micción extemporánea

Expresión del resultado

- mg/l - concentración absoluta en la muestra examinada
- mg/24 horas - concentración x diuresis
- mg / creatinina urinaria, etc.

Técnicas y protocolos de estudio – métodos:

- Electroforesis (EF), Inmunofijación (IFE), Inmunoquímica (NEF)

Sensibilidad necesaria (y otras prestaciones de los métodos)

Valores de referencia normales (para las CLL policlonales)

Estandar de referencia

Anomalías y sus correlaciones clínicas

- Cualitativas: monoclonales / policlonales
- Cuantitativas

Informe y comparación de los resultados

Características y problemática de las CLL “Heterogeneidad de la homogeneidad”

Es el “hilo conductor” del estudio y la clave del análisis de las Ig y de las CLL

Las Ig y las CLL, sus fragmentos, del sujeto normal difieren de las demás proteínas por un conjunto de peculiares características resumibles en:

- **multiplicidad:** Clases, Tipos, Subtipos
- **heterogeneidad:** en el ámbito de una misma Clase, Tipo y Subtipo
- **especificidad anticorpal**

Tal heterogeneidad determina, tanto en el sujeto normal como, con mayor razón, en el caso de patologías de la producción, variaciones:

(dentro de una sustancial homogeneidad)

- del punto isoeléctrico → movilidad electroforética
- en los determinantes antigénicos → reactividad en las técnicas inmunológicas
- del metabolismo y la función

Características y problemática de las CLL “Heterogeneidad de la homogeneidad”⁽³⁾

Una heterogeneidad tan importante habría hecho muy difícil el estudio de las Ig; los reales progresos en el conocimiento de las Ig y las CLL se han basado en el estudio y el análisis de las BJP y de las Ig mielomatosas, y ello precisamente gracias a su homogeneidad.

Los pacientes mielomatosos, un desafortunado experimento de la naturaleza, han posibilitado el progreso de los conocimientos sobre la estructura y las demás características de las Ig

Terminología⁽³⁾ – Componente Monoclonal (CM)

Definición general de CM :

Anomalía de las Ig y sus fragmentos consistente en **reducción de la heterogeneidad normal** que, con las técnicas electroforéticas, se expresa con la presencia de una **Banda Estrecha de Ig o sus fragmentos** [que reacciona con un único tipo de antisuero anti Cadena Pesada y/o un único tipo de antisuero anti Cadena Ligeras].

Un CM es una señal de

- situaciones clínicas múltiples → enfermedades inmunoproliferativas
- situaciones subclínicas → MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance)

Terminología (13) – Componente Monoclonal (CM)

Los CM pueden estar constituidos por:

- Inmunoglobulinas Enteras
- sólo la Cadena Pesada
- sólo la Cadena Ligera (Cadena Ligera Libre)
- una combinación de las precedentes

Particularidades

- Un CM puede estar constituido por dos Ig o por una Ig y una CLL. Ejemplo: CM IgG-λ + CLL-κ.
- En una muestra pueden estar presentes dos y excepcionalmente tres CM del mismo o distintos tipos.

Advertencia:
la monoclonalidad no se expresa obligatoriamente con la típica "banda estrecha" - en su mayoría, de Células-B puede producir una banda ancha que, sin embargo, reacciona sólo con el antígeno de una de las dos clases de CLLT.

Figura 1 IFE Estándar - Suero

MC IgG-K

Figura 2 IFE Estándar - Suero

MC IgG-K + IgM-K

Figura 3 IFE Estándar - Suero

MC IgG-K + FLC-K (o IgD-K)

Terminología (14) – Cadenas Ligeras Libres (orina)

- **Cadenas Ligeras Libres Policlonales**
 - aumento cuantitativo – heterogeneidad normal
 - banda ancha constituida por ambos tipos de CLL
- **Cadenas Ligeras Libres Policlonales – Pattern "ladder"**
 Como las anteriores pero
 - bandas estrechas con un Pattern típico, constituidas por ambos tipos de CLL
- **Cadenas Ligeras Libres Monoclonales (M-FLC)**
Bence Jones Protein (BJP)
 - cantidad aumentada (usualmente) – heterogeneidad reducida - un solo tipo

Advertencia:
la monoclonalidad no se expresa obligatoriamente con la típica "banda estrecha" - un subconjunto de Células-B puede producir una banda ancha que, sin embargo, reacciona sólo con el antígeno de una de las dos clases de CLLT.

Figura 4 IFE Orina - esquema clásico

FLC Policlonales

Figura 5 IFE Orina - esquema clásico

FLC Ladder

Figura 6 IFE Orina - esquema clásico

FLC Monoclonales - BJP

Estructura Inmunoglobulina

da Putnam FW. The Plasma Proteins Vol. III, pag. 14 modificado

Antiseros anti Cadenas Ligeras – Esquema Reacción

Antisero Anti Catene Leggere Libero e Legate (Totale)

Antisero Anti Catene Leggere Libere

As. Cadenas Ligadas y Libres
 Anticuerpos contra todos los determinantes antígenicos de las CLL, tanto aquellos "ocultos" (Hidden) como aquellos "no ocultos".
 Reaccionan **indistintamente** con:
 ■ **Ig enteras**, sitios antígenicos "no ocultos" de las CL que componen las Ig
 ■ **CLL**, determinantes "no ocultos" y "ocultos".

As. Cadenas Ligadas y Libres
 Se obtiene del precedente por eliminación de los anticuerpos contra los sitios "no ocultos".
 Reacciona **exclusivamente** con
 ■ **CLL**; determinantes "ocultos".

H Anticorpo Anti determinante Nascocto (Hidden)
 X Anticorpo Anti determinante Esposto
 ◆ Determinante Nascocto (Hidden)
 ▲ Determinante Esposto

CLL - Fisiopatología y Metabolismo (15) - Introducción

Metabolismo delle CLL - Normale

170 mg/die

Pharmacologic

Emivida: 30 – 60 minuti

Circolo

Glomerulo

Reoze

Tubulo

Vesicula

Pre-urina

Filtrato glomerulare

Urina

tracce

non dosabili

Las CLL en orina expresan el balance entre síntesis de las células-B y catabolismo renal: filtración glomerular y reabsorción tubular, en el periodo entre la última micción y la actual o en el periodo de la recogida.

Las células plasmáticas sintetizan un 10-20% de CLL en exceso (= 170 mg/día) no incluidas en las Ig.

¿Cuál es la función real de estas FLC ?

Hemivida de las CLL: 30 – 60 minutos
 Hemivida de las Ig: media de unos 15 días

Las CLL en la orina del sujeto normal, con Filtrado Glomerular normal, son la expresión de la producción plasmacelular ocurrida durante el periodo de estacionamiento de la orina en la vejiga o durante el periodo de la recogida.

Parece demostrado que sólo unos pocos clones están contemporaneamente activos produciendo Ig (y CLL) y por ello en el sujeto normal la "producción instantánea" de Ig (y de CLL) sería "oligoclonal".

Si es cierta esta hipótesis, dada la hemivida de las Ig y las CLL, las Ig resultarán policlonales en la EF del suero (y de la orina) porque expresan la producción de los clones de alrededor de 15 días, mientras las CLL pueden resultar oligoclonales en la EF de la orina porque expresan la producción ocurrida durante el periodo de la recogida.

CLL - Fisiopatología y Metabolismo (16) - Introducción

Metabolismo delle CLL - Normale

170 mg/die

Pharmacologic

Emivida: 30 – 60 minuti

Circolo

Glomerulo

Reoze

Tubulo

Vesicula

Sangue 2 mg/dl

Pre-urina

Filtrato glomerulare

Urina

tracce

non dosabili

Eliminación de las CLL – Función del Riñón
 Análogamente a como sucede con las demás proteínas de bajo peso molecular: beta2-micro, alfa1-micro, etc., las CLL son filtradas fácilmente a través del glomerulo renal y son reabsorbidas por el túbulo proximal donde son catabolizadas a aminoácidos que son reinsertos en circulación.

No parece existir un mecanismo de transporte del túbulo a la sangre.

Hay que tener presente que **las células**, y más en general las estructuras, **tienen una capacidad de trabajo característica para calidad y cantidad.**

En el caso de las CLL la célula del túbulo proximal efectúa dos operaciones:

- reabsorbe las CLL del Filtrado Glomerular (FG)
- cataboliza las CLL reabsorbidas

19 CLL - Fisiopatología y Metabolismo (6) - Introducción

Metabolismo delle CLL - Normale

Reabsorción Tubular
La primera fase de la reabsorción tubular de las CLL (y de las demás proteínas presentes en el filtrado glomerular) es la unión que se formaría entre los grupos amino y los grupos carboxilos de la proteína (positivos) y "sitios" negativos de la superficie de la Célula Tubular. Este mecanismo se ha confirmado con la observación de que la inyección endovenosa de arginina en sujetos normales determina el inmediato (antes de dos minutos) y dosis dependiente incremento de la excreción urinaria de albúmina, beta2-micro, CLL, etc. La excreción se normaliza entre 20-40 minutos después del final del suministro de arginina. Experimentos similares efectuados con una serie de otras sustancias confirman esta hipótesis.

Catabolismo Tubular
Las CLL reabsorvidas son catabolizadas por las células tubulares. El aumento de la carga de CLL y el consiguiente aumento de su reabsorción pueden determinar la saturación de la capacidad catabólica y la acumulación de CLL en la célula tubular y debido a ello sufrimiento celular. La distinta nefrototoxicidad de las CLL podría incidir a este nivel.

Metabolismo delle CLL - Normale

170 mg/die
 ● FLC kdal
 - monomero 22.000
 - dimero 44.000
 - tetramero 88.000

Sangue 2 mg/dl

Pre-urina
Filtrato glomerulare

Urina
tracce
non dosabili

16/12/2004

20 CLL - Fisiopatología y Metabolismo (6) - Alteraciones

Metabolismo CLL – Aumento Produzione

Aumento de producción

- causa: aumento del número de células productoras
- efecto en síntesis:
 - incremento de la cantidad de CLL en circulo
 - sobrecarga tubular y consiguiente proteinuria
 - daño tubular

El déficit tubular secundario a la sobrecarga determina el cierre del **circulo vicioso**.

La **nefrototoxicidad** de las CLL parece estar más ligada a la calidad que a la cantidad.

Hay pacientes que eliminan pequeñas cantidades de BJP y evidencian un rápido e irreversible compromiso renal mientras otros eliminan una importante cantidad de BJP durante años sin evidenciar daño renal.

Metabolismo CLL – Aumento Produzione

> 170 mg/die
 ● FLC kdal
 - monomero 22.000
 - dimero 44.000
 - tetramero 88.000

Sangue > 2 mg/dl

Pre-urina
Filtrato glomerulare normale

Urina
FLC
dosabile

16/12/2004

21 CLL - Fisiopatología y Metabolismo (6) - Alteraciones

Metabolismo CLL – Riduzione catabolismo

Disminución del catabolismo

- causa:
 - déficit de la reabsorción tubular de las CLL por:
 - insuficiencia tubular primaria
 - insuficiencia tubular secundaria a la sobrecarga de CLL o de otras substancias: aminoácidos, fármacos, etc.
- efecto:
 - cantidad normal de CLL en circulo y consiguientemente en el Filtrado Glomerular
 - reducción de la cantidad de CLL reabsorvidas por el Túbulo y eliminación en la orina de las CLL no reabsorvidas.

Metabolismo CLL – Riduzione catabolismo

170 mg/die
 ● FLC kdal
 - monomero 22.000
 - dimero 44.000
 - tetramero 88.000

Sangue 2 mg/dl

Pre-urina
Filtrato glomerulare normale

Urina
FLC
dosabile

16/12/2004

22 CLL - Fisiopatología y Metabolismo (6) - Alteraciones

Metabolismo CLL – Aumento in circolo

Aumento de las CLL en la Sangre

- causa:
 - insuficiente filtración glomerular respecto a la carga actual de CLL
- dos hipótesis:
 - síntesis de CLL normal en pacientes con Filtrado Glomerular inferior a 5-10 ml/min, y sin presuntible aumento de la síntesis de CLL, la concentración de CLL en la sangre resulta aumentada entre 5 - 8 veces respecto a la del sujeto normal [6].
 - síntesis de CLL aumentada a menos que tal aumento no sea imponente, la concentración hemática no sufrirá variaciones relevantes mientras el filtrado glomerular sea suficiente. Pacientes con **Mieloma Micromolecolar** y **BJP** elevadísima, superior a 400 mg/dl (y 4600 mg/día), pueden presentar una concentración sérica de CLL normal [6].

Metabolismo CLL – Aumento in circolo

> 170 mg/die
 ● FLC kdal
 - monomero 22.000
 - dimero 44.000
 - tetramero 88.000

Sangue > 2 mg/dl accumulato

Pre-urina
Filtrato glomerulare ridotto

Urina
FLC
dosabile

16/12/2004

23 CLL - Fisiopatología y Metabolismo (7) - Alteraciones

Metabolismo CLL – Aumento Produzione

Aumento de CLL en la Orina

- causas
 - aumento de la síntesis de CLL y consiguiente aumento de CLL en el FG que supera la capacidad de reabsorción del túbulo proximal: Las CLL en orina reflejan el tipo de producción: mono, oligo o policlonal
 - reducción de la reabsorción específica del túbulo proximal por:
 - interferencia y competición de otras sustancias presentes en el filtrado glomerular; por ejemplo: aminoácidos tipo arginina, lisina, etc., fármacos, etc.
 - funcionalidad reducida como consecuencia de daño tubular.

En ambos casos las CLL en la orina reflejan el tipo de producción.

- Combinación de las dos situaciones precedentes.

Metabolismo CLL – Aumento Produzione

> 170 mg/die
 ● FLC kdal
 - monomero 22.000
 - dimero 44.000
 - tetramero 88.000

Sangue > 2 mg/dl

Pre-urina
Filtrato glomerulare normale

Urina
FLC
dosabile

16/12/2004

24 CLL - Fisiopatología y Metabolismo (7) - Alteraciones

Metabolismo CLL – Riduzione catabolismo

Aumento de CLL en la Orina

- causas
 - aumento de la síntesis de CLL y consiguiente aumento de CLL en el FG que supera la capacidad de reabsorción del túbulo proximal: Las CLL en orina reflejan el tipo de producción: mono, oligo o policlonal
 - reducción de la reabsorción específica del túbulo proximal por:
 - interferencia y competición de otras sustancias presentes en el filtrado glomerular; por ejemplo: aminoácidos tipo arginina, lisina, etc., fármacos, etc.
 - funcionalidad reducida como consecuencia de daño tubular.

En ambos casos las CLL en la orina reflejan el tipo de producción.

- Combinación de las dos situaciones precedentes.

Metabolismo CLL – Riduzione catabolismo

170 mg/die
 ● FLC kdal
 - monomero 22.000
 - dimero 44.000
 - tetramero 88.000

Sangue 2 mg/dl

Pre-urina
Filtrato glomerulare normale

Urina
FLC
dosabile

16/12/2004

CLL – Aumento en la orina ⁽¹⁾ - Interpretación

CLL e Ig en la orina	
Presencia de	Interpretación
Cadenas Ligeras Libres (CLL) monoclonales- BJP	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades inmunoproliferativas • MC tipo MGUS en suero - Situaciones subclínicas • BJP idiopática
Cadenas Ligeras Libres(CLL) Policlonales y Ladder	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades hiperinmunes: Lupus, etc. • Función tubular alterada
Inmunoglobulinas policlonales	<ul style="list-style-type: none"> • Función glomerular alterada
Inmunoglobulinas monoclonales	<ul style="list-style-type: none"> • MC-Ig en suero + Función glomerular alterada
Combinación de los casos anteriores	<ul style="list-style-type: none"> • Combinación situaciones anteriores

CLL en orina – Patologías relacionadas ⁽¹⁾

FLC monoclonales (BJP)

- Mieloma Múltiple (de los que 15-20% Mieloma Micromolecular)
- Macroglobulinemia de Waldenström
- Leucemia Linfóide Crónica
- Enfermedad de Cadenas Pesadas μ
- otras neoplasias linfoproliferativas
- Amiloidosis AL
- Enfermedad de Depósito de las Cadenas Ligeras
- CM en suero no asociada a enfermedad (MGUS)
- Proteinuria de Bence Jones Idiopática

◆◆

Las BJP no sólo indican un proceso maligno, sino que son ellas mismas una "entidad maligna" (el mieloma micromolecular no es de por sí "más maligno" que otros mielomas) que produce efectos patológicos sobre todo en el riñón.

CLL en orina – Patologías relacionadas ⁽¹⁾

Cadenas Ligeras Libres Policlonales

- Aumento de la producción Policlonal
Sarcoidosis, Tuberculosis Pulmonar, Lupus Erythematosus, Artritis Reumatoide
- Alteración de la Función Tubular
Síndrome de Fanconi, Nefropatía diabética, hipertensiva
Carga en aminoácidos tipo lisina o arginina, toma de fármacos

Estudio de las Proteínas ⁽¹⁾ - Variaciones y Anormalidades

Las *técnicas de rutina* disponibles en el Laboratorio permiten evidenciar algunas de las posibles variaciones y anomalías de las proteínas.

A tal efecto es útil formalizar tres elementos:

- **Características Cualitativas**
 - *individualidad antigénica o composición*
 - *movilidad electroforética o distribución*
- **Características Cuantitativas (Concentración)**
- **Función**

La *valoración exhaustiva de las variaciones y anomalías de las proteínas debe prever el uso combinado de:*

- *técnicas separativas*
- *técnicas inmunológicas*

Estudio de las Proteínas ⁽¹⁾ - Variaciones y Anormalidades

Características Cualitativas

es necesario analizar dos elementos característicos:

- *individualidad antigénica o composición*
- *movilidad electroforética o distribución*

De hecho, las proteínas pueden tener:

- *idéntica individualidad antigénica pero distinta movilidad electroforética*
- *idéntica movilidad electroforética pero distinta individualidad antigénica*

La *valoración exhaustiva de las variaciones y anomalías de las proteínas debe prever el uso combinado de:*

- *técnicas separativas*
- *técnicas inmunológicas*

Estudio de las Proteínas ⁽¹⁾ - Variaciones y Anormalidades

Concentración

Las consideraciones son en cierta medida análogas a las relativas a las características cualitativas:

- con una *técnica separativa*, por ej. la EF, podremos valorar exclusivamente la concentración de las "*proteínas totales*" presentes en las fracciones individuales.
- con una *técnica inmunológica*, por ej. la IPL, podremos valorar exclusivamente la concentración en la muestra de la *proteína individual*, es decir de la individualidad antigénica.
- para valorar la concentración de las proteínas individuales presentes en una fracción deberemos prever el uso combinado de técnicas separativas y de técnicas inmunológicas.

Peculiaridades de las CLL

- Composición- individualidad antigénica**
 La presencia de CLL en la muestra o en la fracción deberá ser determinada con **técnicas inmunológicas**
- Distribución - movilidad electroforética**
 monoclonales o policlonales (o Ladder), o ambas
 Esta característica deberá ser determinada con técnicas electroforéticas o que de alguna manera prevean la electroforesis.
- Concentración**
 Podrá valorarse con la EF, con la IPL directa o con métodos indirectos.

La verificación contemporánea de ambas características cualitativas:
 ■ Composición y
 ■ Distribución
 puede hacerse en rutina con la Inmunofijación (IFE)
 que, en realidad, es un **protocolo constituido por dos técnicas**:
 ■ técnica separativa: Electroforesis (EF)
 ■ técnica inmunológica: Inmunoprecipitación sobre Soporte (IPS).

La alternativa es dividir el problema en sus dos componentes predisponiendo protocolos de dos o más métodos que permitan verificar separada y encadenadamente "composición" y "distribución".

Según cual de los dos parámetros se escoja como Screening, se pueden formalizar **dos tipos de protocolos**:

- parámetro Screening: **distribución**
 test de primer nivel: **Electroforesis**
- parámetro Screening: **composición**
 test de primer nivel: **IPL directa, IPL indirecta e "índices"**

Métodos para las CLL – Criterios de Valoración

Se deberán tener presentes, como para cualquier otro analito:

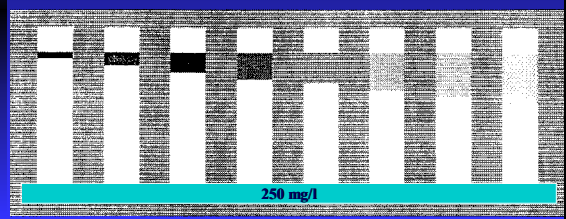
- límite de detección o de sensibilidad analítica** :
 es decir la cantidad más pequeña de analito en una muestra real cualquiera evidenciable con suficiente fiabilidad y reproducibilidad (intra e interlaboratorio)
- especificidad analítica de la señal de positividad**
- reproducibilidad de la señal de positividad**
- fiabilidad de la ejecución**:
 manual, semiautomática, automática; identificación de la muestra, etc.
- fiabilidad de la interpretación del resultado**:
 subjetiva, semisubjetiva, objetiva
- muestra-dependencia**
 - diuresis**:
 a igualdad de producción influye la concentración en orina
 - variabilidad de la proteinuria**
 desde fisiológica a mixta (tipo suero diluido con el añadido de componentes tubulares micromoleculares) que influye las prestaciones de los métodos

Métodos FLC (1) – Sensibilidad analítica y distribución – EF e IFE

De Monoclonal a Policlonal – Simulación por ordenador

Efecto de una misma cantidad de color distribuida por una superficie asimilable a una banda homogénea de BJP y escalamente hasta una superficie 8 veces mayor asimilable a CLL policlonales.

Si demuestra que, a igual concentración de proteína, la sensibilidad de la EF y la IFE disminuyen proporcionalmente a la superficie sobre la que la proteína se distribuye: para las CLL, desde una banda monoclonal de BJP al aspecto difuso de las CLL policlonales



Métodos BJP (1) - Señal de Positividad - EF

EF – Señal de positividad → Banda sospechosa ???
 La BJP puede asumir cualquier posición

E. Bergon, M. Bergon
 Quimica Clinica
 2001 – 20(6)

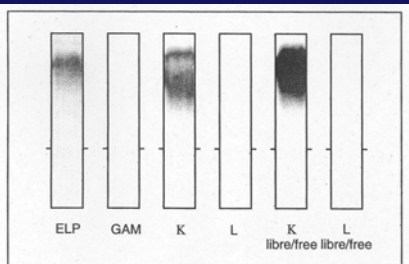
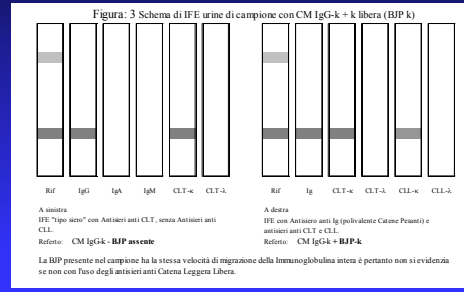


Figura 1. Inmunofijación de orina en gel de agarosa con antisueros dirigidos contra las inmunoglobulinas G, A y M y las cadenas ligeras kappa y lambda (totales y libres)

Métodos BJP (2) - Señal de positividad – IFE – As CL(B&F) y As FLC

Señal de positividad → As CL(B&F) banda sospechosa
 As C. Pesadas ninguna banda



Metodos BJP (2) - Sensibilidad analítica BJP – Muestra-dependencia

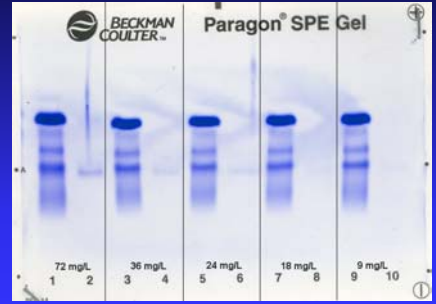
Teóricamente

la composición proteica de la muestra de orina (proteinuria fisiologica, glomerular selectiva/no selectiva, tubular, mixta):

- no influencia
 - IN-CLL
 - IFE con antiseros anti CLL
 - influencia, de manera imprevisible
 - EF
 - co-migración BJP con Transferrina, otras proteínas con banda homogénea, hemoglobina, Ig policlonales
 - IFE con antiseros anti CLT
 - co-migración BJP con la Ig entera monoclonal, enmascaramiento por Ig policlonales
- En estos casos el aumento de sensibilidad es contraproducente ya que afecta también sobre las "proteínas interferentes".

Metodos FLC (2) - EF - Sensibilidad analítica y Muestra-dependencia

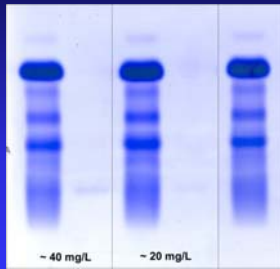
Derecha: muestra BJP positiva – diluida en PBS
banda sospechosa hasta 9 mg/l
Izq.: spiked sample – idem usando como diluyente una orina con Proteinuria mixta
banda sospechosa sólo hasta 72 mg/l



Un aumento de sensibilidad (colorante Oro, concentración, etc.) sería contraproducente

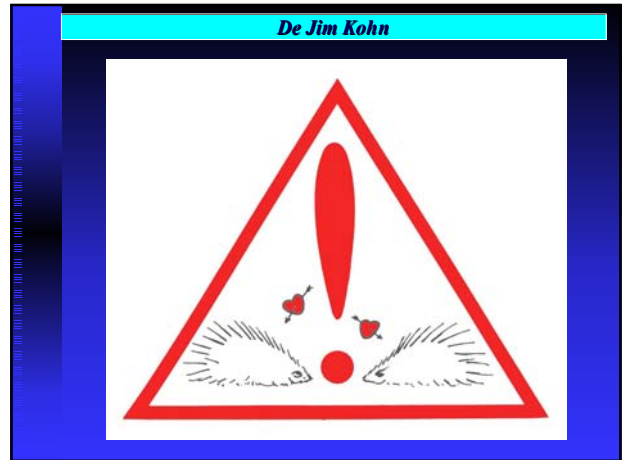
Metodos FLC (2) - EF - Sensibilidad analítica y Muestra-dependencia

Derecha: muestra BJP positiva – diluida en PBS
banda sospechosa hasta 20 mg/l
Izq.: spiked sample – idem usando como diluyente una orina con Proteinuria mixta
banda sospechosa sólo hasta 40 mg/l



Proteinuria mixta

Un aumento de sensibilidad (colorante Oro, concentración, etc.) sería contraproducente



Kits Cadenas Ligeras Libres Presentación (2)

Desde 1988, NSC propone una línea completa de kits para la determinación de las Cadenas Ligeras Libres en orinas no concentradas y otros líquidos biológicos por nefelometría (o turbidimetría)

Kits Cadenas Ligeras Libres Presentación (2)

El objetivo de los kits es la determinación cuantitativa y cualitativa de las Cadenas Ligeras Libres en orina y LCR no concentrados, además del suero

El método se basa en la reacción de Inmunoprecipitación (IPL) en fase líquida con antisueros adsorbidos específicos anti Cadenas Ligeras Libres - Determinantes "Hidden"

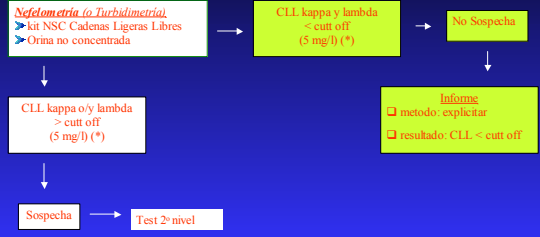
La turbidez producida por la reacción es Medida instrumentalmente: nefelometría o turbidimetría.

La señal de la muestra es interpolada en la curva obtenida con los Calibradores.

Están disponibles kits y aplicaciones para los analizadores más comunes:

- APS e IMAGE de Beckman Coulter
- BNA, BNII y BN ProSpec de Dade Behring

1er paso – Presencia de Cadenas Ligeras Libres – Nefelometría NSC



2º paso – Distribución de las CLL: mono, policlona – IFE orina concentrada

Concentrazione urtica
variabile in base al risultato di IFE-CLL

mg/l	volte	mg/l	volte
0 - 200	1/100	51 - 200	2/10
21 - 40	7/5	51 - 100	1/10
41 - 60	3/1	> 100	1/1

N.B.: la tabella ha valore solo esemplificativo perché la concentrazione del campione dipende dalle performance e sensibilità del metodo IFE in uso.

Immunofissazione (IFE) urine concentrate

- schema base
1. Fissativo + Colorazione
 2. As Catenas Leggere Libere kappa
 3. As Catenas Leggere Libere lambda
- eventuali altri antigeni
4. As Catenas Leggere Totali (liberodisgate) kappa
 5. As Catenas Leggere Totali (liberodisgate) lambda
 6. As invariante IgA, IgM, IgG
- N.B. se la IFE non dimostra la presenza di CLL mono o policlonali, ripetere su una concentrata al doppio

Nota
En la mayor parte de los casos es posible emplear sólo uno de los antisueros anti CLL.

Interpretación

Risultato e Interpretazione

● Catenas Leggere Libere monoclonali	➔ BIP – Immunoproliferative
● Catenas Leggere Libere "oligoclonali"	➔ BIP – Immunoproliferative
● Catenas Leggere Libere Policlonali	➔ altre situazioni di significato incerto, es. "Ladder" o "Pseudo-Oligoclonali"
	➔ Malattie Immunumun: Lupus, ecc.
	➔ Alterata Funzione Tubolare
● Immunoglobuline Monoclonali	➔ Ig Monoclonale in siero (CM-Ig) con alterata Funzione Glomerulare
● Immunoglobuline Policlonali	➔ Alterata Funzione Glomerulare
● Combinazioni dei casi precedenti	➔ Combinazioni delle situazioni precedenti

Indicaciones

- **Cadenas Ligeras Libres Monoclonales (BJP) en orina**
 - Protocolo diagnóstico en caso de:
 - sospecha clínica de enfermedad inmunoproliferativa
 - electroforesis sérica que evidencie una nueva banda monoclonal
 - datos de laboratorio sospechosos de mieloma micromoleculat
 - Protocolo de control de la evolución – *Follow Up* en caso de:
 - enfermedad inmunoproliferativa
 - paciente con banda monoclonal serica (o urinaria) MGUS
- **Cadenas Ligeras Libres Policlonales en orina**
 - Protocolo diagnóstico y seguimiento en enfermedades hiperinmunes: Lupus Erythematosus, Artritis Reumatoide, etc.
 - Protocolos de estudio de la Funcionalidad del Túbulo renal
- **Cadenas Ligeras Libres en líquido cefalorraquídeo**
Esclerosis Múltiple y otras enfermedades inflamatorias del Sistema Nervioso Central

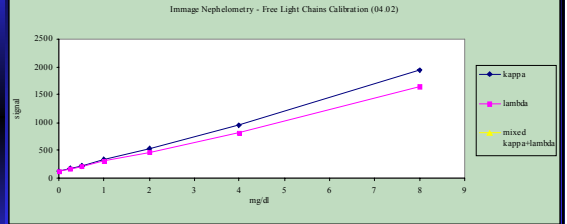
Validez del test

- La validez del test de Inmunoprecipitación será distinta según el problema:
- **Proteínas de Bence Jones:**
 - *primera aproximación diagnóstica:* el test tiene una doble validez:
 - § **Screening cualitativo**
cualquiera que sea el motivo del estudio, el test tiene sobre todo valor de Screening cualitativo, puesto que la monoclonalidad deberá ser confirmada con la Electroforesis o con la Inmunofijación
 - § **indicación cuantitativa**
la determinación cuantitativa, incluso con algunos limites, es útil para:
 - tener una orientación sobre cuanto concentraq la muestra para ulteriores estudios
 - tener el punto de partida para el control de la evolución (*Follow Up*)
 - *control de la evolución:* el test tiene prevalentemente significado cuantitativo.
 - Cadenas Ligeras Libres Policlonales en orina: significado cuantitativo.
 - Cadenas Ligeras Libres en LCR: significado cuantitativo.

IN-CLL – Características ⁽¹⁾

- Muestra tal cual
- Tubo primario ⇒ identificación positiva (Barcode)
- Curva de Calibración
 - 5 puntos, rango ensayo: 5 – 80 mg/l
 - Interpolación hasta el cero
 - discrimina entre apenas más bajo de 5 mg/l, por ej. 4,99 mg/l, de claramente menor, por ej. 2 mg/l en muestra no concentrada
- Dilución por over-range, automática si el analizador lo prevee
- Control del Exceso de Antígeno, si el analizador lo prevee

IN-CLL Curvas Calibración (estandar)



■ Rango: 5 – 80 mg/l

■ Interpola a cero

IN-CLL – Evaluación Prestaciones Analíticas

Han sido examinados los siguientes parámetros:

- Curvas de Calibración - reproducibilidad
- Límite de Linealidad y Paralelismo
- Reacción cruzada con C.L. Ligadas - Ig enteras
- Reacción cruzada con CLL del tipo opuesto
- Límite de sensibilidad de los métodos
- Imprecisión y repetibilidad
- Exceso de Antígeno
- Falsos negativos por CLL monoclonales (BJP)

Los resultados, absolutamente tranquilizadores, fueron presentados en el meeting SIBioC - Cefar

“Le proteine dal Laboratorio alla clinica” – X edizione
Castrocaro – 24 – 26 ottobre 2001

De Jim Kohn

