

Ponencia del

**2003 - XXIII Curs de Bioquímica Clínica**

**Hospital de la Santa Creu i Sant Pau**

Barcelona, 3-5 Diciembre 2003

"Nuevas aplicaciones diagnósticas del estudio de proteínas. Proteómica"

"Proteinuria de Bence-Jones"

**Cadenas Ligeras Libres y  
Proteínas de Bence-Jones:**

**El Estado Actual**

**Massaro L.**

New Scientific Company, Cormano (Mi) (Italia)

**Indice**

- [Introducción](#)
- [Historia de las CLL](#)
- [Las CLL Hoy](#)
- [Terminología](#)
- [Fisiopatología y Metabolismo de las CLL](#)
- [Técnicas y Métodos de Estudio de las CLL](#)
- [Revisión Resultados Estudios Multicéntricos](#)


1

## Cadenas Ligeras Libres y Proteínas de Bence Jones

### El Estado Actual

Presenta:  
**Leonardo Massaro**

Preparado por:  
Leonardo Massaro y Salvador Portas



Rev. 02.12.2003

2

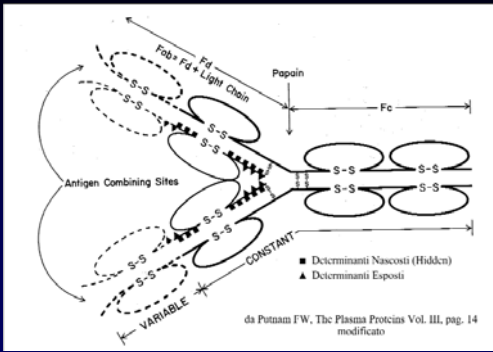
## ¿ De qué hablaremos hoy ?



17/06/04

3

## Estructura Inmunoglobulina



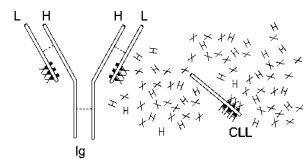
da Putnam FW, The Plasma Proteins Vol. III, pag. 14 modificado

17/06/04

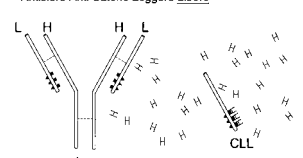
4

## Antisueros anti Cadenas Ligeras – Esquema Reacción

Antisiero Anti Catene Leggere Libere e Legate (Totali)



Antisiero Anti Catene Leggere Libere



**As. Cadenas Ligeras Ligadas y Libres**  
Anticuerpos contra todos los determinantes antigénicos de las CLL, tanto aquellos "ocultos" (Hidden) como aquellos "no ocultos".  
Reaccionan indistintamente con:

- **Ig**: enteras sítos antigénicos "no ocultos" de las CL que componen las Ig
- **CLL**: determinantes "no ocultos" y "ocultos".

**As. Cadenas Ligeras Libres**  
Se obtiene del precedente por eliminación de los anticuerpos contra los sítos "no ocultos".  
Reacciona exclusivamente con

- **CLL**: determinantes "ocultos".

H Anticorpo Anti determinante Nascoisti (Hidden)

X Anticorpo Anti determinante Esposto

◆ Determinante Nascoisti (Hidden)

▲ Determinante Esposto

17/06/04

5

## Las CLL hoy (150 años después de Bence-Jones)

### La dimensión del problema (en EEUU) – (CAP '99)

- Mieloma Múltiple (MM): **13.000** nuevos casos anuales
- MGUS: **> 1.000.000** nuevos casos anuales
- Otras enfermedades inmunoproliferativas (Waldenström, Amiloidosis,...) **< 5.000** nuevos casos anuales
- Transformación desde MGUS a MM: **alrededor del 1,5% anual (aprox. 15.000)**
- **REFLEXION:**  
**Todos los MGUS, y no sólo los pacientes con enfermedad manifiesta, deben ser controlados de manera periódica, con una serie de pruebas diagnósticas que deben incluir la determinación en orina de las CLL (BJP)**

17/06/04

6

## 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 reliquifies 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.

17/06/04

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

*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.**

una reflexión a título personal :

deberíamos preguntarnos si hoy en día mantenemos siempre esta colaboración y valorar que podríamos ganar todos con ella

17/06/04

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

**En 1847,**

**H.B. Jones había descubierto el primer marcador tumoral, y**

- describía las particulares características químico-físicas de la muestra.
- (**¡ acierto !**) hipotetizaba que eran atribuibles a la presencia de una proteína anómala.
- (**¡ error !**) un deutosido hidrato de albúmina.

**pero, ante todo,**

- (**¡ acierto !**) **sugería la búsqueda de tal proteína en los pacientes con sospecha clínica de "Mollities Ossium" (Mieloma Múltiple)**

17/06/04

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

**Jones había intuido el papel central de la BJP en el diagnóstico y seguimiento 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 las BJP se ha extendido a:

- **todas las enfermedades inmunoproliferativas**
- Amiloidosis AL
- Enfermedad de Depósito de las Cadenas Ligeras Libres

17/06/04

## 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.

17/06/04

## Las CLL hoy (150 años después) – puntos demostrados (1)

- **En el sujeto normal se encuentran presentes CLL en todos los líquidos biológicos, sangre, orina y LCR, 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**

17/06/04

## Las CLL hoy (150 años después) – puntos demostrados (2)

- En al menos el **80%** de los Mielomas está presente la BJP
- El **20%** de los mielomas es micromolecular, excreta sólo BJP (CLL Monoclonales), que se evidencian en la orina y en muchos casos 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**

17/06/04

**Las CLL hoy (150 años después) – puntos demostrados (3)**

- En al menos el 80% de los Mielomas está presente la BJP
- El 20% de los mielomas es micromolecular, excreta sólo BJP (CLL Monoclonales), que se evidencian en la orina y en muchos casos 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 lo dicho anteriormente,**

- El estudio cualitativo y cuantitativo de la BJP tiene una importancia fundamental en el diagnóstico y seguimiento de las gammopatías monoclonales (GM)
- La presencia de BJP es uno de los criterios fundamentales para distinguir entre Mieloma y MGUS (GMSI)

**Conclusion:**

- Es indispensable incluir siempre el análisis del suero y de la orina, en el protocolo de estudio de las Gammopatías Monoclonales (Mieloma, MGUS, ...)

**Las CLL hoy (150 años después) – puntos a definir: Teóricos**

**Teóricos**

- ¿porqué existen dos tipos de Cadenas Ligeras ?
- ¿porqué producimos y catabolizamos 170 mg/día de CLL ?
- ¿sigue esta producción un ritmo constante ?
- ¿cual es la función de las CLL ?

**Las CLL hoy (150 años después) – puntos a definir: Prácticos**

**Prácticos** – hoy en día 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 / 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)
- **Inexistencia Estándar de referencia**
- **Anomalías y sus correlaciones clínicas**
  - Cualitativas: monoclonales / policlonales
  - Cuantitativas
- **Informe y comparación de los resultados**

**Terminología (3) – Componente Monoclonal (CM)**

**Definición general de CM :**

Anomalia 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 Ligera].

**Un CM es una señal de**

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

**Terminología (3) – Componente Monoclonal (CM)**

Los CM pueden estar constituidos por:

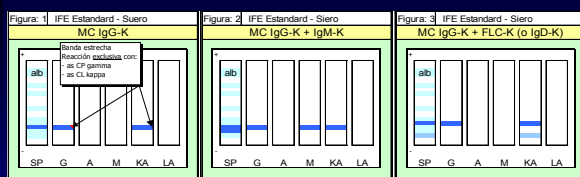
- Inmunoglobulinas Enteras
- sólo la Cadena Pesada
- sólo la Cadena Ligera (Cadena Ligera Libre)
- una combinación de las precedentes

**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.

**Advertencias:**

la monoclonalidad no se expresa obligatoriamente con la típica "banda estrecha", un clon maligno de Células-B puede producir una banda ancha que, sin embargo, reacciona sólo con el antisuero de una de las dos clases de CL [7].

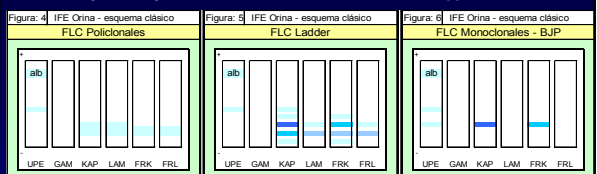


**Terminología (3) – Cadenas Ligeras Libres (orina)**

- ❖ **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

**Advertencias:**

la monoclonalidad no se expresa obligatoriamente con la típica "banda estrecha", un clon maligno de Células-B puede producir una banda ancha que, sin embargo, reacciona sólo con el antisuero de una de las dos clases de CL [7].



19

## Características y problemática de las CLL

### “Heterogeneidad de la homogeneidad”

Las Ig y las CL, 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 antígenicos → reactividad en las técnicas inmunológicas
- del metabolismo y la función

17/06/04

20

## Características y problemática de las CLL

### “Heterogeneidad de la homogeneidad”

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*

17/06/04

21

## CLL - Fisiopatología y Metabolismo - Introducción

### Metabolismo de las CLL- Normal

170 mg/día

Plasmacélulas

Circulo

Glomérulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Sangre 2 mg/dl

Pre-orina

Filtrado glomerular

Orina trazas

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- tetramero 88.000

Las células plasmáticas sintetizan un 10-20% de CLL en exceso (= 170 mg/día) no incluidas en las Ig, que son casi inmediatamente filtradas por el riñón. ¿Cual es púes la función real de estas CLL ?

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

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 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 estan 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.

17/06/04

22

## CLL - Fisiopatología y Metabolismo - Introducción

### Metabolismo de las CLL- Normal

170 mg/día

Plasmacélulas

Circulo

Glomérulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Sangre 2 mg/dl

Pre-orina

Filtrado glomerular

Orina trazas

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- tetramero 88.000

### Eliminación de las CLL – Función del Riñón

Analogamente a como sucede con las demás proteínas de bajo peso molecular: beta2-micro, alfa1-micro, etc., las CLL son filtradas fácilmente a través del glomérulo renal y son reabsorvidas por el túbulo proximal donde son catabolizadas a aminoácidos que son reimmeros 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 efectua dos operaciones:

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

17/06/04

23

## CLL - Fisiopatología y Metabolismo - Introducción

### Metabolismo de las CLL- Normal

170 mg/día

Plasmacélulas

Circulo

Glomérulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Sangre 2 mg/dl

Pre-orina

Filtrado glomerular

Orina trazas

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- tetramero 88.000

### 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 aminoácidos libres 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.

17/06/04

24

## CLL - Fisiopatología y Metabolismo - Alteraciones

### Metabolismo CLL – Aumento Producción

> 170 mg/día

Plasmacélulas

Circulo

Glomérulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Sangre > 2 mg/dl

Pre-orina

Filtrado glomerular normal

Orina FLC medibles

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- tetramero 88.000

### Aumento de producción

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

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.

17/06/04

25 **CLL - Fisiopatología y Metabolismo (a) - Alteraciones**

**Metabolismo CLL – Reducción catabolismo**

170 mg/día

Plasmacitoblastos

Cerebro

Glomerulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Riñon

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- (tetramero) 88.000

Sangre 2 mg/dl

Pre-orina Filtrado glomerular normal

Orina FLC medibles

**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 sustancias: aminoácidos, fármacos, etc.
- efecto:
  - cantidad normal de CLL en círculo 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.

17/06/04

26 **CLL - Fisiopatología y Metabolismo (a) - Alteraciones**

**Metabolismo CLL – Aumento en círculo**

170 mg/día

Plasmacitoblastos

Cerebro

Glomerulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Riñon

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- (tetramero) 88.000

Sangre > 2 mg/dl Acúmulo

Pre-orina Filtrado glomerular reducido

Orina FLC Trazas

**Aumento de las CLL en la Sangre**

- causa
  - insuficiente filtración glomerular respecto a la carga actual de CLL
- primera hipótesis:
  - síntesis de CLL normal
    - en pacientes con Filtrado Glomerular inferior a 5-10 ml/min y sin presumible 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].

17/06/04

27 **CLL - Fisiopatología y Metabolismo (a) - Alteraciones**

**Metabolismo CLL – Aumento en círculo**

> 170 mg/día

Plasmacitoblastos

Cerebro

Glomerulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: <60 minutos

Riñon

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- (tetramero) 88.000

Sangre > 2 mg/dl Acúmulo

Pre-orina Filtrado glomerular reducido

Orina FLC medibles

**Aumento de las CLL en la Sangre**

- causa
  - insuficiente filtración glomerular respecto a la carga actual de CLL
- primera hipótesis:
  - síntesis de CLL normal
    - en pacientes con Filtrado Glomerular inferior a 5-10 ml/min y sin presumible 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].
- segunda hipótesis:
  - 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 Micromolecular y BJP elevadísima, superior a 400 mg/dl (y 4600 mg/día), pueden presentar una concentración sérica de CLL normal [6].

17/06/04

28 **CLL - Fisiopatología y Metabolismo (a) - Alteraciones**

**Metabolismo CLL – Aumento Producción**

> 170 mg/día

Plasmacitoblastos

Cerebro

Glomerulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Riñon

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- (tetramero) 88.000

Sangre > 2 mg/dl

Pre-orina Filtrado glomerular normal

Orina FLC medibles

**Aumento de CLL en la Orina**

- causa - 1ª posibilidad
  - 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

17/06/04

29 **CLL - Fisiopatología y Metabolismo (a) - Alteraciones**

**Metabolismo CLL – Reducción catabolismo**

170 mg/día

Plasmacitoblastos

Cerebro

Glomerulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Riñon

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- (tetramero) 88.000

Sangre 2 mg/dl

Pre-orina Filtrado glomerular normal

Orina FLC medibles

**Aumento de CLL en la Orina**

- causa - 1ª posibilidad
  - 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
- causa - 2ª posibilidad
  - 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.

17/06/04

30 **CLL - Fisiopatología y Metabolismo (a) - Alteraciones**

**Metabolismo CLL – Aumento Producción**

> 170 mg/día

Plasmacitoblastos

Cerebro

Glomerulo

Tubulo

Vejiga

Hemivida: 30-60 minutos

Riñon

● FLC kdal  
- monómero 22.000  
- dímero 44.000  
- (tetramero) 88.000

Sangre > 2 mg/dl

Pre-orina Filtrado glomerular normal

Orina FLC medibles

**Aumento de CLL en la Orina**

- Combinación de las dos situaciones precedentes:
  - aumento de la síntesis de CLL
  - reducción de la reabsorción específica del túbulo proximal

17/06/04

## CLL monoclonales en orina – Patologías relacionadas (1)

### CLL monoclonales (BJP)

- Mieloma Múltiple (de los que 15-20% Mieloma Micromoleculares)
- Macroglobulinemia de Waldenström
- Leucemia Linfocítica Crónica
- Enfermedad de Cadenas Pesadas  $\mu$
- 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” que produce efectos patológicos sobre todo en el riñón (el mieloma micromoleculares no es de por sí “más maligno” que otros mielomas)**

## CLL policlonales en orina – Patologías relacionadas (2)

### Cadenas Ligeras Libres Policlonales

- **Aumento de la producción Policlonal – enfermedades hiperinmunes**  
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 (3) - Generalidades

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 distinguir 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**

## Composición y Distribución – De Jim Kohn



35

## Técnicas de Estudio de las CLL (3)

### para las CLL habrá que determinar:

- **Individualidad Antigénica (Composición)**  
La presencia de CLL en la muestra 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 (nef.) directa** o con métodos indirectos.

17/06/04

36

## Técnicas de Estudio de las CLL (3)

La técnica de rutina que permite la verificación contemporánea de ambas características cualitativas:

- composición y
- distribución

es la Inmunofijación (IFE)

Ello es posible porque en realidad, la IFE no es una técnica individual sino que es un **protocolo constituido por dos técnicas:**

- técnica separativa: Electroforesis (EF)
- técnica inmunológica: Inmunoprecipitación sobre Soporte (IPS).

17/06/04

## Técnicas de Estudio de las CLL <sup>(3)</sup>

*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:** *test de primer nivel:* distribución Electroforesis
- **parámetro Screening:** *test de primer nivel:* composición (identidad antigénica) IPL (nef) directa, IPL (nef) 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 influencia la concentración en orina
  - **variabilidad de la proteinuria** desde fisiológica a mixta (tipo suero diluido con el añadido de componentes tubulares micromoleculares) que influencia las prestaciones de los métodos

## Métodos BJP <sup>(3)</sup> – Sensibilidad analítica BJP – Muestra-dependencia

Teóricamente

la **composición proteica de la muestra de orina** (proteinuria fisiológica, 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 CLL co-migración BJP con la Ig entera monoclonal, enmascaramiento por Ig policlonales

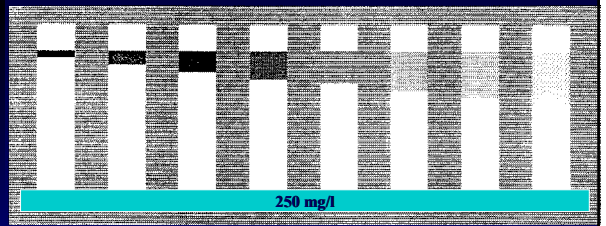
En estos casos **el aumento de sensibilidad es contraproducente** ya que actúa también sobre las "proteínas interferentes".

## Métodos FLC <sup>(3)</sup> – 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 disminuye 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**



## De Jim Kohn



La realidad a veces no es lo que parece pues depende del punto de vista

## De Jim Kohn - II



La realidad a veces no es lo que parece pues depende del punto de vista



- **Test químico-físicos tipo “termo-test”**
  - (+) bajo coste
  - (-) sensibilidad: NO
  - especificidad: NO
  - “obsoleto”
- **Tiras reactivas – “dip stik”**
  - (+) bajo coste
  - (-) sensibilidad: NO
  - especificidad: NO
  - “desaconsejada”
- **Proteínas Totales**
  - (+) bajo coste
  - automático e identificación de la muestra
  - (-) sensibilidad: NO
  - especificidad: NO
  - reproducibilidad: NO
  - indicación concentración: NO

- **Electroforesis (tradicional)**
  - (+) bajo coste
  - (-) sensibilidad: método-dependiente muestra-dependiente
  - ¿ necesita concentración de la muestra ?
  - ¿ necesita coloración especial ?
  - especificidad: NO
  - reproducibilidad: NO
  - indicación concentración: NO
  - fiabilidad de la interpretación del resultado: SUBJETIVA

EF – Señal de positividad → Banda sospechosa ????

La BJP puede asumir cualquier posición

E. Bergon, M. Bergon  
Química Clínica  
2001 – 20(6)

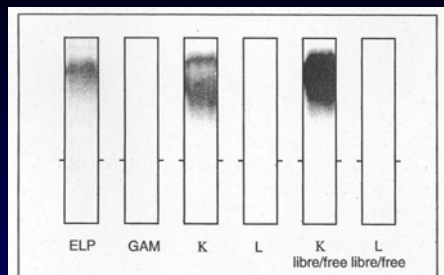
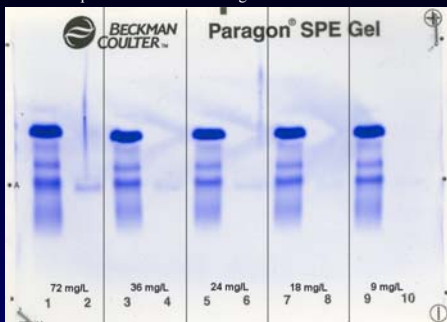


Figura 1. Inmunofijación de orina en gel de agarosa con antiseros dirigidos contra las inmunoglobulinas G, A y M y las cadenas ligeras kappa y lambda (totales y libres)

Derecha: muestra BJP positiva – diluida en PBS  
banda sospechosa hasta 9 mg/l

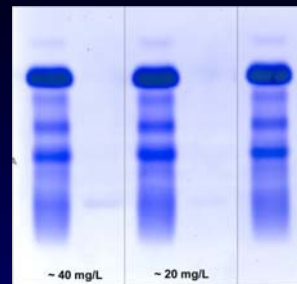
Izq.: spiked sample – idem usando como diluyente una orina con Proteinuria mixta  
banda sospechosa sólo hasta 72 mg/l



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

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 controproducente

49 **Métodos de Rutina – Electroforéticos/Inmunológicos**

- Inmunofijación con As. Anti CLL**
  - (+) método de referencia, electroforético e inmunológico a la vez
  - (?) coste medio
  - (-) sensibilidad: método-dependiente muestra-dependiente
    - ¿ necesita concentración de la muestra ?
    - ¿ necesita coloración especial ?
  - especificidad: NO para las CLL, SI para las Ig
  - reproducibilidad: NO
  - indicación cuantitativa: NO
  - fiabilidad de la interpretación del resultado: SUBJETIVA
- Inmunofijación con As. Anti CLL**
  - (+) método electroforético e inmunológico a la vez
  - (?) coste medio/alto
  - (-) sensibilidad: método-dependiente ~~muestra-dependiente~~
    - ¿ necesita concentración de la muestra ?
    - ¿ necesita coloración especial ?
  - especificidad: SI
  - reproducibilidad: NO
  - indicación cuantitativa : NO
  - fiabilidad de la interpretación del resultado: SUBJETIVA (menos)

17/06/04

50 **Metodos BJP (3) - 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**

Figura: 3 Schema di IFE urine di campione con CM IgG-k + k libera (BJP k)

A sinistra: IFE "tipo lento" con Antiseri anti CLT, senza Antiseri anti Ig. A destra: IFE con Antiserio anti Ig (polivalente Catene Pesanti) e antiseri anti CLT e CLL.

Referito: CM IgGk - **BJP assente** Referito: CM IgGk + **BJP k**

La BJP presente nel campione ha la stessa velocità di migrazione della immunoglobulina intera e pertanto non si evidenzia se non con l'uso degli antiseri anti Catena Leggera Libera.

17/06/04

51 **Metodos FLC (3) – IFE – Sensibilidad analítica y Muestra-dependencia**

Comparación entre :

- As. LC(B&F)
- As. FLC

**BJP de aprox. 10 mg/l comigrante con Ig policlonales**

17/06/04

52 **Métodos de Rutina – Inmunológicos (IPL)**

- IPL (nefelometria/turbidimetria) con As. Anti CLL + Indices**
  - (+) coste medio
  - automático e identificación de la muestra
  - reproducibilidad: SI
  - fiabilidad de la interpretación del resultado: OBJETIVA
  - (?) sensibilidad: buena pero muestra-dependiente
  - (-) especificidad: NO para las CLL, SI para las Ig
  - indicación cuantitativa: NO para las CLL, SI para las Ig
  - uso índices: Amplificación del Error
- IPL (nefelometria/turbidimetria) con As. Anti CLL**
  - (+) automático e identificación de la muestra
  - reproducibilidad: SI
  - especificidad: NO
  - fiabilidad de la interpretación del resultado: OBJETIVA
  - indicación cuantitativa: SI, con algunos límites
  - (?) coste medio/alto
  - sensibilidad: buena ~~pero muestra-dependiente~~
  - (-) uso índices: Amplificación del Error

17/06/04

53 **Antiseros anti Cadenas Ligeras – Esquema Reacción**

Antisero Anti Catene Leggere Libere e Legate (Totali)

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

**As. Cadenas Ligeras 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 Nascosto (Hidden)  
 X Anticorpo Anti determinante Esposto  
 ◆ Determinante Nascosto (Hidden)  
 ▲ Determinante Esposto

17/06/04

**Muestras Examinadas**

Campione	BJP kappa (Lavagna)			BJP lambda (Bellaria)		
	A1	A	B	A1	A	B
Diluizione						
Concentrazione orientativa mg/dl	1,8	0,7	0,3	1,8	0,7	0,2

**NOTAS**

- La concentración orientativa se relaciona a título informativo y fue obtenida *a posteriori* como la media de las medidas obtenidas con los métodos cuantitativos.
- Las muestras a la dilución "B" fueron examinadas solo por los Grupos "Forli" e "Liguria" y no se emplearon en multicentros sucesivos ("Lazio" y "Toscana-Umbria") porque se consideraron excesivamente bajas.

**"La cuestión es"**  
 Si las muestras hubiesen llegado a los laboratorios participantes con la solicitud de "Determinación de la Proteína de Bence Jones", ¿cuál habría sido la respuesta?

**Procedimiento Operativo**  
 Las muestras han sido analizadas con los métodos, tanto de primer nivel como de profundización, en uso en la rutina de los Laboratorios para la búsqueda de las BJP. En ocasiones se han efectuado distintas réplicas en distintas sesiones.

**Resultado Esperado**  
 Todas las Muestras deberían haber dado resultado positivo para el tipo de BJP indicado en la etiqueta identificativa del frasco.

**Sintesis Resultados**

**Tabla 1**

**Resumen comparativo de los métodos**  
Resultados cualitativos en n° de labs. que han usado cada método

Algunos Lab. han efectuado más de un método o más de una prueba por método

Metodo	Electroforesis	Immunofijación As CLT	Immunofijación As CLL	Nefelometría - Turbidimetría CLT (B&F)	Nefelometría - Turbidimetría CLL	Total
Laboratorios Test efectuados	26 240	39 344	28 316	23 389	32 750	52 2039
Muestr. kappa						
Dil. A1	pos 7	28	16	23	32	106
1.9 mg/dl	neg 19 73%	11 28%	12 43%	0 0%	0 0%	42
Dil. A	pos 1	17	9	13	31	71
0.6 mg/dl	neg 25 96%	22 56%	19 68%	10 43%	1 3%	77
Dil. B	pos 0	3	2	3	20	28
0.3 mg/dl	neg 13 100%	15 83%	14 88%	6 67%	3 13%	51
<b>Total</b>	pos 8	48	27	39	83	205
neg	57 88%	48 50%	45 63%	16 29%	4 5%	170
Muestr. lambda						
Dil. A1	pos 8	30	23	22	32	115
1.7 mg/dl	neg 18 69%	9 23%	5 18%	1 4%	0 0%	33
Dil. A	pos 1	13	11	18	31	74
0.6 mg/dl	neg 25 96%	26 67%	17 61%	5 22%	1 3%	74
Dil. B	pos 0	2	1	5	20	28
0.2 mg/dl	neg 13 100%	16 89%	15 94%	4 44%	3 13%	51
<b>Total</b>	pos 9	45	25	45	83	217
neg	56 86%	51 53%	37 51%	10 18%	4 5%	158
<b>Totales Generales</b>	pos 17	93	62	84	166	422
neg	113 87%	99 52%	62 57%	26 24%	8 5%	328
test	130	192	144	110	174	750

Abrev.: As = antisuero  
CLT (B&F) = Cadenas Ligeras Libres y ligadas o Cadenas Ligeras Totales (Bound&Free)  
CLL = Cadenas Ligeras Libres

**Sintesis Resultados**

**Tabla 2**

**Electroforesi**  
Risultati espressi in numero di Laboratori

Alcuni Laboratori hanno eseguito più metode

Metodo	Accetto	Paragon Proteur H&S	Hydragel nero	Hydragel violetto	Accetto Cell oro Helena	Rep Helena blu	Cipitare	Totali
Laboratori Test eseguiti	2 10	3 22	10 106	7 58	1 18	2 22	1 4	26 240
Camp. kappa								
Dil. A1	pos 0	2	1	3	0	1	0	7
1.9 mg/dl	neg 2	1	9	4	1	1	1	19
Dil. A	pos 0	1	0	0	0	0	0	1
0.6 mg/dl	neg 2	2	10	7	1	2	1	25
Dil. B	pos 0	0	0	0	0	0	0	0
0.3 mg/dl	neg 1	2	3	5	1	1	0	13
<b>Totali</b>	pos 0	3	1	3	0	1	0	8
neg	5	5	22	16	3	4	2	57
Camp. lambda								
Diluzione A1	pos 0	2	1	3	1	1	0	8
1.7 mg/dl	neg 2	1	9	4	0	1	1	18
Diluzione A	pos 0	1	0	0	0	0	0	1
0.6 mg/dl	neg 2	2	10	7	1	2	1	25
Diluzione B	pos 0	0	0	0	0	0	0	0
0.2 mg/dl	neg 1	2	3	5	1	1	0	13
<b>Totali</b>	pos 0	3	1	3	1	1	0	9
neg	5	5	22	16	2	4	2	56
<b>Totales Generales</b>	pos 8	6	2	6	1	2	0	17
neg	10	10	44	32	5	8	4	113
test	130	192	144	110	174	750		750

**Sintesis Resultados**

**Tabla 3**

**Immunofissazione**  
Risultati espressi in numero di Laboratori

Alcuni Laboratori hanno eseguito più metode

Sistema	As Catene Leggere Libere & Legate (CLT)										As Catene Leggere Libere (CLL)										Totali
	Beckman Paragon Proteur	Helma Fc Helena	Helma Auto IFE Helena	Helma Auto IFE Helena	Selba Hydragel	Accetto oro Daiti	Beckman Paragon Proteur	Helma Fc Helena	Helma Auto IFE Helena	Helma Auto IFE Helena	Selba Hydragel	Selba N.S.C	Accetto oro Daiti	Totali							
Laboratori Test eseguiti	9	2	4	1	22	1	39	2	2	2	2	17	2	1	28						
Camp. kappa																					
Dil. A1	pos 8	1	3	1	14	1	28	2	0	1	2	8	2	1	16						
1.9 mg/dl	neg 1	1	1	0	8	0	11	0	2	1	0	9	0	0	12						
Dil. A	pos 4	0	1	1	10	1	17	2	0	0	1	5	0	1	9						
0.6 mg/dl	neg 5	2	3	0	12	0	22	0	2	2	1	12	2	0	19						
Dil. B	pos 1	0	0	1	1	0	3	0	0	1	1	1	0	0	2						
0.3 mg/dl	neg 6	1	1	0	7	0	15	2	1	1	1	8	1	0	14						
<b>Totali</b>	pos 13	1	4	2	25	2	48	4	0	1	4	14	2	2	27						
neg	12	4	3	0	27	0	48	2	3	4	2	29	3	0	45						
Camp. lambda																					
Dil. A1	pos 8	1	3	1	16	1	30	2	1	1	2	14	2	1	23						
1.7 mg/dl	neg 1	1	1	0	6	0	9	0	1	1	0	3	0	0	5						
Dil. A	pos 3	0	0	0	9	1	13	2	0	1	1	5	1	1	11						
0.6 mg/dl	neg 6	2	4	1	13	0	26	0	2	1	1	12	1	0	17						
Dil. B	pos 1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1						
0.2 mg/dl	neg 6	1	1	1	7	0	16	2	1	1	2	8	1	0	15						
<b>Totali</b>	pos 12	1	4	2	26	2	42	4	1	2	3	20	3	2	35						
neg	11	4	6	2	26	0	47	2	4	3	2	21	2	0	35						
<b>Totales Generales</b>	pos 25	2	7	4	51	4	93	8	1	3	7	34	5	4	62						
neg	25	8	11	2	53	0	99	4	9	7	5	32	5	0	82						
test	192						144								144						

**Sintesis Resultados**

**Tabla 5**

**Nefelometria e Turbidimetria Catene Leggere (1) - Campione non concentrato**  
Risultati Quantitativi - Media e CV interlaboratorio

Alcuni Laboratori hanno eseguito fino a 10 replicata in 10 giorni diversi

Metodo Reagenze	Reag. Catene Leggere Libere & Legate (CLT)										Reag. Catene Leggere Libere (CLL)									
	BNA/BNII Beckman					Immagine <sup>TM</sup> Beckman					APS <sup>TM</sup> Beckman					Cobas Mira Daiti				
	Determinazioni complessive: 389					Determinazioni complessive: 746					Determinazioni complessive: 746					Determinazioni complessive: 746				
Laboratori Test	9	8	3	2	1	6	16	6	2	1	278	70	11	30	628	96	16	6	6	
Campione																				
kappa																				
Dil. A1	1.52	31%	1.53	19%	2.01	4%	1.51	n.c.	1.84	16%	2.09	9%	n.s.	n.c.	2.36	n.c.				
Dil. A	0.79	13%	0.61	n.c.	<0.55	n.c.	0.66	n.c.	0.73	22%	0.62	20%	n.s.	n.c.	0.93	n.c.				
Dil. B	0.80	n.c.	<0.55	n.c.	<0.55	n.c.	<	n.c.	0.34	28%	0.32	29%	n.s.	n.c.	neg	n.c.				
lambda																				
Dil. A1	1.97	12%	1.65	12%	1.84	18%	4.87	n.c.	1.75	5%	1.79	6%	n.s.	n.c.	1.96	n.c.				
Dil. A	0.92	13%	<1.5	n.c.	<1.5	n.c.	1.22	n.c.	0.67	17%	0.57	13%	n.s.	n.c.	0.72	n.c.				
Dil. B	0.40	3%	<1.5	n.c.	<1.5	n.c.	0.25	n.c.	0.18	42%	0.20	28%	n.s.	n.c.	neg	n.c.				

Legenda: n.c. = non calcolabile; n.s. = non significativo  
(1) Nel protocollo di ricerca della BJP il test è considerato di primo livello. Sui campioni positivi si eseguono EF e/o IFE  
(2) I risultati strumentali sono stati divisi per il fattore 3.33

**Multicentrico BJP - España: Resultados (Tabla Resumen)**

Metodo	Electroforesis	Immunofijación as. anti CLT	Immunofijación as. anti CLL	Nefelometría as. anti CLT	Nefelometría as. anti CLL	TOTAL
Laboratorios Test efectuados	12 54	15 74	13 68	16 117	12 87	24 400
Lambda A1	pos 0	3	3	16	21	43
1.7 mg/dl	neg 14 100%	16 84%	15 83%	15 48%	0 0%	60 58%
Lambda A	pos 0	0	0	16	16	32
0.6 mg/dl	neg 13 100%	18 100%	16 100%	12 43%	6 27%	65 67%
Kappa A1	pos 1	5	1	23	22	52
1.7 mg/dl	neg 13 93%	14 74%	17 94%	8 25%	0 0%	52 98%
Kappa A	pos 1	1	1	4	17	23
0.6 mg/dl	neg 12 92%	17 94%	16 100%	23 85%	5 23%	73 76%
<b>TOTAL</b>	pos 2	9	4	59	76	150
neg	52 86%	65 88%	64 84%	58 50%	11 13%	250 83%

Abreviaturas: as. = antisuero  
CLT = cadenas ligeras (libres y ligadas) = cadenas ligeras totales  
CLL = cadenas ligeras libres  
pos. = positivo  
neg. = negativo

