



**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**UTILIDAD DE UN PROTOCOLO DE  
ESTUDIO DE PROTEINURIA EN EL  
DIAGNÓSTICO DE GAMMAPATÍAS  
MONOCLONALES.**

Memoria presentada por la Licenciada  
**Eulalia Gil González**  
para optar al Grado de Doctor  
por la Facultad de Medicina de  
la Universidad de Sevilla. 2007.

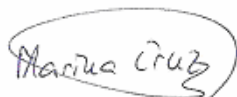
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE MEDICINA

D<sup>a</sup> Carmen Osuna Fernández, Profesora titular de Universidad del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular y Decana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

**INFORMA QUE:**

D<sup>a</sup> Eulalia Gil González, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo su supervisión, junto con la dirección de la Dra. Marina Cruz Ruiz y el Dr. Fernando Recio Quijano, en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla, el trabajo: *"UTILIDAD DE UN PROTOCOLO DE ESTUDIO DE PROTEINURIA EN EL DIAGNÓSTICO DE GAMMAPATÍAS MONOCLONALES"*, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de doctora.

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> Directores



Dra. Marina Cruz Ruiz



Dr. Fernando Recio Quijano

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> del Tutor



Dra. Carmen Osuna

El Doctorando



Eulalia Gil González

---

*Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis.*

*En primer lugar, a mis directores de tesis, la Dra. Marina Cruz y el Dr. Fernando Recio, por depositar en mí su confianza y transmitirme su ilusión en el trabajo, así como sus conocimientos científicos (a pesar de la distancia), sin los cuales esta tesis doctoral no podría haberse realizado.*

*A la Dra. Carmen Osuna, tutora de la tesis, por ofrecerme su apoyo y facilitarme la realización de esta tesis.*

*A la Dra. Inés Camacho, por su aliento y su apoyo constante, siempre dispuesta a escucharme cuando lo necesitaba.*

*A la Dra. Ana Fernández y la Dra. Carmen Almeida, por su ayuda desinteresada en el estudio estadístico.*

*A Pilar Izquierdo y Mónica Cala, por estar siempre disponibles cuando necesitaba ayuda en la búsqueda de conocimientos.*

*A María Jover, por ser una luz en el laberinto de papeles que he tenido que mover para poder presentar esta tesis.*

*A todo el personal del laboratorio que ha participado de una forma u otra en el estudio analítico realizado.*

*Por último, a Valentín, mi marido, y a mis hijos, Laura y Valentín, por su ayuda, ánimo y comprensión, que han hecho más llevaderas las situaciones difíciles.*

---

---

*Para mi marido, mis hijos y mis padres  
por su apoyo incondicional.*

---

# *ÍNDICE*

---



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1-84</b>
<b>1. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. DEFINICIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. CLASIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES CLÍNICAMENTE</b>	
<b>MANIFIESTAS.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.1. NEOPLASIAS DE CÉLULAS B.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.1.1. Mieloma Múltiple.....</b>	<b>9</b>
- Incidencia.....	9
- Criterios diagnósticos.....	10
- Signos y síntomas clínicos.....	11
- Clasificación.....	12
- Formas clínicas especiales.....	14
- Pronóstico.....	15
- Estadificación.....	16
<b>1.2.1.1.2. Enfermedades linfoproliferativas.....</b>	<b>18</b>
- Macroglobulinemia de Waldenström.....	18
- Tumores linfoides.....	19
<b>1.2.1.2. OTRAS ENFERMEDADES RELACIONADAS</b>	
<b>CON COMPONENTES MONOCLONALES.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1.2.1. Crioglobulinemias.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1.2.2. Amiloidosis.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1.2.3. Enfermedad por depósito de cadenas ligeras.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1.2.4. Síndrome de Fanconi.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES CLÍNICAMENTE</b>	
<b>SILENTES.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.2.1. GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE</b>	
<b>SIGNIFICADO INCIERTO.....</b>	<b>24</b>
- Criterios diagnósticos.....	25
- Prevalencia.....	25
<b>1.2.2.2. PROTEINURIA DE BENCE JONES IDIOPÁTICA.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.2.3. MIELOMA MÚLTIPLE ASINTOMÁTICO.....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.2.4. GAMMAPATÍA MONOCLONAL TRANSITORIA.....</b>	<b>28</b>

<b>1.3. FACTORES PRONÓSTICOS EN GAMMAPATÍAS</b>	
<b>MONOCLONALES CLÍNICAMENTE SILENTES</b> .....	29
<b>1.3.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS</b> .....	29
<b>1.3.2. MARCADORES GENÉTICOS</b> .....	30
<b>1.3.3. ANGIOGÉNESIS EN MÉDULA ÓSEA</b> .....	30
<b>1.3.4. FACTORES DE RIESGO DE MALIGNIZACIÓN</b> .....	30
<b>2. PROTEINURIA</b> .....	35
<b>2.1. DEFINICIÓN</b> .....	35
<b>2.1.1. ESTRUCTURA RENAL</b> .....	35
<b>2.1.2. FORMACIÓN DE LA ORINA</b> .....	37
- Filtración glomerular.....	37
- Reabsorción tubular.....	40
<b>2.2. MARCADORES PROTEICOS PARA LOCALIZAR</b>	
<b>LA LESIÓN RENAL</b> .....	43
<b>2.2.1. MARCADORES GLOMERULARES</b> .....	44
- Albúmina.....	44
- Transferrina.....	44
- Inmunoglobulina G.....	45
- Índice de selectividad glomerular.....	45
<b>2.2.2. MARCADORES TUBULARES</b> .....	46
- $\alpha$ 1-microglobulina.....	46
- Otros marcadores tubulares.....	47
- Proteína de Tamm-Horsfall.....	48
<b>2.2.3. MARCADORES PRE-RENALES</b> .....	48
- Cadenas ligeras libres.....	48
- Otras proteínas.....	49
<b>2.2.4. MARCADORES POSTRENALES</b> .....	49
- $\alpha$ 2-macroglobulina.....	49
<b>2.3. VALORACIÓN DE LA PROTEINURIA</b> .....	51
<b>2.4. PREVALENCIA DE PROTEINURIA</b> .....	53
<b>2.5. MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS DE PROTEINURIA</b> .....	55
<b>2.5.1. PROTEINURIA GLOMERULAR</b> .....	55



---

2.5.2. PROTEINURIA TUBULAR.....	57
2.5.3. PROTEINURIA POR SOBRECARGA.....	59
2.5.4. PROTEINURIA POSTRENAL.....	60
2.6. GRADOS DE PROTEINURIA.....	61
2.7. REPERCUSIONES DE LA PROTEINURIA.....	62
2.7.1. REPERCUSIONES RENALES.....	62
2.7.2. REPERCUSIONES GENERALES.....	65
3. GAMMAPATÍA MONOCLONAL Y PROTEINURIA.....	66
3.1. NEFROTOXICIDAD DE LA PROTEINURIA DE CADENAS LIGERAS LIBRES.....	67
3.2. PATRONES DE DAÑO RENAL EN LA GAMMAPATÍA MONOCLONAL.....	69
4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN ORINA.....	72
4.1. MÉTODOS CUALITATIVOS Y SEMICUANTITATIVOS.....	74
4.1.1. TIRAS REACTIVAS.....	74
4.1.2. PRECIPITACIÓN PROTEICA.....	75
4.1.3. ELECTROFORESIS.....	75
4.2. MÉTODOS CUANTITATIVOS.....	78
4.2.1. MÉTODOS TURBIDIMÉTRICOS.....	78
4.2.2. MÉTODOS DE UNIÓN A COLORANTES.....	78
4.2.3. MÉTODOS QUÍMICOS.....	79
4.3. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.....	81
4.3.1. INMUNOELECTROFORESIS.....	81
4.3.2. INMUNOPRECIPITACIÓN.....	82
4.3.3. INMUNOENSAYOS.....	83
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	85-90
III. OBJETIVOS.....	91-94

---

<b>IV. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>95-112</b>
<b>1. MATERIAL.....</b>	<b>97</b>
<b>1.1. PROTOCOLO DE INCLUSIÓN DE PACIENTES.....</b>	<b>97</b>
<b>1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE PACIENTES</b>	
<b>EN EL PROTOCOLO.....</b>	<b>101</b>
<b>1.3. SELECCIÓN DE PUNTOS DE CORTE DEL</b>	
<b>COCIENTE KAPPA/LAMBDA EN ORINA.....</b>	<b>102</b>
<b>2. MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>103</b>
<b>2.1. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>103</b>
- Proteínas totales en orina.....	103
- Creatinina en orina.....	103
- Leucocitos y hematíes en orina.....	103
- Alfa-1-microglobulina, microalbúmina e inmunoglobulina G en orina;	
cadenas ligeras Kappa y Lambda totales en suero;	
inmunoglobulinas A, G y M en suero.....	103
- Cadenas ligeras libres Kappa y Lambda en orina.....	104
- Proteinograma.....	104
- Identificación inmunológica de componentes monoclonales.....	104
<b>2.2. PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACIÓN DE LA ORINA.....</b>	<b>110</b>
- Concentración con sistema VIVASPIN 20.....	110
- Concentración con el sistema YM-30 Microcon.....	110
<b>3. MÉTODO ESTADÍSTICO.....</b>	<b>112</b>
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>113-154</b>
<b>1. PROTOCOLO DE ESTUDIO CUANDO APARECE UNA</b>	
<b>PROTEINURIA.....</b>	<b>115</b>
<b>2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL COCIENTE ENTRE</b>	
<b>PROTEÍNAS ESPECÍFICAS Y PROTEÍNAS TOTALES.....</b>	<b>117</b>

---

<b>3. SELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE CORTE DEL COCIENTE</b>	
<b>KAPPA/LAMBDA EN ORINA.....</b>	<b>118</b>
<b>4. COMPARACIÓN DE DOS PROCEDIMIENTOS DE</b>	
<b>CONCENTRACIÓN DE ORINA.....</b>	<b>120</b>
<b>5. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....</b>	<b>122</b>
<b>5.1 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN MUESTRAS DE ORINA.....</b>	<b>122</b>
<b>5.2. SEXO Y EDAD DE LOS PACIENTES.....</b>	<b>125</b>
<b>5.2.1. DISTRIBUCIÓN POR SEXO.....</b>	<b>125</b>
<b>5.2.2. DISTRIBUCIÓN POR EDAD.....</b>	<b>126</b>
<b>5.3. COMPONENTE MONOCLONAL EN SUERO.....</b>	<b>128</b>
<b>5.4. CONCENTRACIONES MÍNIMAS DEL</b>	
<b>COMPONENTE M EN ORINA.....</b>	<b>131</b>
<b>5.4.1. PICOS KAPPA.....</b>	<b>131</b>
<b>5.4.2. PICOS LAMBDA.....</b>	<b>132</b>
<b>5.5. PETICIONES DE PROTEINURIA DE BENICE JONES</b>	
<b>POR EL CLÍNICO.....</b>	<b>134</b>
<b>5.6. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PROTOCOLO.....</b>	<b>138</b>
<b>5.7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....</b>	<b>140</b>
<b>5.7.1. PACIENTES CON PROTEINURIA DE BENICE JONES.....</b>	<b>140</b>
<b>5.7.2. PACIENTES CON COMPONENTE M EN SUERO</b>	
<b>SIN PROTEINURIA DE BENICE JONES.....</b>	<b>146</b>
<b>5.8. PATOLOGÍA RENAL SEGÚN MARCADORES PROTEICOS.....</b>	<b>148</b>
<b>5.8.1. PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE Y</b>	
<b>CREATININA EN SUERO NO PATOLÓGICA.....</b>	<b>148</b>
<b>5.8.2. PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE Y</b>	
<b>CREATININA EN SUERO PATOLÓGICA.....</b>	<b>149</b>
<b>5.8.3. PACIENTES CON GM “SMOLDERING”.....</b>	<b>149</b>
<b>5.8.4. PACIENTES CON MGUS, PBJ &lt; 1000 MG/G CREAT.</b>	
<b>Y CREATININA EN SUERO NO PATOLÓGICA.....</b>	<b>150</b>
<b>5.8.5. PACIENTES CON MGUS, PBJ &lt; 1000 MG/G CREAT.</b>	
<b>Y CREATININA EN SUERO PATOLÓGICA.....</b>	<b>150</b>
<b>5.8.6. PACIENTES CON MGUS Y PBJ &gt; 1000 MG/G CREAT.....</b>	<b>151</b>

5.8.7. PACIENTES CON OTRAS ENFERMEDADES LINFOPROLIFERATIVAS.....	152
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>155-208</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO DE PROTEINURIA.....</b>	<b>157</b>
1.1. ESTUDIO DE PROTEINURIA EN ENFERMEDADES SISTÉMICAS.....	157
1.2. ESTUDIO DE PROTEINURIA EN PACIENTES CON GAMMAPATÍA MONOCLONAL.....	163
1.3. IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DE PROTEINURIA DE BENCE JONES.....	165
1.3.1. FACTOR PRONÓSTICO EN LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.....	165
1.3.2. NEFROTOXICIDAD.....	167
<b>2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS. VENTAJAS Y DESVENTAJAS.....</b>	<b>169</b>
2.1. PROTEÍNAS TOTALES.....	169
2.2. PROTEÍNAS ESPECÍFICAS.....	170
2.3. PROTEINA DE BENCE JONES.....	171
2.4. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS.....	178
2.4.1. ANÁLISIS DE SUERO MEDIANTE ELECTROFORESIS.....	178
2.4.2. ANÁLISIS DE ORINA MEDIANTE ELECTROFORESIS.....	180
<b>3. ELECCIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO.....</b>	<b>186</b>
3.1. ELECCIÓN DEL TIPO DE MUESTRA DE ORINA.....	186
3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE MUESTRAS Y PACIENTES.....	188
3.3. ELECCIÓN DEL PUNTO DE CORTE DE PROTEINURIA.....	189
3.4. ELECCIÓN DEL PUNTO DE CORTE DEL COCIENTE PROTEÍNA/CREATININA EN ORINA.....	190
3.5. ESTUDIO DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS URINARIAS. Elección del punto de corte del Cociente (albúmina + IGGO + $\alpha$ 1-microglobulina)/proteínas totales.....	192

---

<b>3.6. ESTUDIO DE CADENAS LIGERAS LIBRES.</b>	
Cociente kappa/lambda .....	194
<b>3.7. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS PROCEDIMIENTOS</b>	
<b>DE CONCENTRACIÓN DE ORINA.....</b>	<b>197</b>
<b>4. EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DEL PROTOCOLO.....</b>	<b>199</b>
<b>4.1. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LAS MUESTRAS DE ORINA....</b>	<b>199</b>
<b>4.2. DISTRIBUCIÓN POR SEXO Y EDAD.....</b>	<b>200</b>
<b>4.3. COMPONENTES MONOCLONALES EN SUERO.....</b>	<b>201</b>
<b>4.4. CONCENTRACIONES MÍNIMAS DE COMPONENTES</b>	
<b>MONOCLONALES EN ORINA.....</b>	<b>202</b>
<b>4.5. PETICIONES DE PROTEINURIA DE BENICE JONES</b>	
<b>POR EL CLÍNICO.....</b>	<b>203</b>
<b>4.6. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PROTOCOLO.....</b>	<b>205</b>
<b>4.7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....</b>	<b>206</b>
<b>4.8. MARCADORES PROTEICOS.....</b>	<b>208</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>209-212</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>213-224</b>
<b>ANEXO. Abreviaturas.....</b>	<b>225-229</b>

# ***I - INTRODUCCIÓN:***

---



# **1. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES:**

## **1.1. DEFINICIÓN:**

Las **gammapatías monoclonales** incluyen una serie de procesos caracterizados por proliferación clonal de células plasmáticas o de sus progenitores pertenecientes a la estirpe de linfocitos B. Esta proliferación suele llevar aparejado un aumento de alguna inmunoglobulina (Ig) en suero y/u orina <sup>1</sup>. La alteración de la síntesis de inmunoglobulinas responsable de una gammapatía monoclonal puede ser consecuencia de una transformación maligna en algún estadio de la maduración de la serie linfática B, puede deberse a una respuesta inmunológica específica, o bien presentarse sin ninguna causa detectable <sup>2</sup>.

Es importante distinguirlas de las gammapatías policlonales, que representan aumentos en los niveles de anticuerpos con varias cadenas pesadas y ambos tipos de cadenas ligeras, y se observan generalmente como reacción a un proceso inflamatorio, infecciones crónicas (como SIDA), enfermedad hepática, trastornos autoinmunes (como lupus eritamoso sistémico, artritis reumatoide o esclerosis múltiple), así como el cáncer y la Diabetes Mellitus <sup>1,3,4</sup>. También puede existir una respuesta oligoclonal, es decir, sólo un número restringido de clonas responde a la estimulación antigénica, que se traduce en la electroforesis como múltiples bandas sobre un fondo difuso; este fenómeno se observa, por ejemplo, en las inmunodeficiencias o después de un trasplante de médula ósea, pues en estas circunstancias sólo algunas clonas de células B pueden responder al antígeno; aunque, como ocurre en el caso de trasplante medular, a medida que el injerto prolifera, cada vez aparecen más clonas y el patrón electroforético se convierte progresivamente en policlonal <sup>5</sup>.

La frecuencia de presentación de gammapatías monoclonales varía según la población estudiada, y ha aumentado al mejorar la sensibilidad analítica de los procedimientos electroforéticos utilizados para su detección. Con la resolución actual de estos procedimientos, la prevalencia en mayores de 25 años es del 1%, en los de 50 años está comprendida entre un 1 y un 2%, alrededor del 3% en los mayores de 70 años, y se acerca al 10% en los grupos de más de 80 años. Aunque hay numerosos



datos en este sentido, la mayoría de los estudios están sesgados en función de la duración de la investigación, el tamaño y la selección de la muestra estudiada, y la utilización clínica del proteinograma <sup>2,6</sup>.

En condiciones normales, la maduración de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos es estimulada por la exposición al antígeno para el que la inmunoglobulina de superficie posee especificidad; sin embargo, en los trastornos de las células plasmáticas se pierde el control de este proceso <sup>7</sup>.

Las inmunoglobulinas (también llamadas anticuerpos) son los productos de las células B diferenciadas, y son las mediadoras del componente humoral de la reacción inmunitaria. Las funciones principales de los anticuerpos son la unión específica al antígeno y la inactivación o eliminación de toxinas, microbios, parásitos y otras sustancias extrañas nocivas para el organismo <sup>8</sup>.

Todas las inmunoglobulinas tienen una estructura básica de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cuatro cadenas se unen de forma covalente por puentes disulfuro. Cada cadena se compone de una región variable (V) y de varias regiones constantes (C), formadas a su vez por unidades de 110 aminoácidos. Las cadenas ligeras tienen una región variable (VL) y una constante (CL). Las cadenas pesadas tienen una región variable (VH) y tres o cuatro constantes (CH), dependiendo del isotipo. Las regiones constantes están formadas por secuencias homólogas y comparten la misma estructura primaria con todas las demás cadenas de isotipo y subclase semejante. Las regiones constantes participan en las funciones biológicas de las moléculas de inmunoglobulinas. Las regiones variables (VL y VH) constituyen las regiones de la molécula que se unen al anticuerpo (Fab). Dentro de ambas regiones se encuentran las regiones hipervariables (secuencias de variabilidad extrema) que constituyen lugares de unión al antígeno únicos de cada molécula de inmunoglobulina <sup>8</sup>.

Las moléculas de inmunoglobulinas que forman los determinantes antigénicos tienen tres categorías de variaciones estructurales que se utilizan para clasificarlas. Los **isotipos** son los determinantes que distinguen a las principales clases de anticuerpos de una determinada especie y son iguales en todos los individuos normales de esa especie.

Por tanto, los determinantes isotípicos son, por definición, reconocidos por los anticuerpos de una especie distinta (sueros heterólogos), pero no por los anticuerpos de la misma especie (sueros homólogos). Hay cinco isotipos de cadenas pesadas (M, G, A, D, E) y dos isotipos de cadenas ligeras (kappa y lambda). Los **alotipos** son determinantes específicos que reflejan las pequeñas diferencias constantes que presentan los individuos de la misma especie en las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas, por lo demás similares. Por definición, son detectados por los anticuerpos formados por la misma especie. Los **idiotipos** son el tercer grupo de determinantes antigénicos, exclusivos de las moléculas elaboradas por un determinado clon de células productoras de anticuerpos; están formados por una estructura exclusiva de la porción de la molécula que se une al antígeno, es decir, de la región variable de las inmunoglobulinas. Los idiotipos son marcadores fidedignos de un determinado clon de células, porque cada anticuerpo es elaborado y secretado por un solo clon. Dada la mecánica de los reordenamientos génicos que se necesitan para codificar las regiones variables de las inmunoglobulinas, un determinado clon sólo reordena uno de los dos cromosomas para producir una molécula de inmunoglobulina que posee un solo isotipo de cadena ligera y un solo alotipo (exclusión alélica). Esto da lugar a que cada clon produzca una sola clase de moléculas de inmunoglobulinas <sup>7</sup>.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgG (que a su vez tiene cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (que también tiene dos subclases: IgA1 e IgA2), IgM, IgD e IgE (que no tienen subclases) <sup>4</sup>.

La mayoría de las células sintetiza un ligero exceso de cadenas ligeras, que son secretadas como cadenas libres por las células plasmáticas <sup>7</sup>. Las cadenas ligeras libres son filtradas a través de los glomérulos, reabsorbidas por las células tubulares proximales por endocitosis mediada por los receptores multiligando cubilina y mesalina, y rápidamente catabolizadas a aminoácidos por la acción de enzimas lisosomales. Más del 90% de las cadenas ligeras libres filtradas son normalmente degradadas por las células tubulares proximales y la fracción no catabolizada excretada en la orina es menor de 10 mg en 24 horas <sup>9</sup>.

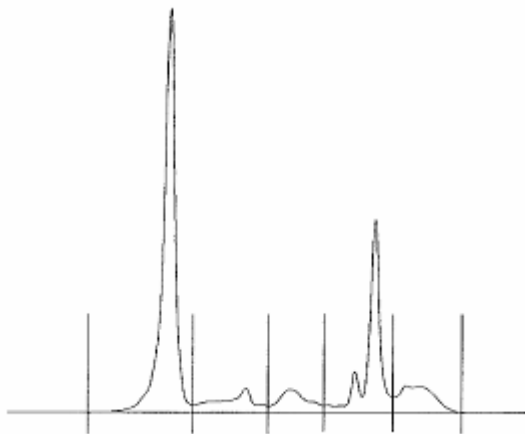
Según el trabajo de Abe, M et al. <sup>3</sup>, la concentración de cadenas ligeras libres lambda en suero es mayor que la de kappa (la relación kappa:lambda libres es 1:2).

Esto contrasta con la mayor proporción de cadenas ligeras kappa unidas a las inmunoglobulinas IgG e IgM. No se sabe si este aumento de cadenas lambda libres es debido a una mayor síntesis de la misma o a una mayor incorporación de las cadenas kappa a las cadenas pesadas para formar inmunoglobulinas completas <sup>3</sup>.

Según el mismo trabajo, en orina el cociente de cadenas ligeras libres se invierte (la relación kappa:lambda es 3:1) debido a la propensión de las cadenas ligeras kappa a ser eliminadas más rápidamente. Esto puede ser debido a las diferencias en la estructura cuaternaria: las cadenas kappa existen como monómeros, dímeros no covalentes o ambos (la dimerización ocurre antes y después de la filtración glomerular), mientras que las cadenas lambda se encuentran como dímeros unidos covalentemente <sup>3</sup>.

10 - 12

La región del patrón electroforético correspondiente a las gammaglobulinas suele aumentar en el suero de los pacientes afectados por tumores de células plasmáticas. Aparece entonces en esa región un pico agudo llamado **componente monoclonal (M)**. Con menos frecuencia, el componente M aparece en la región de las globulinas  $\beta$  o  $\alpha_2$  <sup>7</sup>(fig. I 1).



**Figura I 1: Proteinograma con componente monoclonal en la región de las  $\beta$ -globulinas.**

En los trastornos de las células plasmáticas, la naturaleza del componente M es variable. Puede ser una molécula de anticuerpo intacta de cualquier subclase de cadena pesada, o puede ser un anticuerpo alterado o un fragmento del mismo. En algunos

tumores de células plasmáticas, como los plasmocitomas extramedulares u óseos solitarios, el componente M aparece sólo en menos de un tercio de los pacientes. Hay un 14-20% de mielomas aproximadamente en los que se producen exclusivamente cadenas ligeras que casi siempre se excretan por la orina como proteína de Bence Jones<sup>7, 10</sup>. La frecuencia de los mielomas con una determinada clase de cadena pesada es, en términos generales, proporcional a la concentración de esa cadena en suero, y por tanto, los mielomas de inmunoglobulina G son más frecuentes que los mielomas de otras inmunoglobulinas<sup>7</sup>.

Es importante recalcar que una proteína monoclonal puede estar presente, aun cuando los niveles de proteínas totales, o su reparto en las regiones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del proteinograma sean normales, incluso cuando las inmunoglobulinas cuantitativas también lo sean. Al cuantificar las cadenas ligeras totales kappa y lambda en suero, se puede detectar el predominio de un isotipo sobre el otro, e inferir de ahí su monoclonalidad; pero en ocasiones, una inmunoglobulina G kappa monoclonal de baja concentración puede pasar inadvertida, pues la relación kappa: lambda totales puede ser normal (2:1)<sup>5</sup>.

## **1.2. CLASIFICACIÓN:**

Según la forma de presentación clínica podemos clasificar las gammopatías monoclonales en <sup>2,4</sup>:

### **1.2.1. CLÍNICAMENTE MANIFIESTAS:**

#### 1.2.1.1. Neoplasias de células B:

##### 1.2.1.1.1. Mieloma múltiple (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, y cadenas ligeras libres kappa o lambda) y sus variantes:

- Mieloma no secretor.
- Enfermedades de cadenas ligeras.
- Enfermedades de cadenas pesadas.
- Plasmocitoma óseo solitario.
- Plasmocitoma extramedular.
- POEMS o mieloma osteosclerótico.

##### 1.2.1.1.2. Enfermedades linfoproliferativas:

- Macroglobulinemia de Waldenström.
- Leucemia linfoide crónica.
- Linfoma no-Hodgkin.

#### 1.2.1.2. Otras enfermedades relacionadas con componentes monoclonales:

##### 1.2.1.2.1. Crioglobulinemias tipos I y II.

##### 1.2.1.2.2. Amiloidosis AL.

##### 1.2.1.2.3. Enfermedad por depósito de cadenas ligeras.

##### 1.2.1.2.4. Síndrome de Fanconi adquirido.

##### 1.2.1.2.5. Polineuropatías.

##### 1.2.1.2.6. Crioaglutininemia crónica.

##### 1.2.1.2.7. Coagulopatías.

##### 1.2.1.2.8. Enfermedades autoinmunes.

### **1.2.2. CLÍNICAMENTE SILENTES:**

#### 1.2.2.1. Gammopatía monoclonal de significado incierto.

##### 1.2.2.1.1. Benigna (IgG, IgA, IgM, IgD, y, raramente cadenas ligeras libres).

##### 1.2.2.1.2. Asociada a otras neoplasias de células productoras de inmunoglobulinas.

##### 1.2.2.1.3. Gammopatías biclonales.

- 1.2.2.2. Proteinuria de Bence Jones idiopática.
- 1.2.2.3. Mieloma Múltiple Asintomático (Smoldering).
- 1.2.2.4. Gammapatía monoclonal transitoria.
  - 1.2.2.4.1. Infecciones pediátricas.
  - 1.2.2.4.2. Transmisión pasiva materno-fetal.
  - 1.2.2.4.3. Infecciones víricas.
  - 1.2.2.4.4. Hipersensibilidad a drogas.
  - 1.2.2.4.5. Otras.

## **1.2.1. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES CLÍNICAMENTE MANIFIESTAS:**

### **1.2.1.1. NEOPLASIAS DE CÉLULAS B:**

#### **1.2.1.1.1. Mieloma Múltiple (MM):**

Es el prototipo de gammapatía monoclonal maligna, caracterizándose por la proliferación de células de estirpe linfoide B situadas en el último estadio madurativo (células plasmáticas). Estas células secretan inmunoglobulinas de carácter monoclonal. En el caso de MM, la proteína monoclonal puede ser de tipo IgG, IgA, IgM, IgD, IgE o bien de fragmentos identificables con sus cadenas ligeras, o incluso sólo de un tipo de cadena ligera<sup>1,5</sup>.

El MM constituye la neoplasia de células plasmáticas más frecuente, con una **incidencia** de 3 a 5 casos nuevos por cada 100000 habitantes y año, representando el 1% de todas las neoplasias y alrededor del 10% de las hemopatías malignas. La incidencia máxima ocurre en las décadas de los 60 y 70 años. Sólo un 15% de los pacientes tiene menos de 50 años en el momento del diagnóstico, y esta incidencia baja al 2% por debajo de los 40 años, siendo excepcional (sólo el 0,3% de los casos) en menores de 30 años. En cuanto a la distribución por sexos, no se han encontrado diferencias significativas de incidencia. Sin embargo, considerando la raza, se ha descrito una mayor incidencia de la enfermedad (doble) en negros americanos que en el resto de la población general, y menor incidencia en poblaciones asiáticas y en Méjico<sup>1,5</sup>.

La proliferación plasmática propiamente dicha o mieloma puede ubicarse en la médula ósea, que es con mucho la localización más frecuente, en cuyo caso hablamos de MM, o bien originarse en tejido extramedular, ya sea óseo (Plasmocitoma solitario óseo) y que cursa por definición con mielograma normal, o extraóseo (Plasmocitoma extramedular) localizado en ganglios linfáticos, bazo, anillo linfático de Waldeyer del tracto respiratorio alto, hígado, piel, etc<sup>2, 5</sup>.

Los **criterios diagnósticos** de MM según *Southwest Oncology Study Group* (SWOG) son los siguientes<sup>5, 6, 13, 14</sup>:

- Criterios mayores:

- I Plasmocitoma demostrado por biopsia.
- II Plasmocitosis medular > 30%.
- III Componente M: > 3,5 g/dL (IgG), 2 g/dL (IgA) o cadenas ligeras libres en orina kappa o lambda > 1g/24h en ausencia de amiloidosis.

- Criterios menores:

- a) Plasmocitosis medular entre el 10 y el 30%.
- b) Componente M de menor cuantía que en criterio mayor III.
- c) Lesiones osteolíticas.
- d) Descenso de inmunoglobulinas policlonales: IgG < 600 mg/dL, IgA <100 mg/dL o IgM <50 mg/dL.

El diagnóstico de MM se establece cuando un paciente sintomático presenta un criterio mayor y uno menor, o bien tres menores de los cuales siempre han de estar incluidos *a* y *b*, siendo las posibilidades las siguientes:

- 1. I+b, I+c, I+d (I+a no es suficiente).
- 2. II+b, II+c, II+d.
- 3. III+a, III+c, III+d.
- 4. a+b+c, a+b+d.

Los **signos y síntomas clínicos** más característicos del MM son los siguientes:

- *Manifestaciones esqueléticas*: dolor, fracturas, deformidades óseas <sup>5</sup>.
- *Signos radiológicos*: osteólisis, aplastamientos vertebrales, apolillados óseos, osteoporosis generalizada <sup>5</sup>.
- *Manifestaciones neurológicas*: radiculalgias, paraplejía, desorientación (por hipercalcemia) <sup>5</sup>.
- *Citología medular*: infiltración plasmocelular <sup>5</sup>.
- *Sangre periférica*: anemia, hematíes “en pilas de monedas”, leucopenia, trombopenia, alguna célula plasmática, velocidad de sedimentación globular (VSG) muy acelerada <sup>5</sup>.
- *Anomalías metabólicas*: hipercalcemia <sup>5</sup>.
- *Síntomas constitucionales*: astenia, pérdida de peso <sup>1</sup>.
- *Disfunción renal*: la insuficiencia renal (IR) es uno de los rasgos más característicos del MM y supone la segunda causa de muerte en estos enfermos. Aproximadamente del 25 al 30% de los pacientes presentan niveles de creatinina  $\geq 2\text{mg/dL}$  al diagnóstico, incidencia que aumenta durante el curso de la enfermedad. Su etiología es multifactorial, siendo los factores más importantes: la eliminación por el riñón de cadenas ligeras de inmunoglobulinas (proteinuria de Bence Jones), que se depositan en forma de cilindros a nivel de los túbulos distales y colectores (esta lesión histológica se denomina “riñón del mieloma”); también influyen la hipercalcemia y la deshidratación; otros factores menos relevantes son hiperuricemia, infecciones urinarias de repetición, hiperviscosidad, amiloidosis e infiltración tumoral. La IR se manifiesta generalmente como una IR crónica, aunque también puede aparecer en forma de IR aguda y más raro como un síndrome de Fanconi adquirido o un síndrome nefrótico <sup>1</sup>.
- Las *infecciones* representan la primera causa de mortalidad en el MM. Su incidencia global oscila entre 0,5 y 3 episodios por paciente/año. Los focos infecciosos y agentes más frecuentes son el pulmonar (neumonía neumocócica) y el urinario (bacilos gram negativos); también puede haber infección por herpes zóster, pero es más rara (10%). La hipogammaglobulinemia policlonal es la responsable fundamental de la susceptibilidad infecciosa de estos pacientes; en el origen de la misma parecen estar implicados la disminución de las células B y la reducción de la producción de interleukina-4, responsable de la activación inicial de las células B en reposo. Además, en el MM existe una reducción muy marcada de



las células T CD4, una alteración funcional de las células *natural-killer* y de la actividad del sistema del complemento, todo ello junto a la granulocitopenia secundaria a la infiltración medular, a la quimioterapia y a la insuficiencia renal, contribuyen a aumentar el riesgo de infección en estos pacientes <sup>1</sup>.

El marcador biológico más característico del mieloma es la presencia en suero y/u orina de una Ig monoclonal, que aparece como un pico estrecho en el proteinograma <sup>1</sup>. Según el isotipo de Ig monoclonal **los MM se clasifican** en (tabla I1):

- Mieloma IgG: es el más frecuente (55-60% de los casos). La proteinuria de Bence Jones aparece en el 50-60% de los enfermos. El tipo de cadena ligera monoclonal que aparece con más frecuencia es kappa, presentando una relación 2:1 respecto al tipo lambda. La media de edad de aparición es a los 65 años. Son pacientes muy susceptibles a inmunodeficiencias <sup>5, 15</sup>.
- Mieloma IgA: representa el 20-30% de los mielomas. Clínicamente, presenta un curso rápido y agresivo. El 60-70% cursa con proteinuria de Bence Jones. La media de edad de aparición es igual que el tipo IgG, a los 65 años. Se asocia con más frecuencia a amiloidosis, hiperviscosidad e hipercalcemia que el mieloma IgG <sup>5, 15</sup>.
- Mieloma IgD: representa menos del 2% de los casos. Su curso es agresivo y casi todos los casos presentan proteinuria de Bence Jones, que se asocia con frecuencia a hipercalcemia, lesiones extraóseas, amiloidosis e insuficiencia renal. En el 50% de los casos se extiende a nódulos linfáticos, hígado y bazo. Es frecuente la normoproteinemia, pues la IgD difícilmente se acumula en el plasma debido a su vida media muy breve (3 días). La banda monoclonal en el proteinograma puede ser indetectable. De hecho, ante una hipogammaglobulinemia severa en ausencia de componente M, debe excluirse la existencia un MM IgD o Bence Jones. En el 90% de los pacientes la proteína M en orina corresponde a la cadena ligera lambda. La media de edad de presentación es a los 57 años. Tiene mal pronóstico <sup>1, 5, 15</sup>.
- Mieloma IgE: tiene una incidencia muy baja. Un elevado porcentaje se leucemiza. La mayoría de los pacientes presenta proteinuria de Bence Jones <sup>5, 15</sup>.

- **Mieloma IgM:** cuando se excreta esta paraproteína generalmente corresponde a la macroglobulinemia de Waldenström, aunque actualmente se admite la existencia de mieloma IgM, con muy escasa incidencia. Es típica la presencia de lesiones osteolíticas y es frecuente el síndrome de hiperviscosidad. Predomina en varones y la quinta década de la vida es la más afectada<sup>1, 5</sup>. El 100% presenta proteinuria de Bence Jones<sup>15</sup>.

**Tabla I 1: Tipos de Inmunoglobulinas Monoclonales en el Mieloma Múltiple.**

Paraproteína Plasmática	Incidencia (%)	Edad de aparición (media)	Incidencia de Proteinuria de Bence Jones (%)	Comentarios
<b>IgG</b>	50	65	60	Susceptibilidad aumentada de inmunodeficiencia. Las proteínas alcanzan altos niveles.
<b>IgA</b>	25	65	70	Tendencia a tener hipercalcemia y amiloidosis.
<b>Proteinuria de Bence Jones aislada</b>	20	56	100	Frecuente fallo renal, lesiones óseas, amiloidosis. Mal pronóstico.
<b>IgD</b>	2	57	100	90% tipo lambda. Frecuentes lesiones extraóseas, amiloidosis, fallo renal. 50% tienen hipertrofia de nódulos linfáticos, hígado y bazo. Mal pronóstico.
<b>IgM</b>	1	-	100	Puede tener o no síndrome de hiperviscosidad.
<b>IgE</b>	0.1	-	La mayoría	-
<b>Biclonal</b>	1	-	-	-
<b>No detectada</b>	< 1	-	0	Frecuente disminución de las inmunoglobulinas normales

Además de los tipos de mieloma anteriores, se describen **formas clínicas especiales de mieloma**:

- Mieloma normoproteico de Bence Jones o enfermedad de cadenas ligeras: la célula plasmática sólo secreta cadenas ligeras y, debido a su eliminación urinaria, el componente M se detecta sólo en orina (proteinuria de Bence Jones). Cursa casi siempre sin hipergammaglobulinemia ni banda monoclonal en el proteinograma, y se caracteriza por una VSG poco elevada. Representa el 20% de los mielomas y su curso es rápido y agresivo, con manifestaciones esqueléticas importantes. Afecta en especial a personas más jóvenes (56 años de media) y suele complicarse con hipercalcemia, insuficiencia renal y amiloidosis. Tiene mal pronóstico <sup>5, 10, 15</sup>.
- Enfermedades de cadenas pesadas: se caracteriza por la producción de un componente M anómalo, compuesto por moléculas incompletas de cadenas pesadas desprovistas de cadenas ligeras. Constituyen tan solo el 1% de las discrasias plasmocelulares. El componente M sérico acostumbra a ser de escasa cuantía, de modo que en más de la tercera parte de los casos es inferior a 5 g/dL, hecho que hace que con frecuencia pase inadvertido en la electroforesis <sup>5</sup>.
- Mieloma no secretor: es muy infrecuente (1%). Se caracteriza por la ausencia de capacidad secretora de inmunoglobulinas por la celularidad plasmática proliferante. La inmunoglobulina monoclonal puede detectarse intracitoplasmáticamente mediante inmunofluorescencia o métodos inmunocitoquímicos <sup>5</sup>.
- Plasmocitoma óseo solitario: es un tumor óseo de células plasmáticas que se presenta como una lesión aislada aparentemente localizada. Constituye el 3-5% del total de neoplasias de células plasmáticas. La edad de presentación se sitúa 7 a 10 años antes que el MM y es característico el predominio masculino. Más de 50% de casos se localizan en la columna, con mayor frecuencia en las vértebras torácicas, y el resto en huesos largos periféricos. En un 50-60% de casos se detecta proteína M en suero y/u orina, con concentraciones séricas generalmente inferiores a 3 g/dL. Las inmunoglobulinas policlonales no suelen estar disminuidas. Su prolongado curso clínico y su potencial curabilidad con tratamiento local lo diferencia clínicamente con el MM <sup>5</sup>.

- Plasmocitoma extramedular: se origina en los tejidos blandos, fundamentalmente en las vías respiratorias superiores y la cavidad oral (80% de los casos). Representa el 4% de las neoplasias de células plasmáticas y su incidencia es mayor en el sexo masculino, con una edad de presentación similar a la del plasmocitoma óseo solitario. Existe un predominio del tipo inmunológico IgA. La evolución a MM se da en el 8-30% de los casos y de forma mayoritaria durante los dos años que siguen al diagnóstico <sup>1,5</sup>.
- Síndrome de POEMS (*Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal gammopathy, and Skin changes*): es una rara enfermedad con neuropatía periférica, organomegalias, deficiencias endocrinas, gammapatía monoclonal (de los tipos IgA lambda o IgG lambda en el 75% de los pacientes), y lesiones cutáneas; también aparecen lesiones osteoescleróticas en muchos pacientes. La polineuropatía se observa en alrededor del 1,4% de los mielomas, pero el síndrome de POEMS es solamente una rara variedad de ese grupo. El curso clínico es más lento que el del MM, con una mediana de supervivencia de aproximadamente 5 años <sup>7,16</sup>.
- Otras formas muy infrecuentes de mieloma son el mieloma biclonal, caracterizado por la presencia de dos tipos diferentes de inmunoglobulinas monoclonales, sintetizadas por sendas clonas plasmocelulares distintas (ocurre en el 3-4% de los sueros que contienen un componente M); y la leucemia de células plasmáticas, que puede ser la primera manifestación de la discrasia plasmocelular o bien la expresión terminal evolutiva de un mieloma (leucemia de células plasmáticas secundaria) <sup>5,17</sup>.

El **pronóstico del MM** está basado en la clase de componente M encontrado, su concentración en el momento del diagnóstico, y de la velocidad con que esa concentración aumenta. La concentración en el momento del diagnóstico se correlaciona con la extensión de la enfermedad en ese momento. La velocidad de incremento de la concentración del componente M se correlaciona con la velocidad de crecimiento de la neoplasia <sup>15</sup>.

Otros autores consideran que los factores clínicos son los más relevantes en el pronóstico del MM, siendo la existencia de mal estado general y la edad avanzada los factores que influyen más adversamente <sup>1</sup>.

Los parámetros que reflejan algunas de las complicaciones de la enfermedad, tales como anemia (Hb por debajo de 9 g/dL), hipercalcemia (Ca >12 mg/dL), hipoalbuminemia (<3 g/dL), y sobre todo insuficiencia renal (creatinina >2 g/dL) son factores pronósticos relevantes <sup>1</sup>.

La **estadificación del tumor** se basa tanto en criterios clínicos como de laboratorio. Una estadificación es la establecida por **Durie-Salmon**, vigente durante más de 20 años. Utiliza medidas estándar de laboratorio, incluyendo la concentración de hemoglobina, niveles de proteínas en suero y orina, presencia de hipercalcemia y extensión de la enfermedad ósea. Establece 3 estadios dependiendo de la masa tumoral <sup>6, 14, 18</sup>.

- Estadio I (masa celular baja): se cumplen todos los criterios siguientes:
  - Hemoglobina > 10.5 g/dL o hematocrito > 32%
  - Calcio sérico normal
  - Componente M: IgG < 5 g/dL, IgA < 3g/dL o Proteína de Bence Jones menor de 4 g/24 h
  - Ausencia de lesiones líticas o de osteoporosis
  
- Estadio II (masa celular intermedia): no cumple los criterios de los estadios I o III.
  
- Estadio III (masa celular alta): se cumplen uno o varios de los criterios siguientes:
  - Hemoglobina < 8.5 g/dL, hematocrito < 25%
  - Calcio sérico > 12 mg/dL
  - Componente M: IgG > 7 g/dL, IgA > 5g/dL o Proteína de Bence Jones mayor de 12 g/24 h
  - Lesiones osteolíticas múltiples (más de 3)

A su vez, cada estadio tiene 2 categorías dependiendo del nivel de creatinina en suero <sup>18</sup>:

- Categoría A: creatinina en suero menor de 2 mg/dL.
- Categoría B: creatinina en suero mayor de 2 mg/dL.

El **Internacional Staging System For Multiple Myeloma** ha establecido otra estadificación de MM usada actualmente <sup>18, 19</sup>:

- Estadío I:  $\beta$ 2-microglobulina menor de 3.5 mg/L y Albúmina igual o mayor de 3.5 g/dL.
- Estadío II: no cumple criterios de estadio I ó III. Se contemplan 2 categorías:  $\beta$ 2-microglobulina < 3.5 mg/L pero Albúmina < 3.5g/dL; ó  $\beta$ 2-microglobulina entre 3.5-5.5 mg/L, independientemente del nivel de Albúmina.
- Estadío III:  $\beta$ 2-microglobulina mayor de 5.5 mg/L.

Cuando un componente M es identificado, pero las condiciones clínicas son benignas, con médula ósea y radiografías óseas normales, los hallazgos en el seguimiento que sugieren que la condición podría eventualmente transformarse en maligna son los siguientes <sup>15</sup>:

1. IgG mayor de 2 g/dL; o bien IgA o IgM mayor de 1 g/dl; o el hallazgo de una IgD o IgE monoclonal a cualquier concentración.
2. Fragmentos de inmunoglobulinas en orina o suero: en orina, normalmente proteína de Bence Jones; en suero, ocasionalmente otros fragmentos tales como IgM monomérica.
3. Progresivo incremento en la concentración del componente M.
4. Bajos niveles de inmunoglobulinas policlonales.

Lo contrario de estos criterios sugieren que la condición es benigna, o es una gammapatía monoclonal de significado incierto. Aun así, los pacientes deben ser monitorizados al menos durante 5 años <sup>15</sup>.

### 1.2.1.1.2. Enfermedades linfoproliferativas:

**Macroglobulinemia de Waldenström (MW):** es una enfermedad linfoproliferativa que consiste en una proliferación monoclonal de células linfoides B secretoras de IgM. La célula neoplásica es el linfoplasmocito, que tiene rasgos morfológicos y fenotípicos intermedios entre el linfocito B maduro y la célula plasmática <sup>1</sup>.

La MW es poco frecuente. Según datos estadounidenses, se diagnostican cada año de 2 a 5 casos por millón de habitantes. En España, un estudio reciente ha estimado dicha incidencia en 3,2 por millón de habitantes y año. Representaría el 3% de todas las gammopatías monoclonales, ascendiendo al 15% si sólo se consideran las de tipo inmunoglobulina M. Su frecuencia respecto al mieloma múltiple es de 1 a 6, y al igual que éste, afecta a individuos de edad avanzada (mayor incidencia entre 55 y 65 años), aunque no es excepcional en jóvenes. El 70% de los pacientes son varones. Aunque no tiene predilección étnica, se ha visto que es mucho menos frecuente en asiáticos <sup>1,5</sup>.

La MW generalmente tiene un curso crónico, pudiendo permanecer estable durante mucho tiempo sin síntomas importantes. Incluso hay casos asintomáticos o “poco sintomáticos” que no progresan y se suelen caracterizar por ausencia de anemia (hemoglobina > 12,5 g/dL) y tener una  $\beta_2$ -microglobulina normal, pese a tener en ocasiones un componente monoclonal muy elevado. El síntoma inicial más frecuente es astenia progresiva, generalmente debida a anemia. También puede haber manifestaciones hemorrágicas y neurológicas, así como adenopatías. Sólo el 10-20% de los casos tienen manifestaciones iniciales inusuales: respiratorias, oculares, insuficiencia renal, síntomas cutáneos, etc. Los síntomas y signos clínicos se deben al crecimiento tumoral y a la paraproteinemia IgM <sup>1</sup>.

La neuropatía periférica constituye la complicación más frecuente de la MW, con una incidencia que oscila entre el 5 y 25%. Puede manifestarse como una neuropatía sensitiva, una neuropatía sensitivomotora o como una mononeuropatía <sup>5</sup>.

La afección renal en la MW es mucho menos frecuente que en el MM, y cuando se presenta es fundamentalmente glomerular, en contraste con la afección básicamente tubular característica del MM. La amiloidosis renal también es mucho más infrecuente que en el MM. En algunos casos la paraproteína se comporta como una

crioglobulina y puede dar lugar a hipersensibilidad al frío y hemólisis crónica con exacerbaciones agudas relacionadas con la exposición al frío <sup>5</sup>.

En cuanto a los datos de laboratorio, el 60-70% de los enfermos tienen anemia normocítica arregenerativa, aunque también puede haber un componente periférico (pérdidas sanguíneas, aglutininas frías o hemodilución) <sup>1</sup>. En las tres cuartas partes de los casos la cifra de hemoglobina es inferior a 12 g/dL <sup>5</sup>. En la tercera parte de los pacientes hay linfocitosis ( $>4 \times 10^9/L$ ) y no es infrecuente la neutropenia. Hay trombopenia en menos del 20 % de los casos, generalmente de mecanismo central. En el frotis son característicos los hematíes en pilas de monedas (fenómeno de rouleaux) por la paraproteinemia, y pueden observarse linfoplasmocitos <sup>1</sup>.

Las proteínas totales están aumentadas por la paraproteína IgM, con aumento de la VSG. La electroforesis pondrá de manifiesto la existencia de una banda monoclonal cuya identificación se hará por inmunoelectroforesis. A diferencia del MM, las inmunoglobulinas restantes suelen ser normales, pero no se pueden descartar descensos. Ocasionalmente (5%) puede observarse un segundo pico monoclonal (presencia de otro componente monoclonal IgM o de otro tipo: IgG, IgA, IgE o cadenas lambda). En la tercera parte de los enfermos hay proteinuria de Bence Jones, en general escasa (menos de 2 g en 24 horas) <sup>1</sup>.

**Tumores linfoides**, tales como linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica, surgen desde un estadio menos maduro del desarrollo de los linfocitos B que el mieloma múltiple. Alrededor de 1 de cada 5 casos produce componente M, normalmente de la clase IgM <sup>15</sup>.

La **leucemia linfocítica crónica (LLC)** es la leucemia del adulto más frecuente en los países occidentales. La incidencia de LLC supera la cifra de 10/100000 habitantes entre personas de más de 70 años, pero no llega a 1/100000 entre los menores de 50 años. Este tipo de leucemia se presenta con más frecuencia en los varones y en la raza blanca <sup>7</sup>.

Los **linfomas no Hodgkin (LNH)** tienen una incidencia de 0.5 a 1 caso nuevo por 100000 habitantes y año. La edad media de presentación son los 50 años, aunque



pueden observarse a cualquier edad. En individuos de menos de 35 años y más de 65 predominan los linfomas difusos; éstos también son más prevalentes en los varones (2:1)<sup>20</sup>.

### **1.2.1.2. OTRAS ENFERMEDADES RELACIONADAS CON COMPONENTES MONOCLONALES:**

**1.2.1.2.1. Crioglobulinemias (CGM):** son enfermedades en las que aparecen crioglobulinas (CG). Las CG son inmunoglobulinas que precipitan a bajas temperaturas y se redisuelven por calentamiento. La agregación y/o precipitación de dichas proteínas puede provocar isquemia y úlceras en las partes del cuerpo que alcanzan temperaturas más bajas: dedos (fenómeno de Raynaud), orejas, nariz y piel. Por otra parte, los complejos inmunoglobulínicos pueden depositarse en el riñón y dar lugar a insuficiencia renal<sup>5</sup>.

Las CGM pueden ser primarias (esenciales) o secundarias, según se asocien o no a algún otro trastorno identificable. Sin embargo, en la actualidad la clasificación más empleada es la propuesta por Brouet et al. en 1974 que contempla tres **tipos de CGM**, de acuerdo con la caracterización bioquímica de la CG involucrada<sup>1,5</sup>:

- **Crioglobulinemia tipo I**: se trata de CG monoclonales, compuestas íntegramente por inmunoglobulinas monoclonales que actúan por sí mismas como crioglobulinas. Son frecuentemente secundarias a gammapatías monoclonales (MM, MW, enfermedades de cadenas pesadas, linfomas), pero pueden también ser primarias.
- **Crioglobulinemia tipo II**: en estos casos aparecen CG mixtas. Las CG están constituidas por inmunoglobulinas mixtas que incluyen una inmunoglobulina monoclonal que posee actividad anticuerpo frente a otro componente sérico, siendo frecuente la actividad de factor reumatoide monoclonal; en la mayoría de los casos las inmunoglobulinas involucradas son IgG e IgM, siendo esta última la que con mayor frecuencia posee actividad de factor reumatoide monoclonal. Son secundarias a enfermedades linfó o mieloproliferativas malignas, pero pueden ser primarias.

- Crioglobulinemia tipo III: son las más frecuentes y, en ellas, las CG son policlonales, compuestas por varios tipos de inmunoglobulinas.

**1.2.1.2.2. Amiloidosis:** es un trastorno caracterizado por el depósito hístico inexorable y acumulativo, en diferentes sistemas u órganos y de forma localizada o sistémica, de un material amorfo de estructura proteica que produce finalmente alteraciones funcionales y manifestaciones clínicas en el órgano o los órganos afectados <sup>5</sup>.

En el caso de la **amiloidosis primaria (AL)** las fibrillas amiloides están constituidas por la porción variable de una cadena ligera de las inmunoglobulinas y, en algunos casos, por la cadena ligera completa. El tipo de cadena ligera más frecuente que forman las fibrillas amiloideas pertenecen al tipo lambda, lo que representa una inversión de la relación normal kappa/lambda observada en el mieloma: 76% de cadenas ligeras lambda en la amiloidosis, en comparación con el 33% en el mieloma <sup>1, 5</sup>. Estas cadenas ligeras libres son sintetizadas y secretadas por una población de células plasmáticas de bajo grado proliferativo. La proteína monoclonal no aumenta a lo largo del tiempo, como ocurre a menudo en el mieloma múltiple, y el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea es comparativamente bajo (el 60% de los casos de amiloidosis asociada a cadenas ligeras tienen menos del 10% de células plasmáticas) y permanece estable. El inmunofenotipo de las células plasmáticas en aspirado de médula ósea muestra un exceso clonal con cociente kappa/lambda alterado en estos pacientes, incluso en aquéllos con porcentajes normales de células plasmáticas y sin componente monoclonal detectable en suero y orina <sup>9</sup>.

Existe una forma de **amiloidosis secundaria asociada a cadenas ligeras**, que es una complicación de las neoplasias de células B, especialmente del mieloma múltiple. La incidencia estimada es del 10 % de los casos de mieloma <sup>9</sup>. Otros autores consideran que puede presentarse hasta en el 15 % de los pacientes con MM <sup>5</sup>.

La AL presenta una incidencia anual de 0,9 casos nuevos por 100000 habitantes. El pico de máxima incidencia ocurre entre los 60 y 70 años, con una preponderancia de afectación masculina (64 % varones y 36 % mujeres) <sup>1,5</sup>.

En cuanto a las manifestaciones clínicas de la AL, los síntomas más frecuentes son la astenia y la pérdida de peso; también presentan parestesias y disestesias, síncope,

hipotensión ortostática o cambios en el tono de la voz, que se va debilitando a lo largo del día. Los principales hallazgos a la exploración física son hepatomegalia, macroglosia, púrpura y edemas <sup>1</sup>.

Los síndromes que se asocian a la AL son síndromes nefrótico y del túnel carpiano, insuficiencia cardíaca congestiva, neuropatía periférica e hipotensión ortostática. La existencia de cualquiera de estos síndromes en presencia de un componente monoclonal sérico o urinario es muy sugestivo de AL. El componente M sérico y/o urinario se encuentra en el 90% de los casos. El tipo de componente M sérico es: IgG (32%), IgA (10%), cadenas ligeras (24%), IgM (5%), IgD (1%). En una cuarta parte de los casos no existe componente monoclonal sérico. En el 90% de los pacientes se encuentra proteinuria <sup>1</sup>. A menudo, el diagnóstico clínico de la amiloidosis se basa en la detección de las proteínas de Bence Jones en la orina, lo que subraya la necesidad de emplear métodos de detección altamente sensibles <sup>9</sup>. El diagnóstico definitivo de la amiloidosis se fundamenta en la demostración de sustancia amiloide en los tejidos <sup>1</sup>.

**1.2.1.2.3. Enfermedad por depósito de cadenas ligeras:** es una enfermedad sistémica caracterizada por la presencia de depósitos granulares de cadenas ligeras a lo largo de la membrana basal. A nivel renal, las lesiones histológicas comprenden nódulos escleróticos mesangiales, engrosamiento de la membrana basal tubular y reactividad positiva (inmunofluorescencia) de los depósitos empleando antisueros monoespecíficos frente a las cadenas ligeras kappa y lambda <sup>9</sup>.

Los depósitos están formados en la mayoría de los casos (más del 80%) por cadenas ligeras kappa, y en menor proporción cadenas ligeras lambda o cadenas ligeras y pesadas. La lesión característica es la glomeruloesclerosis nodular, que está presente en el 60% de los casos. Junto a las lesiones glomerulares, existen también lesiones tubulares. Se observa proteinuria (en la mitad de los casos de rango nefrótico con hematuria microscópica) y fallo renal, que se caracteriza por la elevada prevalencia, la aparición precoz y la severidad. La cadena ligera depositada no se detecta en suero o en orina en el 15-30% de los pacientes <sup>9</sup>.

La enfermedad por depósito de cadenas ligeras se asocia a un 5% de los casos de mieloma múltiple. La causa del 45% de los casos de enfermedad por depósito de cadenas ligeras es el mieloma múltiple <sup>9</sup>.

**1.2.1.2.4. Síndrome de Fanconi:** es un defecto generalizado del transporte por el túbulo contorneado proximal renal de los aminoácidos, glucosa, fosfato, ácido úrico, sodio, potasio, bicarbonato y proteínas, dando lugar a una acidosis tubular renal proximal o tipo II. Puede ser congénito o adquirido <sup>8,20</sup>.

El **síndrome de Fanconi adquirido** puede presentarse en el mieloma múltiple, la amiloidosis, el síndrome nefrótico, el síndrome de Sjögren, el riñón trasplantado y en las intoxicaciones por metales pesados, principalmente <sup>8,20</sup>.

El síndrome de Fanconi adquirido relacionado con las gammopatías monoclonales se debe a la excreción de cadenas ligeras monoclonales que dañan las células epiteliales del túbulo proximal. La resistencia de cadenas ligeras kappa a la proteólisis por catepsina B lisosomal produce la acumulación de cadenas ligeras en los compartimentos intracelulares de las células proximales tubulares. Típicamente, el diagnóstico del síndrome de Fanconi precede al de la gammapatía monoclonal, especialmente el mieloma de progresión lenta que excreta cadenas ligeras kappa. En la mayoría de los casos, el isotipo de la proteína de Bence Jones es kappa <sup>9</sup>.

Aparte de en los trastornos de las células plasmáticas, también puede detectarse componente M en neoplasias no linfoides, como la leucemia mieloide crónica, el cáncer de mama o de colon, la sarcoidosis, las enfermedades parasitarias, la enfermedad de Gaucher y la piodermia gangrenosa, así como en una serie de procesos autoinmunitarios como la artritis reumatoide, la miastenia grave y la enfermedad por crioaglutininas <sup>7</sup>.

## **1.2.2. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES CLÍNICAMENTE SILENTES.**

### **1.2.2.1. GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO (MGUS):**

El hallazgo de una proteína monoclonal en el suero o la orina de un paciente no implica necesariamente la presencia de una gammapatía monoclonal maligna. Se observa que más de la mitad de los casos corresponden a una MGUS. Este es un término utilizado para denotar la condición patológica en la que se detecta una proteína monoclonal y en la que no hay indicios de complicaciones o transformación a mieloma múltiple, enfermedad de Waldenström, amiloidosis primaria o algún otro trastorno relacionado <sup>1</sup>.

Como ya se ha comentado, la gammapatía monoclonal se debe a la proliferación de un solo linfocito B, un progenitor de célula plasmática, lo que lleva a la producción de una población clonal que alcanza el estado estable cuando alcanza un número de  $1 \times 10^{11}$  células o menos. A esta densidad de población, la prevalencia de células plasmáticas en la médula es indistinguible de la de la médula normal. El clon expandido secreta una inmunoglobulina monoclonal a una tasa por célula que es suficiente para permitir su detección mediante pruebas estándar. Sin embargo, la expansión clonal no causa osteólisis, ni inhibe la proliferación hematopoyética ni la maduración, ni altera la diferenciación de los linfocitos B policlonales a células plasmáticas. Como tal, la síntesis de inmunoglobulinas es normal, y los pacientes no tienen necesariamente un mayor riesgo de infección. Las células del clon benigno no se acumulan más y no elaboran cantidades significativas de factores activadores de osteoclastos, que son responsables de la destrucción ósea. Sorprendentemente, a pesar de estas diferencias significativas con el mieloma en el comportamiento de las células B neoplásicas, en las células plasmáticas derivadas del clon hay alteraciones citogenéticas similares a las vistas en mieloma y que afectan a los cromosomas 3, 7, 11 y 18 <sup>6</sup>.

Los **criterios diagnósticos de la MGUS** son los siguientes<sup>1, 6, 18, 21-23</sup>:

- La proteína monoclonal en suero es inferior a 3 g/dL si es IgG, o inferior a 2 g/dL si es IgA.
- La presencia de células plasmáticas clonales en la médula ósea es menor del 10% del total de la celularidad.
- Existen bajos niveles (menor de 1 g/24 h) o ausencia de proteína de Bence Jones en la orina.
- No existe evidencia de otras enfermedades proliferativas de células B.
- Ausencia de lesiones líticas óseas, anemia, hipercalcemia o insuficiencia renal.
- No evolución a mieloma u otra enfermedad linfoproliferativa dentro de los 12 meses después de la primera detección del componente M.

La práctica de electroforesis sérica en diversos grupos de población normal y patológica evidencia que el 3 % de los individuos sanos mayores de 70 años presentan un componente monoclonal en el proteinograma, sin que esto se asocie, aparentemente, a una discrasia plasmocelular maligna<sup>1, 6</sup>.

La **prevalencia de la MGUS** es de un 1% en personas mayores de 50 años según estudios de EE.UU., Francia y Suecia. La incidencia es directamente proporcional a la edad de las personas, siendo más común en los mayores de 70 años, y en EE.UU. es más común en las personas de ascendencia africana que en la raza blanca; también se ha visto menor incidencia en japoneses<sup>1, 4, 6, 21</sup>. Diferentes estudios muestran que la frecuencia asciende a un 3% en mayores de 65 años, y hasta un 10% por encima de 80 años<sup>6, 24</sup>. Si se utilizan técnicas de alta resolución la prevalencia puede alcanzar hasta el 10% en mayores de 60 años<sup>25</sup>.

La MGUS puede ser de tipo IgG, IgA, IgM, IgD, y, raramente, de cadenas ligeras libres. El tipo más frecuente es el IgG, seguido de IgM e IgA. La presencia de componente M tipo IgD casi siempre indica mieloma múltiple, amiloidosis primaria o leucemia de células plasmáticas; sin embargo puede diagnosticarse la MGUS tipo IgD, sin progresión de la enfermedad durante muchos años<sup>4</sup>.

La MGUS no precisa tratamiento pero sí un control evolutivo periódico, pues existe un riesgo de transformación a MM u otras entidades afines. Se recomienda

realizar controles analíticos cada 3 meses el primer año, cada 6 meses en los 2 años siguientes y una vez al año posteriormente si no hay variaciones. No es precisa la realización de medulograma en estos controles <sup>14</sup>.

La gammapatía biclonal, caracterizada por la presencia de dos componentes M diferentes, también puede aparecer como MGUS. Ocurre en 5-8% de los pacientes con gammapatías monoclonales, según Kyle. Las características clínicas de la gammapatía biclonal son similares al resto de las gammapatías monoclonales <sup>4</sup>.

#### **1.2.2.2. PROTEINURIA DE BENICE JONES IDIOPÁTICA:**

También llamada por Kyle gammapatía monoclonal benigna de cadenas ligeras, se define como una proteinuria de Bence Jones mayor de 1 g/24 horas, pero sin componente M en suero, ni existencia de un síndrome de Fanconi adquirido, sin evidencia clínica de mieloma múltiple u otra enfermedad relacionada, y curso estable durante más de un año. Aunque puede permanecer estable durante años, también se han descrito casos que han desarrollado mieloma o amiloidosis primaria en el transcurso de unos años, por lo que los pacientes que presenten este tipo de proteinuria deben ser estudiados indefinidamente. Una consecuencia de la secreción de cadenas ligeras libres en orina es el riesgo de depósitos en los riñones, que puede ser causa de disfunción orgánica. Aunque la nefrotoxicidad potencial de las cadenas ligeras libres ha sido demostrada desde hace muchos años, el fallo renal no se observa normalmente en la proteinuria de Bence Jones idiopática <sup>4, 26, 27</sup>.

Kyle considera la proteinuria de Bence Jones idiopática como una entidad separada de las MGUS, y con un probable mayor riesgo de malignización. Este autor realiza un estudio en el que hace el seguimiento de 7 pacientes diagnosticados de proteinuria de Bence Jones idiopática desde 1966 a 1975, de los cuales 5 evolucionan a MM <sup>26-28</sup>.

### 1.2.2.3. MIELOMA MÚLTIPLE ASINTOMÁTICO O LATENTE (smoldering):

Es una forma de MM que no presenta ninguna sintomatología clínica, pero en su suero se detecta proteína M en cantidad superior a 3 g/dL y la plasmocitosis medular supera el 10% en ausencia de anemia, osteólisis o insuficiencia renal. Frecuentemente, estos pacientes tienen una pequeña cantidad de proteína M en la orina y una disminución de las inmunoglobulinas policlonales en el suero. Presentan una excelente tolerancia espontánea durante años, y sólo debe iniciarse el tratamiento cuando el paciente manifieste signos y/o síntomas de progresión de la enfermedad, tales como un aumento en suero del componente M (>5 g/dL), aumento de la anemia (hemoglobina <10,5 g/dL), o la aparición de lesiones óseas líticas<sup>4, 5, 16, 18, 21</sup>. Por tanto, el inicio de terapia específica es debatible y se recomiendan sólo controles periódicos de la enfermedad y medidas de soporte preventivas<sup>14</sup>. Recientemente se ha llevado a cabo el tratamiento con pamidronato (agente que inhibe la resorción ósea) para retrasar la aparición de enfermedad ósea y posiblemente la progresión del proceso de la enfermedad. También se ha considerado el uso de eritropoyetina<sup>6, 14, 22</sup>.

En el trabajo de Blade de 2004<sup>29</sup> se describen dos tipos de MM latente:

- MM latente evolucionante (evolving): tenían un aumento progresivo en suero de componente M (partiendo de 3 g/dL por definición) hasta el desarrollo de MM sintomático.
- MM latente no evolucionante (nonevolving): presentaban concentraciones estables de componente M hasta el inicio de la enfermedad sintomática.

Blade observa que de sus pacientes, el 60% que presentaba MM latente evolucionante tenía previamente diagnóstico de MGUS que también tenía un modelo evolucionante, mientras que la MGUS previa fue muy rara en pacientes con MM latente no evolucionante. Su hipótesis es que todos los pacientes con modelo evolucionante tenían previamente MGUS, representando el MM latente evolucionante un paso intermedio entre MGUS y MM sintomático. Además, el MM latente no evolucionante lo considera comparable a MGUS, pero con alta probabilidad de progresión debido a su alta masa de células plasmáticas clonales en médula ósea. Siguiendo en la línea, considera la posible existencia de dos tipos de MGUS, una



evolucionante y otra no evolucionante, con diferentes mecanismos patogénicos y con mayor probabilidad de transformación maligna en el tipo evolucionante, sin tener en cuenta el valor inicial del componente M<sup>29</sup>.

#### **1.2.2.4. GAMMAPATÍA MONOCLONAL TRANSITORIA:**

Se ha descrito que la producción de inmunoglobulinas monoclonales puede acontecer de forma transitoria:

- Se han detectado inmunoglobulinas séricas oligoclonales o monoclonales en pacientes hospitalizados con reacciones de fase aguda o hipergammaglobulinemia policlonal<sup>6</sup>.
- También se pueden ver con frecuencia inmunoglobulinas monoclonales en pacientes con diversas enfermedades neurológicas, especialmente en pacientes con esclerosis múltiple<sup>6</sup>.
- Los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de poliadenopatías o anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana tienen también bandas de inmunoglobulinas oligoclonales o monoclonales<sup>6</sup>.
- Después de hepatitis víricas o infecciones por Citomegalovirus o Micoplasma, así como en enfermedades mediadas por inmunocomplejos (hepatitis crónica activa, periarteritis nudosa, artritis reumatoidea) e, incluso, en ocasiones, en la hipersensibilidad medicamentosa, puede observarse la presencia y posterior desaparición, a veces al cabo de años, de la proteína monoclonal<sup>5</sup>.
- También, en algunos casos de carcinoma de mama y melanoma aparece una paraproteína asociada, que desaparece después de la extirpación del tumor<sup>5</sup>.

### **1.3. FACTORES PRONÓSTICOS EN GAMMAPATÍAS MONOCLONALES CLÍNICAMENTE SILENTES:**

#### **1.3.1. Criterios diagnósticos:**

La División de Hematología y Medicina Interna de la Clínica Mayo (Rochester, MN, USA) ha establecido los criterios diagnósticos de MGUS, MM latente y MM, que son los siguientes <sup>4</sup>:

1. Gammapatía monoclonal de significado incierto: Proteína monoclonal en suero inferior a 3,0 g/dL, porcentaje de células plasmáticas en médula ósea inferior al 10%, y ausencia de anemia, hipercalcemia, fallo renal y osteólisis.
2. Mieloma múltiple latente: Proteína monoclonal en suero superior o igual a 3,0 g/dL o porcentaje de células plasmáticas en médula ósea mayor o igual al 10%, y ausencia de anemia, hipercalcemia, fallo renal y osteólisis.
3. Mieloma múltiple: Presencia de componente monoclonal en suero u orina, plasmocitosis en médula ósea, y anemia, hipercalcemia, fallo renal, u osteólisis. Los pacientes con amiloidosis primaria sistémica y porcentaje de células plasmáticas en médula ósea mayor o igual al 30% tienen mieloma múltiple y amiloidosis.

Estos criterios diagnósticos coinciden con los establecidos por el *International Myeloma Working Group* después de la revisión hecha recientemente <sup>21</sup>. Sin embargo, existen otros grupos de trabajo en los que los criterios varían en algunas características. En un estudio comparativo hecho en 1995 por Ong, Hermans et al. observaron que hasta un 36% de los pacientes fueron clasificados de forma diferente dependiendo del sistema de clasificación usado <sup>22</sup>. Por tanto, a pesar del establecimiento de estos criterios diagnósticos la diferenciación entre la MGUS, el MM latente y el MM maligno en estadios tempranos puede ser complicada, pues existen muchas características, como son la disminución de las inmunoglobulinas no monoclonales o la presencia de proteína monoclonal en la orina, entre otras, que aunque es más frecuente su aparición en los procesos malignos, también se pueden presentar con cierta

frecuencia en los procesos considerados benignos, sin que ello implique una evolución con el tiempo de forma inexorable a malignidad <sup>1,24</sup>.

### **1.3.2. Marcadores genéticos:**

No existen marcadores genéticos o citogenéticos que puedan diferenciar al mieloma múltiple de la MGUS. Tanto traslocaciones, monosomía del cromosoma 13 y otras anomalías son detectadas en ambos procesos. El análisis de metafases sólo detecta cariotipos anormales en el mieloma, pero esto sólo refleja la proliferación acelerada de las células plasmáticas y su mayor número en el mieloma, pues sabemos que las células de la MGUS son tan anormales como las del mieloma. Otros factores como mutaciones del oncogen “ras” y metilación del gen supresor del tumor “p16” han sido propuestos para la diferenciación de ambas entidades, pero no existen suficientes evidencias como para recomendar su uso clínico <sup>1,4</sup>.

### **1.3.3. Angiogénesis en médula ósea:**

Hay evidencias recientes que indican que la angiogénesis en médula ósea está incrementada en el mieloma y tiene valor pronóstico en la enfermedad. La angiogénesis puede tener un papel en la transformación del estadio premaligno (MGUS) a mieloma activo, aunque con los estudios actuales no se ha podido determinar si el incremento de angiogénesis en la MGUS lleva a un aumento de progresión a MM <sup>4</sup>.

### **1.3.4. Factores de riesgo de malignización:**

- Concentración del componente M.
- Tipo de componente M.
- Disminución de inmunoglobulinas policlonales.
- Existencia de proteinuria de Bence Jones.
- Aumento de la velocidad de sedimentación globular (VSG).

Hay muchos autores, entre los que destacan Kyle, Beetham, Blade, Veneri, Pascali, Cesana y sus colaboradores respectivos, que han realizado estudios de

seguimiento de pacientes con MGUS durante años para intentar encontrar factores de riesgo de malignización en estos enfermos.

Kyle ha realizado dos trabajos en pacientes diagnosticados de MGUS, desde 1956 a 1970 el primero, y desde 1960 a 1994 el segundo, con una mediana de seguimiento de 10 años (241 pacientes) y de 15 años (1384 pacientes), respectivamente. El porcentaje de evolución a malignidad fue algo mayor en el primer trabajo que en el segundo (17% vs 10% a los 10 años, 33% vs 21% a los 20 años y 40% vs 26% a los 25 años)<sup>30, 31</sup>. Este resultado es similar al del trabajo de Salgado (19.2% a los 10 años), aunque respecto a este último trabajo hay diferencia en cuanto a la forma de inicio del proceso maligno, pues los pacientes de Salgado tuvieron la mayoría un inicio brusco, mientras que los de Kyle evolucionaron de forma variable<sup>1, 5, 6, 25</sup>.

En cuanto a los factores relacionados con la evolución a malignidad, en el primer trabajo de Kyle no encuentra correlación con la edad del paciente, nivel de hemoglobina, concentración del componente M al diagnóstico, tipo de componente M, disminución de inmunoglobulinas no monoclonales y aparición de las células monoclonales de la médula ósea. Esto contrasta con los resultados de Cesana, que sí considera como factores de riesgo de malignización la infiltración de células plasmáticas en médula ósea y la disminución de las inmunoglobulinas no monoclonales, además de la presencia de proteinuria de Bence Jones y el aumento de la VSG (aunque esto requiere estudios confirmatorios). Cesana sí coincide con Kyle en que el tipo de componente M no presenta correlación, aunque ya apunta que parece de peor pronóstico el isotipo IgA, pero que requiere más estudios<sup>32</sup>. Sin embargo, en el segundo trabajo Kyle encuentra como factores predictores de transformación maligna el tamaño del componente M en el momento del diagnóstico (mejor predictor independiente de progresión), aumentando el riesgo a partir del 1,5 g/dL, y el tipo de componente M (los tipos IgA e IgM tienen un riesgo aumentado de progresión)<sup>1, 5, 6, 28</sup>. Esto coincide con la conclusión de Salgado, el cual no define un grupo de pacientes con MGUS de mayor riesgo de evolución a MM, aunque apunta que podría existir una mayor probabilidad de malignización en los de tipo IgA<sup>25</sup>.

Dino Veneri también coincide con Kyle en considerar la concentración del componente M al diagnóstico como factor de riesgo, concluyendo que aumenta el riesgo a partir de una concentración de 1,7 g/dL<sup>33</sup>.

En cuanto a la proteinuria de Bence Jones, Kyle no estudia la orina a todos los pacientes diagnosticados de MGUS (sólo lo hace a 418 de los 1384). De los 418 pacientes estudiados, el 21 % (88 pacientes) presentaban pico monoclonal de cadenas ligeras libres kappa, el 10% (42 pacientes) presentaba pico monoclonal de cadenas ligeras libres lambda, y el 69% (288 pacientes) no presentaba componente M en orina. Sólo 71 pacientes (17%) tenían una concentración de componente M en orina mayor de 150 mg/24h y menor de 1g/24h, por lo tanto se observa que en los resultados positivos las concentraciones de cadenas ligeras son muy bajas, y no encuentra asociación entre proteinuria y mal pronóstico de la MGUS. Sin embargo, ya sabemos que Kyle considera la proteinuria de Bence Jones idiopática (concentración superior a 1g/24h) como una entidad separada de las MGUS, por lo tanto los pacientes con este diagnóstico no han entrado en el estudio de los 1384 pacientes. También, como ya se ha hecho referencia, cuando estudia a estos pacientes con proteinuria de Bence Jones idiopática sí encuentra un mayor riesgo de malignización<sup>4, 26-28</sup>.

Pascali<sup>34</sup>, en un estudio de 66 pacientes con proteinuria de Bence Jones aislada, observa que sólo 3 pacientes (5%) no presentaron ninguna evidencia de enfermedad linfoproliferativa maligna. Vincent Audard, en una revisión de 2004, afirma que la cantidad de cadenas ligeras libres monoclonales en orina en el momento del diagnóstico y la naturaleza de esas cadenas pueden ser de valor pronóstico. La desaparición espontánea de cadenas ligeras puede ocurrir cuando la proteinuria de Bence Jones es menor de 0,2 g/24h; en cambio la proteinuria de cadenas ligeras lambda está asociada con mayor riesgo de progresión a MM<sup>27</sup>.

Beetham también considera la proteinuria de Bence Jones como factor de riesgo. Afirma que en las MGUS, la presencia de proteinuria de Bence Jones mayor de 100 mg/L, delimita una población con riesgo 3 veces mayor de evolución maligna comparado con aquellos pacientes en quien la proteinuria de Bence Jones no fue detectada. Así mismo, en pacientes con MM latente o asintomático la excreción de

proteinuria de Bence Jones mayor de 50 mg/24 horas fue predictiva de una bajada de la mediana del tiempo de progresión <sup>10</sup>.

Dino Veneri considera que la presencia de proteinuria de Bence Jones es un factor pronóstico desfavorable independientemente de la concentración que presente <sup>33</sup>.

Por tanto, después de la revisión de todos estos trabajos, vemos que la mayoría de los autores coinciden (en uno o en varios) que los factores pronósticos más importantes relacionados con la evolución a malignidad de la MGUS y el MM latente son el tamaño del componente M en el momento del diagnóstico, el componente M de isotipo IgA y la presencia de proteinuria de Bence Jones.

En cuanto a la expectativa de vida y causas de mortalidad en pacientes con MGUS hay escasos datos. Los pocos estudios que han comparado la supervivencia de pacientes con MGUS con la población general indicaron una expectativa de vida disminuida en pacientes con MGUS (Blade, 1992; Kyle, 1993; Van de Poel, 1995). Queda poco claro si este aumento de mortalidad es debido a transformación maligna o a la presencia de factores médicos asociados. Henrik Gregersen et al. realizaron el seguimiento de 1324 pacientes diagnosticados de MGUS durante el período de 1978-93 en North Jutland County, Dinamarca. Concluyen que hay un incremento de la mortalidad en pacientes con MGUS, aunque sólo en parte son debidas las muertes a mieloma múltiple y enfermedades linfoproliferativas malignas. Las enfermedades cardíacas isquémicas y las neoplasias no hematológicas fueron otra importante causa de muerte en estos pacientes. Destacan que los pacientes con MGUS sufren enfermedades coexistentes con un alto impacto en la mortalidad, y además estos pacientes forman un grupo muy heterogéneo. Por lo tanto, desde un punto de vista clínico, el primer objetivo en un paciente con un componente monoclonal es excluir una gammapatía monoclonal, pero además debe tenerse en cuenta la posibilidad de enfermedades coexistentes que puedan contribuir al aumento de la mortalidad <sup>35</sup>.

Generalmente no se puede hacer el diagnóstico de MGUS con certeza en el momento de la valoración inicial. Se necesita hacer nuevos exámenes periódicos para documentar un curso clínico estable. Además, para decidir los procedimientos diagnósticos empleados en pacientes asintomáticos con componente M debe tenerse en

consideración la edad del paciente, la presencia de otras enfermedades y los niveles del componente M <sup>6</sup>.

Al mismo tiempo, todos los autores coinciden que el paciente con diagnóstico de MGUS debe tener seguimiento clínico y de laboratorio de por vida, más frecuente al comienzo de la enfermedad (cada 3-6 meses), y luego espaciarlo según evolución en el primer año después del diagnóstico, para poder detectar una transformación temprana a mieloma u otra enfermedad relacionada, y así poder realizar una actuación terapéutica precoz <sup>1, 2, 4, 36</sup>. Se precisa la medida de la concentración de proteína monoclonal sérica, cadenas ligeras urinarias,  $\beta$ 2-microglobulina sérica y concentración de hemoglobina, a intervalos adecuados <sup>6</sup>.

## **2. PROTEINURIA:**

### **2.1. DEFINICIÓN:**

El riñón es el principal órgano implicado en la regulación del volumen y composición química del medio interno. Mediante la formación de la orina, de composición altamente variable, permite el mantenimiento acuoso del organismo, conservando la composición química de los fluidos corporales. Además, lleva a cabo la excreción de sustancias no útiles para el organismo, ya sean procedentes de las vías catabólicas endógenas, o bien, procedentes de la metabolización de sustancias administradas desde el exterior. A su vez, el riñón también tiene funciones endocrinas, como la síntesis de determinadas hormonas (eritropoyetina, prostaglandinas), la síntesis de enzimas que intervienen en la regulación de la presión sanguínea (renina, calicreína), la activación de hormonas (calcitriol), y la degradación de otras hormonas (aldosterona, insulina y glucagón) <sup>37</sup>.

#### **2.1.1. ESTRUCTURA RENAL:**

La **nefrona** es la unidad funcional del parénquima renal, y cada riñón contiene alrededor de 1200000 nefronas. Se compone de un corpúsculo renal en comunicación con un túbulo renal.

El ***corpúsculo renal de Malpighio*** es una estructura esferoideal, de aproximadamente 1  $\mu$  de diámetro, constituida por la cápsula de Bowman y el ovillo capilar contenido en su interior o glomérulo. La **cápsula**, revestida interiormente por un epitelio aplanado, posee dos aberturas: el polo vascular, a través del cual penetra la arteriola aferente y emerge la eferente, y el polo urinario, que comunica con el túbulo renal. Entre la cápsula y el ovillo glomerular se extiende el espacio urinario, donde se recoge el ultrafiltrado plasmático <sup>38</sup>. El **glomérulo** procede de la ramificación de la arteriola aferente. A nivel del polo vascular, la arteriola aferente se subdivide en varias ramas, cada una de las cuales origina una red capilar independiente (lóbulos glomerulares). Cada lóbulo está formado básicamente por varios capilares dispuestos alrededor de una región de soporte o mesangio glomerular y contiene tres tipos de



células: endoteliales, mesangiales y epiteliales (podocitos). La pared de los capilares del glomérulo está constituida por una membrana basal glomerular (MBG) revestida en su interior por un endotelio y externamente por los podocitos. Las células endoteliales separan la MBG de la luz del capilar. En la MBG se pueden diferenciar tres áreas: la lámina densa en posición central y las láminas raras interna y externa; está revestida externamente por las prolongaciones citoplasmáticas de los podocitos. La MBG no rodea por completo la pared del capilar glomerular, sino que, después de un recorrido más o menos circular, se refleja sobre sí misma y pasa a constituir la membrana basal del capilar adyacente; esta disposición delimita un espacio central, común a varios capilares, denominado mesangio glomerular, compuesto de células mesangiales (con actividad fagocítica y contráctil) incluidas en un material de estructura fibrilar o matriz mesangial. En el polo vascular del glomérulo se encuentra el aparato yuxtaglomerular, el cual incluye el área de contacto entre la arteriola aferente, la arteriola eferente y la porción del túbulo renal denominada mácula densa; es rico en terminaciones adrenérgicas y tiene un papel importante en la conservación del sodio, el control de la tensión arterial (secreción de renina) y la regulación del filtrado glomerular (feedback tubuloglomerular)<sup>38</sup>.

El **túbulo renal** es una estructura constituida por una lámina basal recubierta en su interior por una sola capa de células cuya forma, tamaño y características varían a lo largo de su trayecto. Se compone de varios segmentos<sup>38</sup>:

- El **túbulo proximal** nace en el polo urinario y tiene una primera porción tortuosa situada íntegramente en la región cortical (túbulo contorneado proximal) seguida de una segunda porción recta que desciende hacia la región medular (rama gruesa descendente). Las células son cuboidales con abundantes repliegues (microvellosidades) de la membrana celular en contacto con la luz tubular, lo que le confiere una gran superficie para el transporte de sustancias capaces de ser reabsorbidas.
- El **asa de Henle** está constituida por una rama delgada descendente y una rama delgada ascendente, ambas provistas de un epitelio aplanado. Juegan un importante papel en el mecanismo multiplicador a contracorriente que permite obtener un gradiente osmótico corticomedular y concentrar la orina.

- El túbulo distal tiene tres porciones: una ascendente (rama gruesa ascendente), la mácula densa y una porción tortuosa situada íntegramente en la región cortical (túbulo contorneado distal).
- El túbulo colector, una estructura tubular que recoge la orina procedente de varias nefronas y desemboca en la papila renal. Juega un papel decisivo en los mecanismos de concentración y dilución de la orina.

### **2.1.2. FORMACIÓN DE LA ORINA:**

La **filtración glomerular** es el proceso físico por el que el agua y las sustancias disueltas en ella pasan de la sangre a las vías urinarias para constituir la orina primitiva o filtrado glomerular. El riñón recibe aproximadamente el 20% de la sangre arterial bombeada por el corazón durante la sístole, lo que representa el mayor flujo sanguíneo con respecto a la masa de entre todos los órganos corporales. La sangre llega a la arteriola aferente del glomérulo y es ultrafiltrada; parte de su contenido acuoso pasa al espacio de Bowman, constituyendo el filtrado glomerular, y el resto continúa su curso por la arteriola eferente, sin sufrir posteriores filtraciones<sup>37</sup>.

El fluido que pasa del espacio intravascular al espacio urinario debe atravesar una barrera constituida por el endotelio vascular, la membrana basal glomerular y la capa de podocitos. El endotelio capilar es de tipo fenestrado, lo que permite que el plasma que llega al glomérulo a elevada presión escape por los pequeños orificios sin que las células sanguíneas abandonen el espacio intravascular. La membrana basal es impermeable a las macromoléculas y actúa como tamiz molecular, impidiendo así que la mayor parte de las proteínas plasmáticas pasen al espacio urinario. El epitelio glomerular en el espacio urinario está formado por los podocitos, que son células con prolongaciones citoplasmáticas ricas en material sialoproteico, que está cargado negativamente y repele por ello las cargas negativas, haciendo preferente la filtración de moléculas cargadas positivamente a igualdad de tamaño molecular. El resultado de la filtración es la orina primitiva, de composición iónica similar al plasma y concentración proteica muy inferior<sup>37,39</sup>.

En el filtrado glomerular existe una cierta cantidad de proteínas, la mayor parte de la cual es captada y catabolizada por las células del túbulo proximal. La permeabilidad glomerular viene dada por la combinación de un endotelio especializado, la membrana basal y las células epiteliales en cepillo, que producen un filtro que restringe el paso de macromoléculas dependiente del tamaño, la carga y la forma de las mismas, además de su concentración en plasma. En general, el transporte de las moléculas de proteínas por la membrana glomerular disminuye progresivamente a medida que aumenta el peso molecular. Normalmente, las proteínas de alto peso molecular, tales como las IgM (peso molecular 900000 daltons), no aparecen en el filtrado glomerular, excepto en cantidades traza. Cantidades significativas de albúmina (peso molecular 66000 daltons) pueden pasar al filtrado como resultado de su alta concentración plasmática y relativamente bajo peso molecular. Las proteínas de peso molecular entre 15000 a 40000 daltons se filtran más fácilmente pero en menor cantidad por su baja concentración en plasma. Así mismo, las proteínas cargadas positivamente se filtran con más facilidad que las cargadas negativamente (como la albúmina); esto hace de la albúmina un marcador ideal de filtración glomerular, ya que su excreción aumenta tanto por cambios de la carga molecular como por cambios del tamaño del poro del filtro glomerular<sup>15,40</sup>.

Atendiendo a todas las características anteriores (forma, peso molecular y carga), se establece el *Coefficiente de Filtración Glomerular (CFG)*, definido como la relación entre la concentración en el filtrado glomerular y la concentración en plasma de una determinada molécula (tabla I 2)<sup>15,41</sup>.

$$\text{Coeficiente de filtración glomerular} = \frac{\text{Concentración en el filtrado glomerular}}{\text{Concentración en plasma}}$$

**Tabla I 2: Permeabilidad Glomerular relativa de las Moléculas.**

Molécula	Peso molecular (daltons)	Diámetro (nm)	pI	CFG
Agua	18	0.38	–	1.0
Urea	60	0.54	–	1.0
Creatinina	113	0.60	–	1.0
Potasio	39	0.66	–	1.0
Sodio	23	0.72	–	1.0
Glucosa	180	0.90	–	1.0
Dextrano	15000	2.0	–	1.0
Inulina	5000	2.4	–	1.0
$\beta$ 2-microglobulina	11800	1.6	5.6	0.7
Cistatina C	12800	2.6	9.2	~ 0.7
RBP	22000	2.1	4.5	~ 0.7
$\alpha$ 1-microglobulina	30000	2.9	4.5	~ 0.3
Albúmina	66000	3.5	4.7	0.0002
Inmunoglobulina G	150000	5.5	7.3	0.0001

Abreviaturas = pI: punto isoeléctrico; CFG: Coeficiente de Filtración Glomerular; RBP: Proteína ligada a retinol.

Las moléculas lineales tienen un CFG más elevado que las proteínas globulares (de mayor diámetro). El punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas estudiadas está en el rango entre 4.5 y 5.5 (excepto para la IgG y la Cistatina C), y sus respectivos CFG están comprendidos entre 0.0002 y 0.7. Como podemos ver, a parecido punto isoeléctrico, tienen un CFG más elevado las proteínas de menor peso molecular y menor diámetro. A su vez, hay estudios de filtración glomerular con dextranos en humanos, que concluyen que componentes del capilar glomerular cargados negativamente podrían impedir la filtración de muchas proteínas también cargadas negativamente <sup>41</sup>.

Las moléculas con CFG igual a 1 son: agua, urea, creatinina, potasio, sodio, glucosa, dextrano e inulina, principalmente. Las proteínas tienen todas un CFG menor de 1, siendo cercano a cero en el caso de la albúmina (0.0002) y la IgG (0.0001). La

carga filtrada de proteínas depende del producto del CFG y la concentración libre en plasma, por tanto la carga de albúmina por nefrona es mucho mayor que la de otras proteínas filtradas<sup>15</sup> (tabla I 3).

**Tabla I 3: Carga filtrada y Reabsorción de Proteínas.**

Proteína	Concentración libre en plasma	CFG	Carga filtrada	Concentración urinaria	% Reabsorbido
IgG	10 g/L	0.0001	1 mg/L	0.1 mg/L	99
Albúmina	40 g/L	0.0002	8 mg/L	5 mg/L	99
RBP	25 mg/L	~ 0.7	17.5mg/L	0.1 mg/L	99
$\alpha$ 1-microglobulina	25 mg/L	~ 0.3	7.5 mg/L	5 mg/L	99
Cistatina C	1 mg/L	~ 0.7	0.7 mg/L	0.1mg/L	99
$\beta$ 2-microglobulina	1.5 mg/L	0.7	1.1 mg/L	0.1 mg/L	99
Proteína total	70 g/l	NA*	700 mg/L	150 mg/L	NA*

Abreviaturas = RBP: Proteína ligada a retinol; CFG: Coeficiente de Filtración Glomerular; IgG: Inmunoglobulina G

\*No aplicable debido a la secreción tubular de proteínas (ej.: glicoproteína de Tamm Horsfall)

**Reabsorción tubular:** Dentro de la nefrona el filtrado glomerular sufre cambios en su composición química por medio de procesos de secreción y de reabsorción, procesos que son selectivos para las distintas sustancias presentes y tienen lugar en regiones concretas de la nefrona. Estos procesos están estrictamente regulados en función de las necesidades del organismo<sup>37</sup>.

En condiciones normales, por encima del 99% de las proteínas filtradas son reabsorbidas por el túbulo proximal. Sin embargo, las proporciones de proteínas individuales excretadas en la orina dependen del límite de reabsorción por los túbulos renales, ya que la capacidad de reabsorción tubular es un proceso saturable (la saturación ocurre cuando aparece una albuminuria superior a 3 g/g de creatinina)<sup>40, 42</sup>; si la cantidad de proteína filtrada aumenta el riñón puede adaptarse incrementando la reabsorción tubular de proteínas hasta llegar al punto de saturación, a partir del cual ocurre la proteinuria. Las proteínas de bajo peso molecular son escindidas por exopeptidasas situadas en el borde en cepillo de la membrana del túbulo proximal y

reabsorbidas como aminoácidos y dipéptidos por un mecanismo de transporte específico sodio-dependiente. Las proteínas de alto peso molecular normalmente no son filtradas por el glomérulo, pero cuando éste falla y aparecen en la luz tubular, se reabsorben por la unión de la proteína a receptores específicos en la célula epitelial tubular y pasan al interior de las células por pinocitosis. Los péptidos incorporados en la vacuola pinocítica se unen a un lisosoma, constituyendo un fagosoma, que permitirá la hidrólisis de las proteínas por enzimas lisosomales, seguido del retorno de los aminoácidos constituyentes a la sangre. Los fragmentos no digeridos son secretados a la orina junto con las enzimas lisosomales, incluyendo la N-acetilglucosaminidasa <sup>15, 40, 43-45</sup>.

Existen evidencias de que la reabsorción de albúmina y del resto de las proteínas está mediada por *receptores* a lo largo de toda la longitud del túbulo proximal. Es un sistema de transporte con baja afinidad pero alta capacidad, universal para todas las proteínas <sup>15, 46</sup>.

Hasta hace poco tiempo se creía que las proteínas eran reabsorbidas por un proceso de endocitosis no específico. Sin embargo, recientes estudios muestran que las proteínas megalina y cubilina juegan un papel crucial en este proceso; ambas son receptores multiligandos expresados abundantemente en el túbulo proximal (aunque también aparecen en otros tejidos como células endometriales, células tiroideas y paratiroides, entre otras). Ambas proteínas actúan de forma cooperativa en el caso de la reabsorción de la albúmina, así como de la hemoglobina y las cadenas ligeras de inmunoglobulinas; sin embargo, en el caso de la transferrina, aparece la cubilina exclusivamente implicada en el proceso de reabsorción <sup>44, 46, 47</sup>. La ausencia o disfunción de estos receptores está asociado con una proteinuria tubular significativa, mostrando que ambas proteínas (cubilina y megalina) son importantes para la normal reabsorción de las proteínas filtradas <sup>48</sup>. Cuando existe daño tubular, las proteínas de bajo peso molecular ( $\alpha$ 1-microglobulina, lisozima, cadenas ligeras libres, entre otras) están aumentadas antes que la albúmina; la causa de esto no está clara, pero como al parecer el proceso de endocitosis está mediado por receptores con diferente afinidad por distintas proteínas, en esta situación la albúmina es preferentemente reabsorbida <sup>15</sup>.

Respecto a la *carga iónica* de las proteínas, se ha visto que la reabsorción es diferente según la carga iónica de las proteínas. Se ha demostrado que las proteínas catiónicas, tal como la IgG, se unen más ávidamente a la membrana apical de las células del túbulo proximal porque esta membrana está cargada negativamente. Como consecuencia, las proteínas catiónicas presentes en la luz tubular son más fácilmente endocitadas, y por tanto, reabsorbidas, que las proteínas aniónicas, tal como la albúmina. Aunque, como hemos visto, la carga iónica no es el único factor determinante para la reabsorción, por lo que, incluso para proteínas de similar tamaño y carga, existe competición entre ellas para su reabsorción tubular <sup>46</sup>.

El mayor constituyente de las proteínas urinarias normales es albúmina (alrededor de un tercio del total); la proteína uromucoide de Tamm-Horsfall, una glicoproteína secretada por las células tubulares distales y las células del asa de Henle ascendente, que tiene funciones específicas en el interior de la nefrona, supone aproximadamente otro tercio de la pérdida total normal de proteínas; y en menor cantidad, aparecen proteínas de bajo peso molecular filtradas de la sangre (proteína ligada a retinol,  $\beta$ 2-microglobulina, cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, lisozima), la IgA de las secreciones del tracto urinario, las enzimas y proteínas de las células tubulares epiteliales, otras células descamadas y los leucocitos, que también contribuyen a las proteínas urinarias <sup>15, 49, 50</sup>.

## 2.2. MARCADORES PROTEICOS PARA LOCALIZAR LA LESIÓN RENAL:

Muchas proteínas presentes en la orina son plasma-derivadas, y la concentración de estas proteínas en orina está fuertemente influenciada por la función de la barrera glomerular y la función tubular de las nefronas, como se ha explicado anteriormente. Puesto que la enfermedad renal a menudo produce una disminución de la barrera glomerular y/o función tubular, se entiende que el análisis de la proteinuria para identificar y monitorizar la enfermedad renal nos debe llevar a la identificación y cuantificación de las proteínas que están aumentadas en la orina. Esto nos va a permitir clasificar las proteinurias en renales (glomerulares, tubulares o mixtas), pre-renales y postrenales (tabla I 4) <sup>11, 51</sup>.

**Tabla I 4: Principales marcadores de proteinurias patológicas.**

Proteínas	PM (kDa)	Valores normales (mg/L)	Proteinurias patológicas
$\beta$ 2-microglobulina	12	<0.5	Tubulares (sobrecargas)
Lisozima	14	<0.5	Tubulares (sobrecargas)
RBP	21	<0.5	Tubulares
Cadenas ligeras	25	<10	Tubulares (sobrecargas)
$\alpha$ 1-microglobulina	33	<15	Tubulares
Albúmina	70	<20	Glomerulares
Transferrina	80	<2	Glomerulares
IgG	150	<10	Glomerulares
$\alpha$ 2-macroglobulina	700	Ausente	Postrenales?
Tamm-Horsfall	7000	<40	?

Abreviaturas = RBP: Proteína ligada a retinol; PM: peso molecular; IgG: Inmunoglobulina G



### 2.2.1. MARCADORES GLOMERULARES:

#### **Albúmina:**

La albúmina es la proteína mayoritaria en el plasma (aproximadamente 4,5 g/dL), con un peso molecular de unos 70 kDa. Su coeficiente de filtración glomerular es prácticamente nulo (CFG = 0.0002), y su concentración urinaria fisiológica es muy pequeña (< 20 mg/L ó < 30 mg/g de creatinina) <sup>51</sup>. Al comienzo de la enfermedad glomerular se manifiesta con una disminución de la carga negativa de los capilares glomerulares, lo que permite que la albúmina, cargada negativamente, se filtre con más facilidad, aumentando la cantidad que llega al túbulo proximal, que cuando supera la capacidad de reabsorción del mismo da como resultado un aumento de su concentración en la orina final <sup>52</sup>.

Actualmente, la determinación de la concentración de albúmina en orina está recomendada en el seguimiento de los pacientes diabéticos y/o hipertensos, y cuando se utilizan de forma crónica medicamentos nefrotóxicos, para detectar de forma precoz la afectación renal que pueden producir estas enfermedades, y así, poder prevenir la progresión de la misma actuando terapéuticamente. Por supuesto, también está indicada su cuantificación siempre que se sospeche enfermedad renal <sup>51, 53</sup>.

Los valores patológicos de la concentración urinaria de albúmina son los siguientes <sup>51, 53, 54</sup>:

- Microalbuminuria: 30-300 mg/g de creatinina. Indican una nefropatía incipiente.
- Macroalbuminuria: > 300 mg/g de creatinina. La nefropatía está establecida.

#### **Transferrina:**

Es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, cuya concentración en suero normal es de 200 mg/dL a 400 mg/dL. Su concentración en la orina normal es menor de 2 mg/L. Su aumento en la orina ocurre cuando se altera la barrera glomerular <sup>49, 51</sup>.

**Inmunoglobulina G:**

Es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, y una concentración en suero normal de alrededor de 1 g/dL. Su CFG es prácticamente nulo (0.0001), por lo que su concentración en orina normal es muy baja (< 10 mg/L). Cuando se producen cambios en la estructura histológica del glomérulo (no sólo cambios en la carga iónica), la IgG puede atravesar el filtro glomerular incrementándose su concentración en la orina <sup>15, 51</sup>.

**Índice de selectividad glomerular:**

Como hemos visto, según el grado de deterioro del filtro glomerular va a permitir el paso de proteínas de distinto peso molecular. Cuantificando estas proteínas nos va a permitir diferenciar entre dos tipos de proteinuria glomerular <sup>15</sup>:

- *Selectiva*, cuando el daño glomerular es mínimo y sólo aumenta la filtración de proteínas de peso molecular intermedio, como la albúmina y transferrina.
- *No selectiva*, cuando el daño glomerular es mayor y aumenta la filtración tanto de proteínas de peso molecular intermedio como alto (albúmina, transferrina e IgG).

Para calcular la selectividad de la proteinuria glomerular se han establecido los llamados **índices de selectividad (IS)**, que se calculan a partir de los aclaramientos de dos proteínas de peso molecular suficientemente distinto. Aunque en la actualidad no son muy utilizados, pueden ayudar para hacer un seguimiento del daño glomerular; incluso algunos autores han concluido que puede ayudar a diferenciar entre pacientes en los que es posible una remisión del daño glomerular con tratamiento de los que no hay posibilidad de remisión <sup>15, 46, 51</sup>.

Los índices de selectividad más utilizados son los siguientes <sup>51, 55</sup>:

- *Índice de Cameron*: Relaciona la IgG y la transferrina:

$$IS = \frac{\text{Aclaramiento IgG}}{\text{Aclaramiento Transferrina}} = \frac{\text{Transferrina plasma} \times \text{IgG orina}}{\text{Transferrina orina} \times \text{IgG plasma}}$$

- *Índice de Créteil*: Relaciona la IgG y la albúmina:

$$IS = \frac{\text{Aclaramiento IgG}}{\text{Aclaramiento Albúmina}} = \frac{\text{Albúmina plasma} \times \text{IgG orina}}{\text{Albúmina orina} \times \text{IgG plasma}}$$

- *Índice de Necker*: Relaciona las concentraciones urinarias de la IgG y de la albúmina.

El punto de corte del IS para considerar proteinuria glomerular selectiva y no selectiva varía ligeramente según los estudios. Los valores más comúnmente admitidos para el índice de Cameron y el índice de Créteil son < 0.1 en el caso de proteinuria glomerular selectiva y > 0.2 en el caso de proteinuria glomerular no selectiva <sup>15, 44, 46, 51, 55</sup>. Bergón et al, en un estudio realizado para establecer intervalos de referencia de los marcadores proteicos, nos dice que la proteinuria glomerular la consideran selectiva cuando la relación IgG/Albúmina está por debajo de 0.2, aún cuando la excreción de IgG es anormal. Cuando este cociente está por encima de 0.2, la proteinuria glomerular la consideran no selectiva <sup>56</sup>.

## 2.2.2. MARCADORES TUBULARES:

### α1-microglobulina:

Es una proteína de peso molecular de 33 kDa. Su concentración libre en plasma es de unos 25 mg/L. El CFG es de aproximadamente 0.3. En condiciones normales prácticamente toda la proteína filtrada por el glomérulo es reabsorbida a nivel tubular, por lo que en la orina normal su concentración es menor de 15 mg/L. Cuando existe

patología tubular que altera la función de reabsorción la concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina en orina aumenta<sup>15, 51, 57</sup>.

La proteína  $\alpha$ 1-microglobulina es el marcador de proteinuria tubular más utilizado debido a su sensibilidad y su estabilidad en la orina, pues no está afectado por el pH urinario. Además, la concentración de  $\alpha$ 1-microglobulina en la orina presenta baja variabilidad biológica, porque su concentración en suero está mucho menos sujeta a cambios extrarrenales que en el caso de otras proteínas de bajo peso molecular, tales como la proteína ligada a retinol o la  $\beta$ 2- microglobulina<sup>51, 57, 58</sup>.

Hay que distinguir la patología tubular aislada, en la que el aumento de esta proteína no se acompaña de un aumento llamativo de albúmina, de la patología tubular secundaria a una glomerulopatía grave, en la que hay una sobrecarga de proteínas a nivel tubular por aumento de la filtración glomerular. En este último caso, la abundante albuminuria “per se” puede saturar la capacidad de reabsorción tubular, resultando una excreción elevada de  $\alpha$ 1-microglobulina<sup>40, 57</sup>. La excreción de esta proteína refleja los defectos de reabsorción tubulointersticiales tanto agudos como crónicos, por lo que su cuantificación puede ser aplicada para el seguimiento de glomerulopatías primarias, como ocurren en la diabetes y la hipertensión (en estos casos la proteinuria sería mixta, glomerular y tubular)<sup>40, 58, 59</sup>.

### **Otros marcadores tubulares:**

Existe un grupo de proteínas de peso molecular bajo (<30 kDa) que aumentan su secreción urinaria cuando falla la función de reabsorción tubular de forma grave, ya sea por alteración estructural del túbulo proximal, o por saturación de su capacidad de reabsorción, de manera que hasta estas proteínas pequeñas dejan de reabsorberse. Estas proteínas son las cadenas ligeras libres, la proteína ligada a retinol, la lisozima, la  $\beta$ 2-microglobulina y la cistatina C, entre otras. En la actualidad no está indicada su cuantificación como marcadores de patología tubular por la falta de especificidad diagnóstica (las concentraciones de lisozima y de cadenas ligeras libres, así como de  $\beta$ 2-microglobulina, están aumentadas en ciertas patologías neoplásicas o inmunológicas provocando proteinurias por sobrecarga); además, la  $\beta$ 2-microglobulina y la cistatina C

son inestables en orina a pH fisiológico, por lo que es difícil su cuantificación<sup>40, 51, 60</sup>. La proteína ligada a retinol también es inestable a pH < 5 a temperatura superior a 20° C, aunque según un estudio de Blumsohn et al, a temperatura inferior a 4° C se mantiene estable sin importar el pH. Sin embargo, otros autores, como Donalson et al, consideran que para poder medir las proteínas  $\beta$ 2-microglobulina y RBP hay que alcalinizar la orina; además, opinan que los pacientes con procesos patológicos pueden tener aumentada la degradación de las mismas<sup>61</sup>.

También, numerosas enzimas han sido medidas en la orina; muchas son inestables o son inhibidas por otros constituyentes de la orina, de modo que requieren una recogida de la muestra muy cuidadosa. De ellas, la enzima N-acetilglucosaminidasa se encuentra en los lisosomas tubulares, siendo un marcador de la integridad del túbulo renal, pero aunque es estable en la orina, tiene poca especificidad diagnóstica, pues se encuentra en la orina de individuos sanos; además, presenta diferentes isoformas cuyo patrón cambia en diferentes enfermedades renales<sup>15, 51</sup>.

### **Proteína de Tamm-Horsfall:**

Es una de las proteínas más abundantes de la orina fisiológica; sus valores urinarios normales son de 30-60 mg/L. Es sintetizada por el túbulo renal, por lo que no necesita atravesar el filtro glomerular. Forma agregados de hasta 7000 kDa. Su concentración urinaria se ve modificada en ciertas litiasis, en la diabetes, en el trasplante renal, y también en el mieloma múltiple, donde forma complejos con las cadenas ligeras libres que precipitan en los túbulos renales<sup>51</sup>.

### **2.2.3. MARCADORES PRE-RENALES:**

En las proteinurias pre-renales (o por sobrecarga), una proteína en exceso en el plasma aparece en la orina definitiva cuando su concentración en la orina primitiva sobrepasa la tasa de reabsorción máxima tubular, sin que exista daño glomerular o tubular concomitante, aunque la proteína por sí misma puede causar daño renal<sup>15, 49, 51</sup>.

**Cadenas ligeras libres:**

Las cadenas ligeras libres son proteínas de un peso molecular alrededor de 25 kDa, y su concentración en orina normal no sobrepasa los 10 mg/L. Las proteinurias por sobrecarga debido a cadenas ligeras libres corresponden, en la gran mayoría de casos, a un exceso de producción por un clon monoclonal linfocitario, aunque también puede tener un origen policlonal<sup>50, 51</sup>. Debido a que su presencia nos puede estar indicando la existencia de una enfermedad maligna, es muy importante su diagnóstico precoz, para así poder actuar terapéuticamente de forma temprana.

**Otras proteínas:**

Proteínas responsables de proteinurias por sobrecarga son la hemoglobina, la mioglobina, la lisozima o la  $\beta$ 2-microglobulina, que aumentan su concentración plasmática en circunstancias clínicas bien definidas y poco frecuentes. Todas son de peso molecular bajo, por lo que se filtran sin dificultad por el glomérulo renal, saturando la capacidad de reabsorción del túbulo proximal<sup>50, 51</sup>.

**2.2.4. MARCADORES POSTRENALES:**

Las proteinurias postrenales están constituidas por proteínas que provienen del tracto urinario por debajo de los riñones, siendo frecuente su etiología infecciosa o maligna. Puede contener albúmina y otras proteínas de menor o mayor peso molecular<sup>15, 51</sup>.

 **$\alpha$ 2-macroglobulina:**

Es una proteína de un peso molecular alrededor de 700 kDa, que en condiciones normales está ausente en la orina, pues no puede atravesar el filtro glomerular (CFG = 0). Tiene valor como marcador de proteinuria postrenal cuando la excreción de albúmina en orina es mayor de 100 mg/L. Si la relación de esta proteína con la albúmina en orina es similar a la que existe en plasma ( $\alpha$ 2-

macroglobulina/albúmina  $> 0.02$ ) indica lesión postrenal, mientras que si es  $< 0.02$  nos indica proteinuria renal. Basándonos en estos valores podemos distinguir la causa de una hematuria que se acompaña de proteinuria con técnicas no invasivas<sup>40, 42, 45, 51, 62</sup>.

### 2.3. VALORACIÓN DE LA PROTEINURIA:

Los marcadores proteicos urinarios deben ser seleccionados atendiendo a los siguientes criterios <sup>58</sup>:

- Permitir diagnosticar varios tipos de proteinuria.
- Proporcionar información de la localización del daño renal.
- Posibilidad de medirlo en concentraciones fisiológicas y patológicas, de modo que sea adecuado para screening y monitorización de la evolución de la enfermedad o de la intervención terapéutica.
- No estar influenciado por enfermedades extrarrenales.
- Ser estable en orina para poder realizar la cuantificación.

Los marcadores proteicos que mejor cumplen estos criterios, y por tanto, los utilizados en la actualidad para diagnosticar los mecanismos causantes de proteinuria son principalmente albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina, IgG y  $\alpha$ 2-macroglobulina, junto a la determinación de proteínas totales <sup>40, 58</sup>. En la tabla I 5 se resumen los valores de los distintos marcadores en las proteinurias renales más habituales.

**Tabla I 5: Descripción de las proteinurias renales según la excreción del marcador proteico.**

Proteínas	Valores normales (mg/24 h)	Proteinuria renal (mg/24h)		
		Glomerular	Tubular	Mixta
Proteínas totales	<150	>300	<500	>500
Albúmina	<30	>300	<100	>300
$\alpha$ 1-microglobulina	<15	<15	>15	>15
Inmunoglobulina G	<10	Variable*	<10	>10

\* La presencia de IgG en la orina depende del tipo de proteinuria glomerular: selectiva = <10mg/24 h; no selectiva = >10mg/24 h. Los valores son indicativos.



La enfermedad renal activa se puede excluir si los valores de las proteínas totales, la albúmina y la  $\alpha$ 1-microglobulina en orina están dentro de sus rangos de referencia. Una excreción normal de ambos marcadores proteicos, pero con valores de IgG en orina aumentados puede indicar una gammapatía monoclonal <sup>62</sup>.

Si la excreción de proteínas totales en orina es mayor de 300 mg/L, y la suma de albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina e IgG en orina es menor del 60 % de las proteínas totales excretadas, podemos decir que hay un hueco o gap proteico, es decir, debe haber otras proteínas que no se han identificado, por lo que hay que sospechar una causa de proteinuria pre-renal, como es la proteinuria de Bence Jones <sup>40</sup>. Otros autores hablan de la necesidad de determinar la proteinuria de Bence Jones cuando ese porcentaje es menor del 30 % <sup>62</sup>.

#### **2.4. PREVALENCIA DE PROTEINURIA:**

El valor medio de excreción diaria de proteínas totales en orina en personas sanas es aproximadamente de 50 mg/día, sin superar los 150 mg; una excreción mayor se conoce como **proteinuria**, siendo un importante indicador de enfermedad renal.

El conocimiento de la **prevalencia de proteinuria** en adultos como indicador de enfermedad renal es de vital importancia para entender la evolución de la enfermedad renal, para planificar recursos de salud, y para intentar reducir la incidencia de insuficiencia renal <sup>63</sup>.

El estudio AUSDIAB (*Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study*) toma una muestra representativa de la población australiana, siendo uno de sus objetivos determinar la prevalencia de los indicadores más importantes de enfermedad renal, como son la proteinuria, la hematuria y el deterioro del filtrado glomerular. Este estudio lo realiza sobre una muestra de 10949 adultos de ambos sexos mayores de 25 años. Encontraron un cociente proteína/ creatinina en orina > 200 mg/g creatinina en el 2.4% de los participantes, siendo la prevalencia similar en hombres y mujeres, pero creciente con la edad (de 0.8% en el grupo de 25 a 44 años de edad a 6.6% en los de 65 años de edad o mayores) (Tabla I 6). En casi la mitad (46.8%) de los participantes que presentaron proteinuria, éste fue el único indicador de enfermedad renal encontrado. En el resto aparecía acompañada de otro indicador. También vieron que la prevalencia de proteinuria fue 4 veces mayor en diabéticos y 5 veces mayor si además padecían hipertensión arterial. Aunque estos resultados son referidos a la población australiana, es muy probable que sean muy similares a las que existan en la mayoría de países desarrollados <sup>63</sup>.

**Tabla I 6: Estudio AUSDIAB: proteinuria por grupos de edad.**

Grupo de edad (años)	≥ 200 mg/g*	200-799 mg/g*	≥ 800mg/g*
25-44	0.8 (0.4-1.3)	0.7 (0.3-1.2)	0.1 (0.0-1.2)
45-64	2.2 (1.4-3.0)	1.7 (1.3-2.0)	0.5 (0.0-1.2)
≥ 65	6.6 (4.6-8.6)	5.6 (3.8-7.4)	1 (0.4-1.5)

\* Cociente proteínas totales/creatinina en orina. Media de prevalencia en % (intervalo de confianza 95%).

El estudio NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*), con una muestra de 4101 adultos de 20 años o mayores, determina la prevalencia de enfermedad renal crónica en los Estados Unidos. Para ello, uno de los factores que estudia es la prevalencia de albuminuria, siendo el resultado una prevalencia del 11,7 % (10,6% con microalbuminuria, y 1,1% con macroalbuminuria), aunque se distribuye de forma diferente según la edad y la presencia o ausencia de diabetes. En adultos con historia de diabetes, la prevalencia de microalbuminuria y macroalbuminuria es de 43,2% y 8,4%, respectivamente, en mayores de 70 años, mientras que en adultos de esa edad sin historia de diabetes la prevalencia de microalbuminuria y macroalbuminuria es 24,2% y 3% respectivamente <sup>64, 65</sup>.

## **2.5. MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS DE PROTEINURIA:**

Los mecanismos que permiten la aparición de proteínas en la orina son diversos, pre-renales, renales (glomerular y/o tubular) y postrenales. Las principales situaciones en las que puede aparecer proteinuria son las siguientes <sup>15, 37, 64</sup>:

- Un aumento de la carga filtrada por el glomérulo que satura la capacidad de reabsorción tubular con una función tubular normal.
- Un aumento de la permeabilidad del filtro glomerular por alteración funcional y/o estructural del mismo.
- Una disminución de la capacidad de reabsorción tubular por daño en el túbulo.
- La combinación de los mecanismos anteriores.
- Causas extrarrenales.

### **2.5.1. PROTEINURIA GLOMERULAR:**

Es la forma más frecuente de proteinuria. La mayor parte de la proteína excretada es albúmina. El aumento de la permeabilidad glomerular ocurre en numerosas condiciones caracterizadas por daño difuso de los riñones: en la Diabetes Mellitus aumenta la permeabilidad vascular y aparece albuminuria cuando el control metabólico es malo; en la Hipertensión Arterial ocurre un aumento de flujo sanguíneo y presión dentro del glomérulo, alterando la morfología y función glomerulares; las enfermedades por inmunocomplejos a menudo afectan al glomérulo; en nefritis asociadas con lupus eritematoso diseminado y muchas otras causas de glomerulonefritis, aparecen en la membrana glomerular depósitos granulares conteniendo inmunoglobulinas y componentes del complemento <sup>8, 15</sup>.

Al principio de la enfermedad glomerular renal se filtran proteínas pequeñas, incluyendo la albúmina, por lo que los niveles de albúmina en orina aumentan. En este estadio se habla de *proteinuria glomerular selectiva*. Progresivamente las lesiones glomerulares se agravan y se produce la filtración de proteínas de mayor tamaño, como por ejemplo la IgG; entonces se habla de *proteinuria glomerular no selectiva*. Los cambios en la selectividad van paralelos a cambios histológicos en la biopsia renal <sup>15</sup>.

El concepto de selectividad de la proteinuria está basado en un *modelo de membrana*: uno de los principales componentes de la membrana basal glomerular es el heparan sulfato proteoglicano, cargado negativamente, por lo que representa la barrera aniónica de la misma; además, posee dos poblaciones diferentes de poros que permiten el filtrado glomerular: los poros pequeños, con un radio de 29-31 angström y cargados negativamente, y los poros grandes, de 110 angström de radio aproximadamente. Los poros pequeños son más numerosos que los grandes (relación 10000:1). En condiciones normales, las moléculas de albúmina (radio de 36 angström) y las de IgG (radio de 55 angström) pasan sólo por los poros grandes. Si ocurre un aumento de las proteínas en la matriz glomerular se produce una disminución en la membrana basal glomerular de heparan sulfato proteoglicano, por lo que se pierde la carga negativa de la pared del capilar glomerular, y en consecuencia el tamaño del poro pequeño aumenta aproximadamente a 45 angström, lo que posibilita que las moléculas de albúmina también puedan pasar por estos poros, pero no las de IgG (proteinuria selectiva). Cuando aparecen en la orina proteínas de alto peso molecular (proteinuria no selectiva) indica un aumento del número de poros grandes y/o la presencia de shunt o defectos de la membrana glomerular, que se manifiestan cuando existe lesión de la estructura de la membrana glomerular, ya que en condiciones normales son sellados por un aparato reparador. En el estadio final de la enfermedad, como los glomérulos son destruidos y no son funcionantes, la proteinuria disminuye y el fallo renal está establecido<sup>52, 66</sup>.

Existen **formas benignas de proteinuria glomerular**, entre las que destacan<sup>15, 49, 67</sup>.

- La ***proteinuria funcional o benigna***, probablemente debida a cambios de flujo sanguíneo por el glomérulo; está asociada con determinadas condiciones como ejercicio, fiebre, exposición al frío, fallo cardíaco congestivo, hipertensión o arteriosclerosis; la excreción de proteínas suele ser menor de 0.5 g/día.
- La ***proteinuria transitoria intermitente***, que se puede observar ocasionalmente en pacientes con historial y examen físico normales y función renal por lo demás normal. Excepto por la proteinuria ocasional, los análisis de orina son también normales. Generalmente se debe hacer un seguimiento de estos pacientes controlando cada seis meses la tensión arterial u otras anormalidades, y el pronóstico en general es bueno.

- La **proteinuria ortostática o postural**, asociada con la posición erecta; ocurre aproximadamente en el 5% de los adultos jóvenes, disminuyendo la prevalencia al aumentar la edad; es también una proteinuria funcional, aparentemente relacionada con una posición lordótica exagerada, y puede ser el resultado de una congestión renal o de isquemia: la excreción raramente excede 1 g/día; este tipo de proteinuria complica la valoración de otras proteinurias en pacientes con síntomas leves; si es pasajera, probablemente es benigna, pero si es crónica o no se relaciona totalmente con la postura, la excreción de proteínas debe ser analizada cada 6 meses, preferiblemente con un test cuantitativo; la persistencia de la proteinuria sugeriría una enfermedad renal subyacente.
- En el **embarazo normal**, la excreción de proteínas puede aumentar de 200 a 300 mg/día sin ser patológica; este ligero aumento está en contraste con la proteinuria de la toxemia preeclámpsica, una proteinuria glomerular de más de 3 g/día, y con las proteinurias de enfermedad renal latente o infecciones del tracto urinario.

### 2.5.2. PROTEINURIA TUBULAR:

Esta proteinuria está caracterizada por la aparición de proteínas de bajo peso molecular en la orina debido a daño en la función de reabsorción del túbulo renal proximal. Puede ocurrir sola, con una permeabilidad glomerular normal, aunque es más común que aparezca asociada a proteinuria glomerular. Según aparezca sola o asociada a patología glomerular se producen distintos **patrones de excreción de proteínas**:

- Cuando la proteinuria tubular ocurre sola, la excreción de albúmina está aumentada sólo ligeramente, siendo excretadas principalmente proteínas de bajo peso molecular, tales como  $\beta$ 2-microglobulina (11800 daltons), lisozima (14500 daltons), proteína ligada a retinol (21000 daltons),  $\alpha$ 1-microglobulina (27000 daltons), cadenas ligeras libres policlonales (22000 daltons), así como varias hormonas polipeptídicas y enzimas<sup>15, 46, 68</sup>.

- Cuando la proteinuria tubular aparece asociada a proteinuria glomerular puede ser de dos tipos:
  - *Proteinuria mixta* (tubular y glomerular), en la que la causa de enfermedad renal provoca al mismo tiempo daño tubulointersticial y glomerular. Esto ocurre, por ejemplo, en la Diabetes Mellitus y en la Hipertensión Arterial. La excreción urinaria de albúmina y de proteínas de bajo peso molecular aumenta de forma paralela, y se correlaciona con la progresión del daño renal <sup>46</sup>.
  - *Proteinuria tubular secundaria a lesión glomerular*. Ocurre cuando existe un deterioro del filtro glomerular, apareciendo en la luz tubular proteínas de peso molecular intermedio y alto, las cuales compiten entre sí, y con las proteínas de bajo peso molecular, en el proceso de reabsorción por las células del túbulo proximal. Si este mecanismo es saturado (cuando la albuminuria excede 3g/g creatinina) aparecen en orina proteínas de todos los tamaños, incluso las de bajo peso molecular. A medida que el deterioro glomerular aumenta, la sobrecarga de proteínas a nivel tubular no sólo satura su capacidad de reabsorción, sino que daña su integridad con alteración de su función y morfología, lo que resulta en una fracción de proteínas de bajo peso molecular en orina cada vez mayor <sup>46, 69</sup>.

Según la **forma de presentación** podemos distinguir tres tipos:

- ***Proteinuria tubular aguda***: Puede ocurrir en alteraciones graves del metabolismo asociadas con quemaduras, pancreatitis aguda, intoxicación por metales pesados, o administración de drogas nefrotóxicas, principalmente. Puede resolverse completamente <sup>15</sup>.
- ***Proteinuria tubular crónica***: Su etiología puede ser hereditaria, como el Síndrome de Fanconi, o bien adquirida, como resultado de una enfermedad renal tal como la pielonefritis crónica, o por una enfermedad sistémica tal como cirrosis o sarcoidosis; también puede ser adquirida como resultado del tratamiento con drogas tal como la fenacetina, o por intoxicaciones por metales pesados, como el cadmio. Normalmente es irreversible <sup>15</sup>.

- ***Proteinuria tubular transitoria:*** La insuficiencia tubular y la consiguiente presencia de cadenas ligeras libres policlonales y otras proteínas de bajo peso molecular en la orina puede ser transitoria, ligada, por ejemplo, a carga en aminoácidos tipo lisina o arginina, o a la toma de algunos fármacos <sup>68</sup>.

### 2.5.3. PROTEINURIA POR SOBRECARGA:

Puede ocurrir un aumento de proteínas en orina sin existir daño glomerular o tubular, debido a un aumento de su concentración en plasma, que aumenta la carga de proteínas en el filtrado glomerular saturando la capacidad de reabsorción del túbulo proximal. En principio estas proteínas no están asociadas a enfermedades glomerulares o tubulares, pero ellas mismas pueden causar daño renal <sup>15, 49, 50</sup>. Ejemplos de esta forma de proteinuria son:

- ***Cadenas ligeras libres:*** el aumento de su concentración normal en orina puede tener un carácter policlonal, frecuente en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas como la sarcoidosis, la tuberculosis pulmonar, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, etc.; o, como es más frecuente, un carácter monoclonal por un exceso de producción por un clon de células plasmáticas <sup>5, 68, 70</sup>. Al exceso de excreción de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas de carácter monoclonal es lo que se denomina **Proteinuria de Bence Jones**, asociado la mayoría de las veces con enfermedades inmunoproliferativas <sup>71</sup>.
- ***Hemoglobinuria:*** indica con frecuencia una hemólisis intravascular significativa. Puede seguir a un esfuerzo severo en el que se produce un traumatismo directo de pequeños vasos sanguíneos y a otras muchas causas de lisis aguda de eritrocitos <sup>49</sup>.
- ***Mioglobinuria:*** aparece cuando existe destrucción aguda de fibras musculares por causas mecánicas (rabdomiólisis), químicas o térmicas. Cuando es muy abundante puede causar necrosis tubular aguda <sup>49, 51</sup>.



- *La lisozima*: puede aumentar su concentración urinaria en leucemias agudas <sup>51</sup>.
- *La  $\beta$ 2-microglobulina*: aumenta su concentración urinaria cuando hay una sobreproducción por los linfocitos (síndromes linfoproliferativos, enfermedades infecciosas o inflamatorias crónicas) <sup>51</sup>.

#### **2.5.4. PROTEINURIA POSTRENAL:**

Se produce por proteínas que surgen en el tracto urinario por debajo de los riñones, y normalmente es debido a inflamación o a procesos malignos. Para su diagnóstico es importante el examen microscópico del sedimento urinario, en el que se pueden ver células inflamatorias y/o células malignas; si en este examen vemos la presencia de cilindros eritrocitarios o leucocitarios en el sedimento prueba que su origen es renal y no extrarrenal <sup>15</sup>. El principal marcador es la  $\alpha$ 2-macroglobulina, proteína, que por su elevado peso molecular (aproximadamente 700 kDa), es difícilmente filtrada por el glomérulo (coeficiente de filtración cero); también es útil esta proteína para ayudar a localizar el origen de la hematuria (una ratio  $> 0,02$  entre  $\alpha$ 2-macroglobulina y albúmina sería indicativa de hematuria postrenal) <sup>42, 51</sup>.

## **2.6. GRADOS DE PROTEINURIA:**

Podemos clasificar la proteinuria atendiendo a la cantidad de proteína excretada por la orina <sup>12, 49</sup>:

**Proteinuria severa (> 4 g/día):** Se observa típicamente en el síndrome nefrótico. Habitualmente acompañan a este trastorno un nivel bajo de albúmina en suero, un edema generalizado y un aumento de los lípidos en suero. Entre las proteínas que se pierden por orina también se encuentran las gammaglobulinas, lo que puede contribuir a la susceptibilidad a infecciones bacterianas de estos pacientes. La presencia de lípidos en orina hace que se encuentren en los sedimentos muchos cilindros granulosos, cilindros grasos y células del epitelio tubular renal llenas de lípidos (cuerpos grasos ovals). El síndrome nefrótico está asociado principalmente al daño/disfunción glomerular debido a: 1) enfermedades renales primarias, incluyendo la enfermedad idiopática y 2) enfermedades sistémicas con implicación renal; las más frecuentes son casos severos de glomerulonefritis, nefrosclerosis, enfermedad amiloide, lupus eritematoso diseminado y congestión venosa grave producida por una trombosis de la vena renal, fallo cardíaco congestivo o pericarditis constrictiva.

**Proteinuria moderada (1 g/día a 4 g/día):** Este tipo de proteinuria se presenta en la mayoría de las enfermedades renales, incluyendo las mencionadas anteriormente, el mieloma múltiple y las nefropatías tóxicas, además de las alteraciones degenerativas, malignas e inflamatorias del tracto urinario inferior, incluyendo las alteraciones irritativas como la presencia de cálculos.

**Proteinuria mínima (< 1 g/día):** Se puede observar en pielonefritis crónica, fases relativamente inactivas de las enfermedades glomerulares, nefrosclerosis, nefritis intersticial crónica, enfermedad poliquística de los riñones y enfermedades tubulares renales. También está presente en proteinurias posturales y transitorias.

## **2.7. REPERCUSIONES DE LA PROTEINURIA:**

La excreción de un exceso de proteínas por el riñón tiene consecuencias tanto locales (a nivel renal) como generales.

### **2.7.1. REPERCUSIONES RENALES:**

Existen evidencias de la fuerte correlación entre el grado de proteinuria y el ritmo de progresión del fallo renal en numerosas enfermedades renales. Esto ha llevado a la hipótesis de que la proteinuria por sí misma puede contribuir a la progresión del fallo renal, y no ser simplemente una consecuencia del mismo <sup>15</sup>.

Cuando el deterioro de la pared del capilar glomerular aumenta la filtración de proteínas de peso molecular intermedio y alto, estas proteínas compiten entre sí, y con las de bajo peso molecular, en el proceso de reabsorción por las células epiteliales del túbulo proximal. Si estos mecanismos se saturan, lo que ocurre cuando la excreción de albúmina excede 3 g/g creatinina, aparecen en orina proteínas de todos los tamaños, incluidas las de bajo peso molecular <sup>40</sup>. Otros autores consideran que empiezan a aparecer proteínas de bajo peso molecular en orina, sin patología tubular, cuando la excreción de albúmina e IgG es superior 2 g/24 horas (2 g/g creatinina) <sup>56</sup>. Cuando la carga de proteínas filtradas es masiva y/o prolongada, debido a enfermedad glomerular crónica, las células epiteliales del túbulo proximal, sujetas a continua sobrecarga, pueden sufrir daño en su integridad, con deterioro de la función lisosomal y cambios morfológicos. Como resultado, la reabsorción de todas las proteínas, incluyendo la reabsorción fisiológica de proteínas de bajo peso molecular, está cada vez más deteriorada, llevando progresivamente a una mayor excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular <sup>40, 46</sup>.

Los **mecanismos subyacentes** en el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial y la progresión del fallo renal probablemente son multifactoriales:

- La reducción en el número de nefronas funcionantes resulta en una hiperfiltración perjudicial para las nefronas restantes, que acaban perdiendo su funcionalidad <sup>66</sup>.

- En la diabetes, las propiedades aniónicas de la membrana basal glomerular son neutralizadas por el exceso de glucosa o incluso por otras proteínas como el complemento, disminuyendo su selectividad para proteínas de carga variada, pero no por el tamaño molecular. En esta situación, la albúmina cargada negativamente es excretada en grandes cantidades, dependiendo de la selectividad de la membrana basal glomerular que quede <sup>58</sup>.
- Las muestras de tejido de riñones de enfermos con abundante proteinuria, a menudo presentan túbulos dilatados debido a obstrucción de la luz tubular por cilindros proteicos. En estudios en ratas se ha visto que la formación de cilindros fue seguida por obstrucción tubular, rotura de la membrana basal del túbulo, extravasación del contenido tubular, y finalmente inflamación intersticial y fibrosis. Sin embargo, el alcance con que los cilindros intraluminales contribuyen al daño tubular en las nefropatías proteinúricas es desconocido, mayormente debido a la falta de capacidad para prevenir la formación de los cilindros <sup>44</sup>.
- La absorción tubular excesiva de proteínas lleva a una acumulación excesiva de las mismas en el citoplasma de las células del túbulo proximal, con eventual extravasación focal del contenido celular en el intersticio vecino, lo que genera la producción de sustancias proinflamatorias y factores vasoactivos; esto puede dar como resultado inflamación intersticial, isquemia regional, proliferación fibroblástica, y, en última instancia, aumento de síntesis de la matriz extracelular y cicatrización renal <sup>44, 46, 69, 72</sup>.
- Varios componentes en la orina proteinúrica pueden dañar directamente las células tubulares. Estos incluyen factores de crecimiento, transferrina, albúmina, albúmina unida a ácidos grasos, y componentes del complemento. La activación intraluminal de la cascada del complemento lleva a la formación del componente C5b-9, complejo que ataca la membrana apical del túbulo proximal, siendo crucial mediador en el daño tubulointersticial y progresivo fallo renal <sup>72</sup>.
- Las alteraciones estructurales del glomérulo hacen que, además de la albúmina, se filtren otras proteínas de bajo peso molecular que no lo harían por un glomérulo intacto, y esto resulta en un aumento de la exposición del túbulo proximal tanto a la albúmina como a estas proteínas. Aunque no está claro si estos efectos están mediados por uno o

más receptores en la superficie celular, se observa que probablemente la calidad de la proteinuria puede jugar un papel en la progresión de enfermedad renal crónica<sup>73</sup>. Se han realizado numerosos trabajos intentando averiguar el papel de cada proteína específica en el desarrollo de la toxicidad tubular, entre los que destacan los siguientes:

\* Newman et al. han demostrado que las proteínas de bajo peso molecular, tal como la proteína ligada a retinol, puede inducir potencialmente respuestas pro-fibrogénicas en las células epiteliales del túbulo que son diferentes de las inducidas por la albúmina<sup>73</sup>.

\* En un trabajo de Tencer et al. concluyen que no es la proteinuria “per se” la que determina la progresión de la enfermedad renal, sino el tipo de proteinuria. El transporte incrementado de proteínas de elevado peso molecular, y no la albúmina, contribuyen al desarrollo de esclerosis tubulointersticial, y en consecuencia, a disminución de la función renal<sup>46, 52</sup>.

\* Se ha observado en pacientes afectados de nefropatías que producen proteinuria no selectiva, que la escasa selectividad de la proteinuria está significativamente correlacionada con la severidad del daño tubulointersticial<sup>72</sup>.

\* En varios estudios en cultivos de células de túbulo proximal se ha visto que altas concentraciones de albúmina inducen apoptosis celular (mientras que similares concentraciones de transferrina e IgG no lo produjeron) y producción de citoquinas por las células tubulares<sup>44</sup>. El efecto en el tejido intersticial de las citoquinas es la atracción de células inflamatorias, estimulación de fibroblastos y vasoconstricción; como consecuencia, se desarrolla fibrosis túbulo-intersticial<sup>47, 74</sup>.

\* Estudios, también en cultivos celulares, que han investigado los efectos de la transferrina han visto que en altas concentraciones inducen la producción de citoquinas y del factor C3 del complemento. Los efectos principales de las inmunoglobulinas G también han sido la producción de citoquinas<sup>44</sup>.

Como se puede ver, se han realizado numerosos intentos para identificar el efecto tubulotóxico de las diferentes proteínas, pero aún persiste una gran

incertidumbre. Una de las razones para esto es que los estudios se basan en exposiciones proteicas no fisiológicas de los cultivos celulares, así como la existencia de falta de uniformidad de los puntos medidos. Además, hay a menudo falta de correlación entre resultados “in vivo” e “in vitro”, y falta de uniformidad de resultados, incluso para experimentos “in vitro” aparentemente similares <sup>44</sup>.

### 2.7.2. REPERCUSIONES GENERALES:

- El incremento de albúmina en orina es actualmente considerado como factor predictor de mortalidad y morbilidad en la diabetes mellitus, tanto insulín-dependiente como no insulín-dependiente. También es considerado un factor de riesgo en hipertensión arterial, enfermedad vascular, y un predictor de fallo cardíaco <sup>44, 66, 75, 76</sup>. En una revisión hecha por Hayley Y. Park et al. de la *Relación entre Microalbuminuria y Eventos Cardiovasculares en Pacientes con Diabetes Mellitus e Hipertensión*, ven que la presencia de microalbuminuria estaba asociada con un riesgo relativo de cualquier causa de mortalidad 2-8 veces mayor que en individuos de características similares sin microalbuminuria, y la morbilidad y mortalidad cardiovascular fue 2-4 veces mayor que en personas sin microalbuminuria <sup>77</sup>. A las mismas conclusiones llegan en el estudio de Hillege et al. <sup>76</sup>. Johannes F.E. Mann et al. concluyen que la albuminuria refleja enfermedad vascular subyacente; también sugieren que la medida de la albúmina urinaria (antes de establecer tratamiento y durante el mismo) puede ser usada como herramienta para identificar pacientes, tanto diabéticos como no diabéticos, en alto riesgo de padecer enfermedad renal y cardiovascular. Estos pacientes pueden ser blanco de intervenciones preventivas más enérgicas <sup>78</sup>.
- La albuminuria también predice un aumento de la mortalidad a mayor edad, en general, independientemente de que se padezca alguna enfermedad <sup>75</sup>.
- Cuando el daño glomerular está muy avanzado o grave lleva a mayor pérdida de proteínas, incluso que supere una excreción de 3 ó 4 g de proteínas al día, lo cual sobrepasa la capacidad sintética del hígado, y lleva al desarrollo de un síndrome nefrótico, caracterizado principalmente por hipoproteinemia y edemas <sup>49, 67</sup>.

### **3. GAMMAPATÍA MONOCLONAL Y PROTEINURIA:**

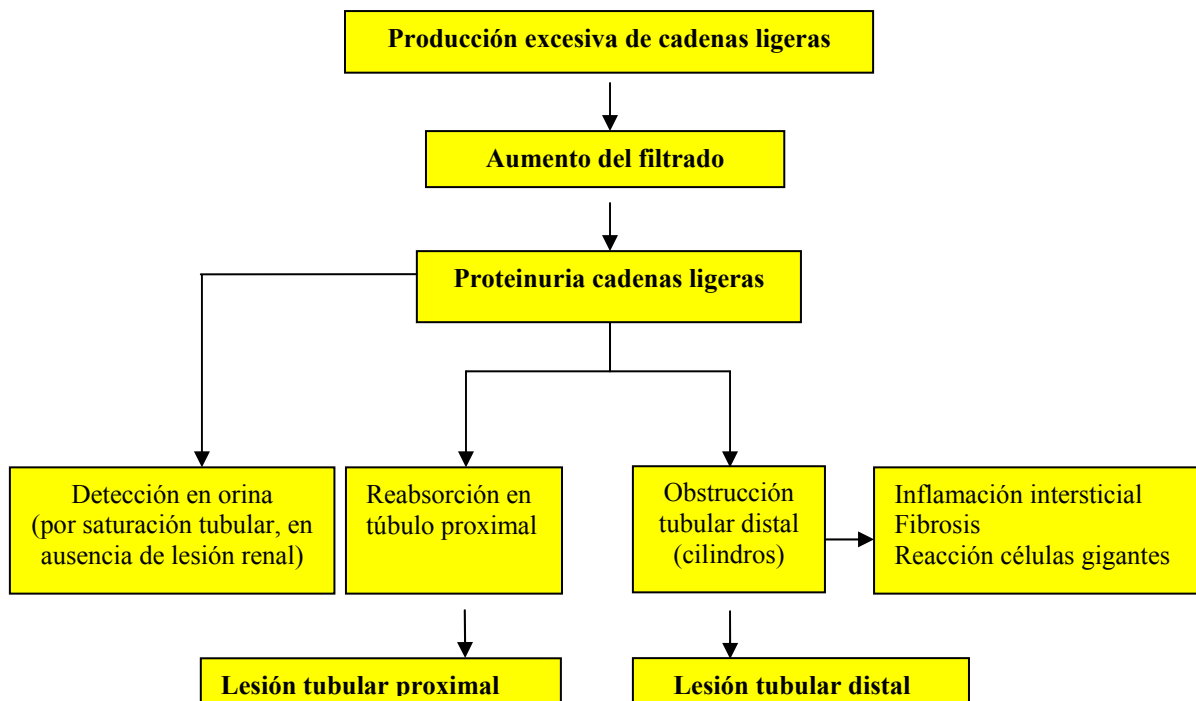
Una característica frecuente de las gammapatías monoclonales es la excreción urinaria de cadenas ligeras libres monoclonales (Proteinuria de Bence Jones). La excreción de concentraciones superiores a 0.2 g/L indica habitualmente una proliferación maligna de células B. En pacientes con MM asintomático, concentraciones en orina superiores a 0.05-1 g/L se relacionan significativamente con el riesgo de progresión de la enfermedad. En la MGUS, la presencia de concentración urinaria superior a 0.1 g/L constituye un factor pronóstico de evolución maligna<sup>9</sup>. Todo esto indica la importancia de la Proteinuria de Bence Jones como marcador de malignidad.

Sin embargo, la Proteinuria de Bence Jones además es capaz de producir patología renal por sí misma, lo que no siempre está relacionado con la cantidad excretada, sino también con las características específicas de la proteína<sup>70</sup>.

La insuficiencia renal se presenta en alrededor del 50 % de los enfermos afectados de mieloma, ya sea en el momento del diagnóstico, o durante el curso evolutivo de la enfermedad. Es la segunda causa de muerte después de las infecciones. Esta complicación es el parámetro que condiciona el peor pronóstico, si se comprueba su presencia en el momento del diagnóstico, circunstancia que se da en una cuarta parte de los enfermos. La causa más importante de disfunción renal es la eliminación por el riñón de cadenas ligeras libres<sup>5, 70, 79</sup>.

### **3.1. NEFROTOXICIDAD DE LA PROTEINURIA DE CADENAS LIGERAS LIBRES:**

Las cadenas ligeras normalmente son producidas en exceso por las células plasmáticas para asegurar una eficiente síntesis de inmunoglobulinas. Esto hace que los individuos sanos excreten pequeñas cantidades (aproximadamente 3 mg/24 h) de cadenas ligeras libres en la orina, siendo la ratio normal entre kappa y lambda de 2.9<sup>57</sup>,<sup>70</sup>. El exceso de cadenas ligeras monoclonales provoca una saturación del sistema de endocitosis del túbulo proximal; esta sobrecarga lleva al daño de las células tubulares. La carga aumentada de cadenas ligeras y la disminución de su reabsorción causan su aparición en el túbulo distal y en definitiva, en la orina. En el túbulo distal las cadenas ligeras se unen a la proteína de Tamm Horsfall, complejos que al precipitar forman cilindros intratubulares. La obstrucción intratubular destruye la población de nefronas, llevando a una enfermedad renal manifiesta (fig. I 2)<sup>5, 70</sup>. Por tanto, la excreción de cadenas ligeras libres monoclonales no es simplemente un marcador proteico de gammapatía monoclonal, sino que también es un agente causante en la progresión de fallo renal y en el desarrollo de enfermedad sistémica<sup>71</sup>.



**Figura I 2: Patogenia de la nefrotoxicidad de las cadenas ligeras.**



El proceso de daño renal, al parecer, sería un mecanismo dosis- y tiempo-dependiente; sin embargo, a veces se comprueba que, pese a la existencia de una proteinuria importante, la función renal se conserva bien. Estudios de Solomon et al.<sup>80</sup> apoyan la importancia de las diferentes propiedades fisicoquímicas de las cadenas ligeras. Algunas cadenas ligeras, por ejemplo, son resistentes a la proteólisis por tripsina y pepsina; otras muestran capacidad de autoagregarse en grandes multímeros bajo condiciones fisiológicas. Un bajo punto isoeléctrico, un pH urinario ácido y un alto grado de glicosilación de las proteínas de Tamm Horsfall parecen aumentar la formación de cilindros. El daño tubular, de hecho, inducido por cilindros/cadenas ligeras nefrotóxicas, causa una descamación epitelial tubular y una ruptura de la membrana basal, que lleva a un infiltrado intersticial de macrófagos y linfocitos T. Estas células activan los fibroblastos por la liberación de varias sustancias (citoquinas, factores de crecimiento, etc), provocando una fibrosis intersticial progresiva. Esto provoca un fallo renal crónico por dos posibles mecanismos: una obliteración capilar peritubular, o una reabsorción reducida de cloruro sódico, que resulta en una reducción del filtrado glomerular<sup>70, 81</sup>.

Además de la formación de cilindros y la fibrosis, existen otros factores que pueden contribuir al desarrollo de la insuficiencia renal, siendo los más importantes la hipercalcemia (facilita la formación de agregados con la proteína de Tamm Horsfall, y por tanto, la formación de cilindros, y también reduce la filtración glomerular por vasoconstricción), la deshidratación (acelera la obstrucción tubular, disminuyendo el flujo tubular y alargando el tiempo de interacción de las proteínas), la hiperuricemia, la amiloidosis, así como algunas drogas, como los diuréticos, que pueden causar un descenso de la filtración glomerular, y los antiinflamatorios no esteroideos, que pueden provocar una disminución del flujo renal<sup>5, 70, 81</sup>.

### **3.2. PATRONES DE DAÑO RENAL EN LA GAMMAPATÍA MONOCLONAL:**

La proteinuria de Bence Jones puede causar los siguientes **patrones de daño renal (tabla I 7):**

- ***Riñón del mieloma:*** El fallo renal afecta aproximadamente a un tercio de pacientes con mieloma en el momento del diagnóstico, y la disminución del aclaramiento de creatinina está presente en la mitad. La lesión se caracteriza por la presencia de gran cantidad de cilindros intratubulares constituidos por material proteináceo intensamente eosinofílico y PAS positivo, con epitelio tubular aplanado y distorsionado, y células gigantes rodeando este material, que suele mostrar fluorescencia positiva para el tipo de inmunoglobulina implicada. Hay estudios que achacan esta tendencia de las proteínas de Bence Jones a formar cilindros a ciertas características fisico-químicas particulares, como puede ser el punto isoeléctrico de las mismas, aunque al intentar corroborar estos hallazgos con otros estudios clínicos y experimentales se encuentra que no hay correlación entre esas características fisico-químicas y la presencia de fallo renal. Todo ello indica que existen además otros factores responsables de la insuficiencia renal, como son la deshidratación, la hipercalcemia, la hiperuricemia, las infecciones del tracto urinario y las drogas nefrotóxicas, entre otras <sup>5, 82, 83</sup>.
- ***Enfermedad por depósito de cadenas ligeras:*** Se caracteriza por la deposición, fundamentalmente renal, de cadenas ligeras monoclonales o ligeras y pesadas (combinación excepcional), que no muestran estructura fibrilar, a diferencia de la amiloidosis AL. El depósito es puntiforme, Rojo Congo negativo y su diagnóstico se establece por tinciones inmunohistoquímicas del tejido afecto. Se encuentra a nivel de las células de la membrana basal (tanto en los glomérulos como en los túbulos) y en la pared de los vasos; también han sido documentados en otros órganos (hígado, piel, pulmón, y otros), y a veces producen manifestaciones clínicas. A nivel renal, la presentación clínica incluye proteinuria, normalmente moderada aunque a veces en rango nefrótico, sin hematuria o hipertensión, asociada con fallo renal rápidamente progresivo. Respecto a los mecanismos fisiopatológicos subyacentes para la formación de estos depósitos, varios estudios han encontrado cadenas ligeras con estructura anormal, tal como el tamaño (mayores o menores que

las cadenas ligeras normales), tendencia a la agregación polimérica, y anomalías en glicosilación. Otros estudios han identificado algunas sustituciones en la cadena de aminoácidos que incrementan las características hidrofóbicas de la molécula y posible desestabilización de la misma <sup>5, 82</sup>.

- ***Amiloidosis AL***: Está presente en el 6 – 15% de pacientes con mieloma. Se caracteriza por la formación en tejidos de depósitos extracelulares de proteínas con estructura fibrilar, formados principalmente de fragmentos de cadenas ligeras monoclonales, y a veces, asociados con cadenas ligeras completas. El tipo de cadena ligera más frecuente es lambda. Los depósitos son Rojo Congo positivos, localizados principalmente en glomérulo, mesangio, túbulos y endotelio vascular. El fallo renal que ocasiona suele ser crónico <sup>5, 82</sup>.
- ***Disfunciones tubulares***: Las proteínas de Bence Jones son capaces de causar daño funcional y estructural de las células tubulares en pacientes sin fallo renal y con biopsia renal negativa. Cuando la localización es en el túbulo proximal se produce el síndrome de Fanconi adquirido, caracterizado por aminoaciduria, glucosuria, fosfaturia, proteinuria de cadenas ligeras y acidosis tubular proximal. También se puede afectar el túbulo distal, aunque es menos frecuente. Las proteínas tienen tendencia a cristalizar en las células del túbulo proximal, sin formación de cálculos en el túbulo distal. Este síndrome está asociado más frecuentemente con la proteína de Bence Jones tipo kappa, y puede preceder al MM en varios años. Las alteraciones funcionales pueden ser reversibles si se elimina con terapia específica la producción de proteinuria de Bence Jones <sup>5, 8, 82</sup>.

**Tabla I 7: Principales formas de asociación entre Proteinuria de Bence Jones y enfermedades renales.**

Entidad	Características	Proteinuria		Tipo CL	Disfunción renal		Fallo renal	
		CL	Albúmina		Glomerular	Tubular	Agudo	Crónico
<b>Riñón del mieloma</b>	Cilindros tubulares, reacción inflamatoria	++++	++	$\kappa \approx \lambda$	0	++++	+++	++
<b>EDCL</b>	Depósitos nodulares mesangiales y en MB glomerular y tubular	+	+ / ++	$\kappa > \lambda$	++++	++	++++	+++
<b>AL</b>	Rojo Congo (+), depósitos fibrilares en glomérulo, mesangio, túbulos y endotelio vascular	++	+++	$\lambda > \kappa$	++++	+	0	++
<b>Patología tubular</b>	Proximal (S. de Fanconi adquirido) o menos frecuente Distal	++	0/+	$\kappa > \lambda$	0	++++	+	++

Abreviaturas = CL: Cadenas Ligeras; EDCL: Enfermedad por depósito de cadenas ligeras; AL: Amiloidosis primaria; MB: Membrana basal.

#### **4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN ORINA:**

Como sabemos, la detección de una cantidad anormal de proteínas en la orina es un importante indicador de la enfermedad renal. Los métodos de análisis se utilizan habitualmente para diferenciar la excreción normal de la anormal y, por tanto, no deberían detectar menos de entre 80 mg/L y 100 mg/L, aproximadamente, en adultos normales con una tasa normal de flujo de orina <sup>49</sup>.

Además, son comunes las grandes variaciones de la cantidad y composición de la orina en los estados normales y patológicos de la enfermedad renal; a su vez, la concentración de sustancias interferentes no proteicas es alta y muy variable en relación con la concentración proteica. Todos estos factores afectan la precisión y exactitud de los diversos métodos de medida <sup>84</sup>.

Por tanto, un sistema eficaz de diagnóstico de la proteinuria debe cumplir los siguientes criterios <sup>84</sup>:

- Indicar el posible mecanismo patogénico.
- Diferenciar entre las formas patológicas y normales de proteinuria.
- Cubrir tanto el intervalo normal como el patológico, reaccionando de igual forma con todas y cada una de las diferentes proteínas.

Para la determinación de proteínas en orina existen métodos de detección (cualitativos y semicuantitativos) y métodos cuantitativos, que se presentan de forma esquemática en la tabla I 8 <sup>84</sup>.

**Tabla I 8: Métodos de determinación de proteínas en orina.**

<b>Métodos cualitativos o semicuantitativos:</b>	
-	tira reactiva
-	precipitación: ácido tricloroacético, ácido sulfosalicílico, calor y ácido, ácido tánico/CL <sub>3</sub> Fe
-	electroforéticos
-	cromatográficos: FPLC <sup>TM</sup> , HPLC
<b>Métodos cuantitativos:</b>	
-	turbidimétricos: ácido tricloroacético (TCA) ácido sulfosalicílico (SSA) cloruro de bencetonio cloruro de benzalconio
-	unión a colorantes: azul brillante de Coomassie Ponceau-S Rojo de pirogalol
-	químicos: Biuret Folin-Lowry Kjeldahl Ácido bicincónico (BCA)
<b>Métodos inmunológicos:</b> Inmunolectroforesis: inmunofijación, inmunosustracción Inmunoprecipitación: RID, Laurell, nefelometría, turbidimetría Inmunoensayos: RIA, FIA, ELISA	

A continuación se hace una breve descripción de los sistemas de análisis de proteínas en orina más utilizados.

#### **4.1. MÉTODOS CUALITATIVOS Y SEMICUANTITATIVOS:**

Estos métodos se utilizan para el despistaje de la proteinuria.

##### **4.1.1. TIRAS REACTIVAS:**

Este método aprovecha el error proteico de los indicadores de pH. Puesto que las proteínas están cargadas a pH fisiológico, su presencia se hará evidente en los cambios de pH (la presencia de la proteína en la tira cambia el pH del medio de contraste impregnado en la zona reactiva, produciendo el cambio de color). La tira reactiva está impregnada con azul de tetrabromofenol tamponado a un pH 3 o con tetraclorofenol-tetrabromosulfoftaleína. En ausencia de proteínas la tira es amarilla; entre 30 y 60 segundos después de la aplicación de la orina aparecen sombras variables de verde dependiendo del tipo y concentración de proteínas presentes. La mayoría de los métodos pueden detectar entre 150 y 300 mg/L, por lo que pueden ser insensibles para detectar microalbuminuria. Existen en el mercado unas tiras reactivas albúmina-específicas que pueden detectar concentraciones de albúmina de por encima de 20 a 40 mg/L, siendo usadas para la detección de microalbuminuria. El límite de decisión para considerar microalbuminuria es de 20 mg/L <sup>15, 49, 60, 64, 85, 86</sup>.

Los falsos positivos no son infrecuentes en este método. Pueden ocurrir en muestras de orina muy concentrada, en orina muy alcalina (p. ej., en pacientes con medicación alcalina o con contaminación bacteriana), en presencia de hematuria macroscópica, por contaminación de la orina por antisépticos (p. ej., benzalconio, clorhexidina). La especificidad para la detección de proteinuria es aproximadamente del 67 %. Por lo tanto, una prueba positiva con tira reactiva siempre debe ser confirmada por otra técnica. La turbidez de la orina, el medio radiográfico y la mayoría de las drogas y sus metabolitos no afectan a este método <sup>49, 85, 87, 88</sup>.

Este método es más sensible para la albúmina que para las globulinas, la proteína de Bence Jones o las mucoproteínas. Por lo tanto, es un test de screening excelente para proteinuria glomerular establecida, pero insatisfactorio para la detección de proteinuria glomerular incipiente, de proteinuria tubular o por sobrecarga del tipo Bence Jones <sup>15, 49, 58, 75, 89</sup>.

#### **4.1.2. PRECIPITACIÓN PROTEICA:**

Este método depende de la formación de un precipitado para la determinación de la presencia de proteínas en orina, utilizando, por ejemplo, calor y ácido acético, ácido sulfosalicílico, ácido tricloroacético, entre otros. Las proteínas desnaturalizadas por el ácido se precipitan produciendo una turbidez que es progresivamente mayor de acuerdo al incremento en la concentración de proteínas. Por este método se pueden detectar albúmina, globulinas, glucoproteínas y proteínas de Bence Jones. La sensibilidad puede ser alta, pues dependiendo de la técnica empleada, puede llegar a ser de 2.5 mg/L<sup>12, 49, 85</sup>. Sin embargo, estas técnicas prácticamente no se usan, al menos como procedimientos de rutina<sup>84</sup>.

#### **4.1.3. ELECTROFORESIS:**

Los métodos electroforéticos permiten la obtención de una serie de bandas repartidas entre la zona de la albúmina y de las gammaglobulinas; esto permite diferenciar las proteinurias glomerulares, las proteinurias tubulares y, sobre todo, permite identificar la presencia de cadenas ligeras libres monoclonales (proteína de Bence Jones) con una gran sensibilidad; las bandas sospechosas puestas en evidencia deben ser confirmadas por una técnica de inmunoelectroforesis si el paciente no es conocido<sup>51</sup>.

La migración de proteínas en el campo electroforético depende de varios factores, incluyendo el punto isoelectrico de la molécula, la concentración de electrolitos y pH del buffer, la temperatura del gel durante la electroforesis, las características del gel y la cantidad de corriente aplicada<sup>90</sup>. Para la revelación de las proteínas se utiliza un colorante de proteínas, desde el Rojo Ponceau al oro coloidal<sup>68</sup>. Las fracciones de proteínas separadas por este método pueden cuantificarse por densitometría, aunque son resultados semicuantitativos, pues las diferentes fracciones de proteínas son expresadas en porcentaje de la proteinuria total<sup>51, 90</sup>.

Los métodos clásicos de electroforesis utilizan como soporte de migración el acetato de celulosa o el gel de agarosa (más sensible y resolutivo), pero tienen el inconveniente de precisar una concentración de la orina previa, hasta llegar a valores de



20 a 30 g/L de proteínas totales, lo que a veces, es un proceso largo (hasta varias horas). Además, el tipaje de la proteinuria, en ocasiones es difícil por la comigración de varias proteínas en la zona  $\beta$ : las cadenas ligeras libres, las inmunoglobulinas enteras, la hemoglobina y la transferrina. Las cadenas ligeras libres monoclonales, cuya migración va de la zona  $\gamma$  hasta la zona  $\alpha_2$ , no pueden distinguirse de las inmunoglobulinas enteras ante una carga eléctrica parecida<sup>15, 51</sup>.

Existen otros métodos electroforéticos más sensibles, que permiten evitar la etapa de concentración, y un límite de detección que puede llegar a 15 mg/L, como son el SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis), la electroforesis bidimensional y el isoelectroenfoque. Sin embargo, tienen un proceso largo y laborioso, y siguen sin diferenciar el carácter policlonal o monoclonal de las cadenas ligeras libres, o de las inmunoglobulinas enteras (necesitarían la realización de inmunolectroforesis)<sup>51, 71</sup>.

### **Electroforesis capilar:**

La electroforesis capilar representa un nuevo avance en las técnicas de separación. La separación de las proteínas se efectúa en un capilar de sílice fundido. La muestra se introduce en una entrada capilar; cuando se aplica un voltaje alto en los extremos del capilar las moléculas de la muestra se separan mediante flujo electro-osmótico, un flujo resultante de un exceso de iones positivos en la superficie interna del capilar, que se mueven hacia el cátodo. Los iones positivos de la muestra emergen rápidamente de la salida del capilar porque el flujo electro-osmótico y el movimiento iónico tienen la misma dirección. Los iones negativos de la muestra también se mueven hacia la salida del capilar, pero a menor velocidad. La migración se produce hacia el cátodo donde un detector monitoriza el paso de las proteínas midiendo la absorbancia en la región ultravioleta (214 nm). Las proteínas individuales pueden ser identificadas mediante inmunosustracción<sup>91</sup>.

El principal inconveniente para la aplicación de la electroforesis capilar en el estudio de las proteínas urinarias lo constituye la presencia habitual en la orina de numerosas sustancias de peso molecular bajo (por ejemplo, fármacos) que se absorben a 214 nm y que generan unos picos de interferencia que pueden comigrar con las

proteínas de interés. Además, también con este método las muestras de orina muchas veces deben ser concentradas<sup>91, 92</sup>.

## **4.2. MÉTODOS CUANTITATIVOS:**

Las medidas cuantitativas de proteínas en orina son normalmente adaptaciones de uno de los métodos de precipitación o son de naturaleza colorimétrica <sup>49</sup>.

### **4.2.1. MÉTODOS TURBIDIMÉTRICOS:**

En turbidimetría un precipitante de proteínas se agrega a la muestra, y la proteína desnaturalizada y precipitada en forma de suspensión fina es cuantificada por turbidimetría. Los reactivos usados como precipitantes incluyen ácido tricloroacético (TCA), ácido sulfosalicílico (SSA), y cloruro de bencetonio (BZC) o de benzalconio en álcali. La turbidez producida varía en función del precipitante utilizado, del tipo de proteína presente, de la concentración del precipitante, de la temperatura y del tiempo de reacción <sup>85</sup>. La turbidez producida por la albúmina con SSA es 2.4 veces mayor de la producida con globulina; los polipéptidos, glucoproteínas y proteínas de Bence Jones también precipitan por este método. Sin embargo, el TCA hace que la precipitación de albúmina y  $\gamma$ -globulinas sea semejante a temperatura entre 20 y 25 °C, aunque a temperaturas mayores también se produce mayor turbidez con la albúmina. Otro inconveniente asociado con el TCA es que la concentración de proteínas urinarias totales no se determinan cuando la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida está en concentraciones elevadas (frecuente en pacientes con reacción de fase aguda). También algunas drogas han presentado interferencias con el procedimiento TCA <sup>15, 49, 85</sup>.

El método con BZC es el más sensible. Sin embargo, las  $\gamma$ -globulinas producen de 11% a 31% menos turbidez que la albúmina, dependiendo de la concentración de proteínas totales de la muestra. Además, la fluoresceína interfiere con este método. Este método se ha automatizado <sup>49, 85</sup>.

### **4.2.2. MÉTODOS DE UNIÓN A COLORANTES:**

Las técnicas de medida de las proteínas por unión a colorantes están basadas en el cambio de la absorción máxima del colorante cuando se une a las proteínas. El cambio en el máximo de absorbancia del colorante permite medir el color resultante en

presencia de exceso de colorante. Los colorantes que se usan habitualmente son el azul brillante de Coomassie, el rojo Ponceau S y el rojo de Pirogalol <sup>15, 49, 85</sup>.

El método con **azul brillante de Coomassie** es sensible y preciso, la unión es completa a los 2 minutos, y el color es estable por una hora. Sin embargo, produce más color con la albúmina que con las  $\gamma$ -globulinas; interfieren con el método el timol, el salicilato, así como la tolbutamida y la urea en concentraciones de 2 a 4 g/L, respectivamente. Además, el reactivo azul brillante de Coomassie puede adherirse a las paredes de las cubetas, limitando así su aplicación <sup>85</sup>.

En el método que utiliza **rojo Ponceau S** las muestras son tratadas con una solución de Ponceau S en ácido tricloroacético, lo cual precipita las proteínas junto con el colorante fijado; el precipitado rojo formado se disuelve en hidróxido de sodio diluido dando una solución de color violeta que se mide por espectrofotometría a 560 nm. El color es estable durante 6 horas a temperatura ambiente. Es un método igualmente sensible a la albúmina que a las  $\gamma$ -globulinas; requiere pequeños volúmenes de muestra, tiene una buena precisión y es bastante exacto. Existen variantes de la técnica, pero todas tienen el inconveniente de no poder automatizarse, por lo que prácticamente no se usa <sup>84</sup>.

El **rojo de pirogalol-molibdato** reacciona con las proteínas para formar un complejo púrpura azulado que absorbe a 600 nm. La sensibilidad también depende, como en otros procedimientos, del tipo de proteínas que va a ser medida. Sin embargo, la adición de surfactantes tales como el dodecil sulfato de sodio (25 mg/L) a la mezcla de reactivos iguala el color que se produce con la albúmina y las  $\gamma$ -globulinas. Al igual que el azul brillante de Coomassie, el colorante azul se une a las paredes de las cubetas, limitando su uso a instrumentos con cubetas desechables. Este método está automatizado en muchos laboratorios <sup>49, 85</sup>.

#### 4.2.3. MÉTODOS QUÍMICOS:

En la **reacción del biuret**, los iones de cobre ( $\text{Cu}^{++}$ ), en solución alcalina, actúan sobre las uniones peptídicas de las proteínas produciendo un color que se mide a

540 nm<sup>84</sup>. Dado que el biuret es poco sensible, las proteínas urinarias deben concentrarse antes del análisis. La concentración se acompaña de la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético o con ácido fosfotungstico-etano hidrocloreto. La proteína precipitada se separa por centrifugación y se disuelve en el reactivo de biuret. Este método tiene la ventaja de tener igual sensibilidad para cada tipo de proteína de la orina. Sin embargo, esta reacción sufre interferencias con algunos productos metabólicos coloreados (tales como bilirrubina) y con amonio<sup>15, 84, 85</sup>.

La **reacción de Folin-Lowry** es 100 veces más sensible que la del biuret no modificada. El reactivo de Folin consiste en ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico disueltos en ácidos fosfórico y clorhídrico. El paso inicial en este método es la fijación de Cu<sup>++</sup> a las uniones peptídicas y a los aminoácidos tirosina y triptófano en un medio alcalino. Luego se agrega el reactivo de Folin, que oxida los complejos cobre-proteína, cobre-tirosina y triptófano. El color azul de la reacción tiene un máximo de absorción amplio, pero en general se mide a 660 nm<sup>84</sup>.

El **método Kjeldahl** consiste en la digestión de un ácido que libera iones amonio de los componentes nitrogenados que contienen las proteínas, siendo ese amonio cuantificado. Cada proteína tiene un contenido diferente de nitrógeno según su composición de aminoácidos, por lo que el cálculo de la concentración de proteínas depende la composición proteica de la muestra; esto hace que la medida del nitrógeno no sea un proceso simple, y no se use normalmente en los laboratorios clínicos<sup>93</sup>.

El **método del ácido bicincónico** es una modificación del Folin-Lowry y utiliza la especificidad del ácido bicincónico por el cobre<sup>84</sup>.

### 4.3. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS:

#### 4.3.1. INMUNOELECTROFORESIS:

La inmunolectroforesis combina la electroforesis con técnicas inmunoquímicas. Se desarrolla en dos partes: primero se separan por electroforesis los antígenos de un espécimen y después éstos difunden en presencia de un suero con anticuerpos contra dichos antígenos. Cuando se produce la reacción antígeno-anticuerpo los complejos que se forman precipitan. Esto se pone de manifiesto mediante una línea en forma de arco. El medio de soporte más adecuado para realizarla es el gel de agarosa <sup>94</sup>.

Entre las técnicas de inmunolectroforesis está la **inmunofijación**, que consiste, en primer lugar, en separar las proteínas de un espécimen por electroforesis en gel de agarosa. La muestra se coloca en varias zonas del gel de forma que se realizan simultáneamente varios recorridos electroforéticos de la misma. Después se añade directamente al gel, y sobre cada uno de los recorridos electroforéticos, un anticuerpo contra una proteína específica (IgG, IgA, IgM...), de forma que cuando se produce la reacción del anticuerpo con la proteína de interés, se forma un precipitado que queda atrapado dentro de la matriz del gel. A continuación se lava con soluciones salinas para eliminar las proteínas no precipitadas, y se tiñe para identificar la proteína precipitada <sup>94, 95</sup>.

Las principales ventajas de la inmunofijación son la practicabilidad y la facilidad para interpretar los resultados <sup>94</sup>.

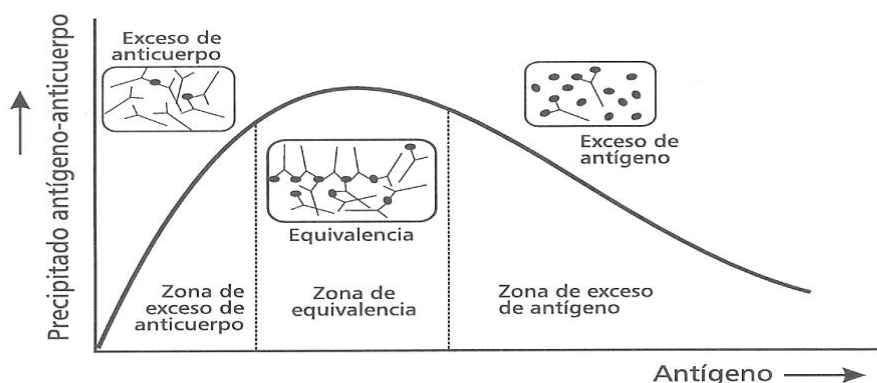
Una variante de la técnica de inmunolectroforesis es la **inmunofijación por sustracción**. El método consiste en la realización de la electroforesis capilar antes y después de incubar la muestra de suero u orina con cuentas de sefarosa recubiertas con anticuerpos contra isotipos específicos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, Kappa y Lambda), quedando los componentes monoclonales inmunofijados a las partículas de sefarosa. Los cambios cualitativos resultantes en el patrón electroforético permiten identificar el componente monoclonal. La identidad de éste se caracteriza por la

especificidad de los anticuerpos que origina la desaparición del pico del componente monoclonal <sup>91, 95</sup>.

#### 4.3.2. INMUNOPRECIPITACIÓN:

La reacción de inmunoprecipitación se produce cuando un antígeno y un anticuerpo dirigido contra él se unen en solución formando rápidamente pequeños agregados que confieren a la solución un aspecto turbio. Los agregados se asocian luego lentamente y forman una matriz mayor que finalmente da lugar a un precipitado. La reacción inicial entre el antígeno y el anticuerpo es rápida, mientras que la formación de los pequeños complejos capaces de dispersar la luz es lenta, aunque se puede hacer más rápida añadiendo al medio aceleradores <sup>96</sup>.

Las técnicas más utilizadas de inmunoprecipitación son la **inmunturbidimetría** y la **inmunonefelometría**, que utilizan la dispersión de la radiación para la medida de la velocidad de formación de inmunocomplejos *in vitro*. Se basa en la observación de que los complejos antígeno-anticuerpo forman precipitados turbios que se pueden detectar fotoeléctricamente <sup>85, 102</sup>. Deben proporcionar formas de detectar el exceso de antígeno cuando el componente a medir se encuentra en una concentración elevada, y así evitar errores de medida cuando la concentración de antígeno es grande y sobrepasa la zona de inmunoprecipitación máxima (fig. I 3) <sup>94, 96</sup>.



**Figura I 3: Curva de inmunoprecipitación de Heidelberg-Kendall**, que representa la cantidad de anticuerpo precipitado en función de la concentración de antígeno para una concentración fija de anticuerpo.

Los métodos nefelométricos son, en general, más sensibles que los métodos turbidimétricos <sup>96</sup>.

Estos dos métodos han ido sustituyendo a los antiguos métodos de inmunoprecipitación en gel, tales como la electroinmunodifusión y la inmunodifusión radial, ya que los primeros tienen la ventaja, con respecto a esto último, de la rapidez en la ejecución de la medición, la posibilidad de automatizarla y la mejora de la calidad de los resultados <sup>94</sup>.

#### **4.3.3. INMUNOENSAYOS:**

Los más usados son los radioinmunoanálisis, que utilizan los isótopos radiactivos como marcadores de los antígenos o los anticuerpos en el sistema de inmunoanálisis. Su gran capacidad de aplicación es el resultado de la combinación de dos propiedades: una gran especificidad metrológica por el uso de anticuerpos específicos y una gran detectabilidad debida al uso de isótopos radiactivos. Las principales técnicas utilizadas para los inmunoensayos son el radioinmunoanálisis (RIA) y el análisis inmunorradiométrico (IRMA) <sup>94, 96</sup>. Actualmente se están abandonando, o siendo sustituidos por métodos no radiactivos, por motivos ambientales.





## ***II - HIPÓTESIS DE TRABAJO:***

---



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

La detección precoz de trastornos renales y del tracto urogenital por los procedimientos diagnósticos del laboratorio es muy importante, porque los síntomas están a menudo ausentes, o son atípicos, durante un largo período de tiempo. Ya que diversas enfermedades renales primarias y secundarias producen fallo renal, y a menudo, la muerte, un laboratorio moderno debe ser capaz de detectar un trastorno de la función renal en un estadio en el que las medidas terapéuticas puedan prevenir la progresión de la enfermedad.

Es clásica la utilidad de la proteinuria como un signo de enfermedad renal, así como lo es también el empleo del urianálisis estándar para el screening de orina de pacientes. Para tal fin, el procedimiento más empleado ha sido la tira reactiva. Sin embargo, está demostrado que este método no es lo suficientemente sensible para satisfacer las necesidades diagnósticas actuales y futuras, por lo que surge la necesidad de aplicar métodos diagnósticos más eficaces que nos den la información necesaria para llegar a un diagnóstico correcto de una forma rápida.

El examen básico mediante tiras reactivas y/o microscópico debería ser complementado con una determinación cuantitativa y sensible en la orina de las proteínas totales o de las principales proteínas urinarias marcadoras como albúmina, IgG y  $\alpha$ 1-microglobulina.

Cuando aparece proteinuria, las proteínas que suelen aparecer de forma más abundante son albúmina, inmunoglobulina G y  $\alpha$ 1-microglobulina. El cociente entre la suma de estas tres proteínas y las proteínas totales urinarias debe ser mayor de 0.6. Si dicho cociente es inferior nos está indicando que hay un escape de proteínas que no medimos (hiato o gap proteico). Entre las proteínas no medibles pueden encontrarse:

- cadenas ligeras
- hemoglobina
- mioglobina
- lisozima

La presencia de cadenas ligeras en orina puede tener un origen policlonal o monoclonal:

- Aumento policlonal: ocurre en aumentos policlonales de inmunoglobulinas en suero, por ejemplo en enf. autoinmunes (LES, artritis reumatoide, diabetes insulínica, etc.), en enf. inflamatorias crónicas (sarcoidosis, tuberculosis...).
- Aumento monoclonal: puede ir acompañado de un componente monoclonal en suero, o no. Puede ser debido a:
  - Mieloma múltiple o plasmocitoma solitario (menos frecuente). Están implicadas las células plasmáticas de la médula ósea. Son las gammopatías más frecuentes. Representan el 10% de todas las neoplasias hematológicas.
  - Linfomas, leucemia linfocítica crónica y macroglobulinemia de Waldenström. Las células comprometidas son los linfocitos B de los ganglios linfáticos. Representan un 15 % del total de gammopatías.
  - Amiloidosis y crioglobulinemia.
  - Gammopatías monoclonales asintomáticas o de significado incierto. En suero, hasta un 25% de las paraproteínas son benignas. En orina, sin embargo, la presencia de un pico monoclonal de cadenas ligeras es casi siempre indicativo de malignidad. Ha sido establecido que la proteinuria de Bence Jones con excreción de más de 10 mg/L, es de mal pronóstico, siendo sugestiva de enfermedad maligna de células plasmáticas. Otros autores han establecido que la proteinuria de Bence Jones en presencia de un pico monoclonal en suero es una evidencia fuerte de un proceso neoplásico.

En muchos pacientes, la proteinuria de Bence Jones puede ser el único hallazgo en mucho tiempo. Cuando aparece la sintomatología, las lesiones pueden ser irreparables. El seguimiento a largo plazo (de 10 a 25 años) ha demostrado que en pacientes con Gammopatía monoclonal de significado incierto puede desarrollarse mieloma o amiloidosis (del 26 al 40% a los 25 años, según diferentes estudios), por lo que todos estos pacientes deben mantenerse bajo observación indefinidamente. Si se

acompaña de proteinuria de Bence Jones el tiempo de evolución hacia malignidad se acorta.

En esta tesis se realiza el desarrollo y posterior evaluación de un protocolo de actuación que tiene como punto de partida la cuantificación de proteínas totales en cualquier orina que llegue al laboratorio, y que pueda finalizar en el estudio de cadenas ligeras, lo que evidenciará una mayor prevalencia de proteinuria de Bence Jones que la descrita en la actualidad.

Se analizan orinas a las que en principio, no se ha solicitado más que un análisis elemental, bajo la HIPÓTESIS de que hay un cierto número de enfermos que, sólo con un análisis elemental de orina, pueden pasar desapercibidos, y mostrar la enfermedad cuando las medidas terapéuticas son menos eficaces, y la enfermedad ya ha afectado más gravemente al riñón o a otros órganos.

La estrategia de análisis sigue un procedimiento o algoritmo que pretende detectar, no sólo la proteinuria en general, sino el HIATO PROTEICO, bajo la HIPÓTESIS de que, de esta forma no es necesario rastrear cadenas ligeras en TODAS la orinas, lo que sería inviable, pero tampoco se van a “escapar” los casos de proteinuria de Bence Jones. Esto se consigue con la utilización de un PROTOCOLO ESCALONADO, que va deteniendo el procedimiento de análisis de la muestra de orina cuando no sobrepasa los parámetros considerados patológicos.

Todo esto se hace bajo la HIPÓTESIS de una EFICIENCIA DIAGNOSTICA prevista: constituye un procedimiento clínicamente muy rentable, pues permite la detección de un número apreciable de casos en los que no había sospecha previa de proteinuria de Bence Jones. Al mismo tiempo, su utilidad no sólo radica en el diagnóstico final de proteinuria de Bence Jones, pues para llegar al mismo previamente se hace un estudio de proteínas específicas que hace posible poner de relieve incluso un daño renal inicial, tubular o glomerular. El disponer de métodos rápidos, eficaces y aptos para ser llevados a cabo en todos los laboratorios, permitirá iniciar un tratamiento adecuado, precoz y más eficaz, que dejará menos secuelas del tipo de insuficiencia renal crónica. A la larga, no sólo mejorará la calidad de vida de estos pacientes, sino que disminuirá el gasto sanitario derivado de tratamientos como diálisis, entre otros.



### ***III - OBJETIVOS:***

---





## **OBJETIVOS:**

Dado el potencial lesivo de la Proteinuria de Bence Jones, y el período subclínico incierto previo a la aparición de sintomatología, nos planteamos la creación de un protocolo analítico para las orinas, con los siguientes objetivos:

1. Cuantificar por un método fiable, la concentración de proteínas totales en TODAS las orinas recibidas en el Laboratorio, sin utilizar métodos semicuantitativos, como la Tira Reactiva de Orina.
2. Cuantificar, en las orinas que tienen proteinuria MAYOR de 300 mg/L, la concentración de creatinina.
3. Cuantificar en todas las orinas con concentración de proteínas totales /creatinina MAYOR de 200 mg/g creatinina, las proteínas específicas albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina e inmunoglobulina G.
4. Cuantificar cadenas ligeras libres a todas aquellas orinas cuyo “hiato proteico” expresado como el cociente
$$\frac{\text{Albúmina} + \alpha 1\text{-microglobulina} + \text{IgG}}{\text{Proteínas totales}}$$
sea menor de 0.6, según criterios establecidos en la bibliografía.
5. Realizar inmunosustracción a todas las orinas a las que se les han cuantificado cadenas ligeras libres y han dado valores superiores al rango de referencia recomendado por la casa comercial fabricante del kit de análisis.
6. Establecer un rango de referencia para el cociente entre cadenas ligeras libres kappa y lambda en orina.
7. Comparar dos procedimientos de concentración de orina, previos a la aplicación de la técnica de inmunosustracción.

8. Valorar la utilidad del punto de corte de 0.6 del cociente

$$\frac{\text{Albúmina} + \alpha 1\text{-microglobulina} + \text{IgG}}{\text{Proteínas totales}}$$

9. Estudiar sensibilidad y especificidad diagnóstica del protocolo seleccionado.
10. Comparar los resultados obtenidos al aplicar el protocolo propuesto con la prevalencia de cadenas ligeras libres monoclonales cuando es el clínico quien solicita la cuantificación.

## ***IV - MATERIAL Y MÉTODO:***

---



## **1. MATERIAL:**

Durante los 3 años seleccionados para realizar este estudio (Mayo de 2002-Abril de 2005), se han analizado por inmunosustracción 146 muestras de orina aleatorias, correspondientes a 106 pacientes. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Valme.

### **1.1. PROTOCOLO DE INCLUSIÓN DE PACIENTES:**

En el laboratorio del Hospital Universitario de Valme (Sevilla) se analizan un total de 113026 orinas anuales. La mayoría son muestras de orina de 1ª o 2ª micción de la mañana a las que se les ha pedido un estudio elemental de orina, y en menor porcentaje (1%) son muestras de orina provenientes de una recogida de orina durante 24 horas. Una vez que llegan al laboratorio se les realiza el siguiente proceso analítico (Figs. M 1 y M 2):

#### **1. Análisis de elementos formes de la orina:**

Todas las muestras de orina se analizan mediante Citometría de flujo en el sistema UF-100 para la determinación cuantificada de los siguientes parámetros: hematíes, leucocitos, células epiteliales, cilindros y bacterias, así como otros parámetros que deben ser visualizados con el microscopio.

#### **2. Cuantificación de proteínas totales:**

Todas las orinas se centrifugan a 3000 x g durante 10 minutos y se les cuantifican las *proteínas totales* el mismo día de su recepción. Si la concentración de proteínas totales es inferior a 300 mg/L, no se continúa con el protocolo, y se informan los resultados de estos dos análisis: cuantificación de elementos formes y de proteínas totales. Siguen el protocolo aquellas orinas que tienen una concentración mayor de 300 mg/L. Esto supone 4830 orinas/año (4,3%).

### **3. Cuantificación de creatinina en orina:**

A todas las orinas con proteínas totales mayor de 300 mg/L se les cuantifica la *creatinina urinaria* y se calcula el *cociente proteínas orina/creatinina orina*. Un total de 3392 orinas/año (3%) presenta un *cociente proteínas/creatinina* mayor de 200 mg/g de creatinina.

### **4. Cuantificación de proteínas específicas:**

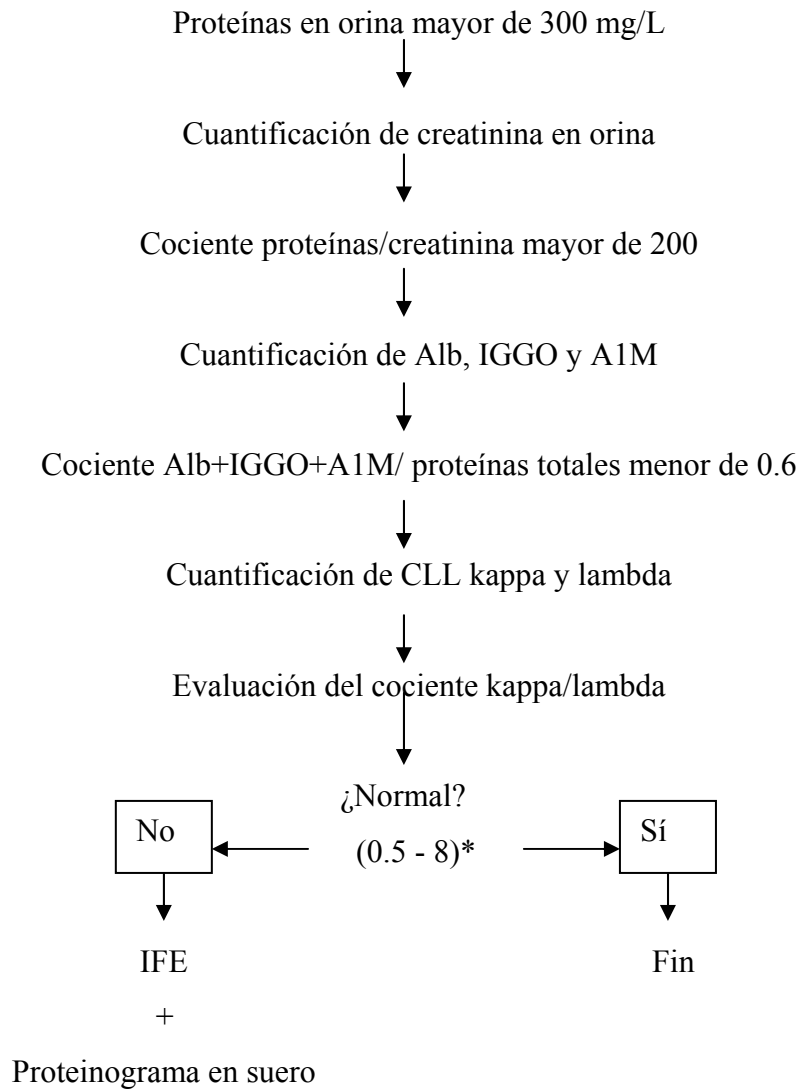
A las orinas con cociente proteínas orina/creatinina orina mayor de 200 mg/g de creatinina se les cuantifica *albúmina (Alb)*, *α1-microglobulina (A1M)* e *inmunoglobulina G (IGGO)* en orina, y se calcula el “hiato proteico” o *cociente* de la suma de estas tres proteínas y las proteínas totales (PT) en orina:  $(Alb+A1M+IGGO)/PT$ . Un total de 1068 orinas/año (0,9%) presentan un cociente menor de 0,6.

### **5. Cuantificación de cadenas ligeras libres en orina:**

A las orinas con cociente  $(Alb+A1M+IGGO)/PT < 0.6$  se les cuantifican *cadena ligeras libres en orina kappa y lambda*; de estas, 288 orinas/año (0,25%) presentaron concentraciones superiores al rango de referencia establecido por la casa comercial (mayor de 10 mg/L).

### **6. Inmunosustracción de orina:**

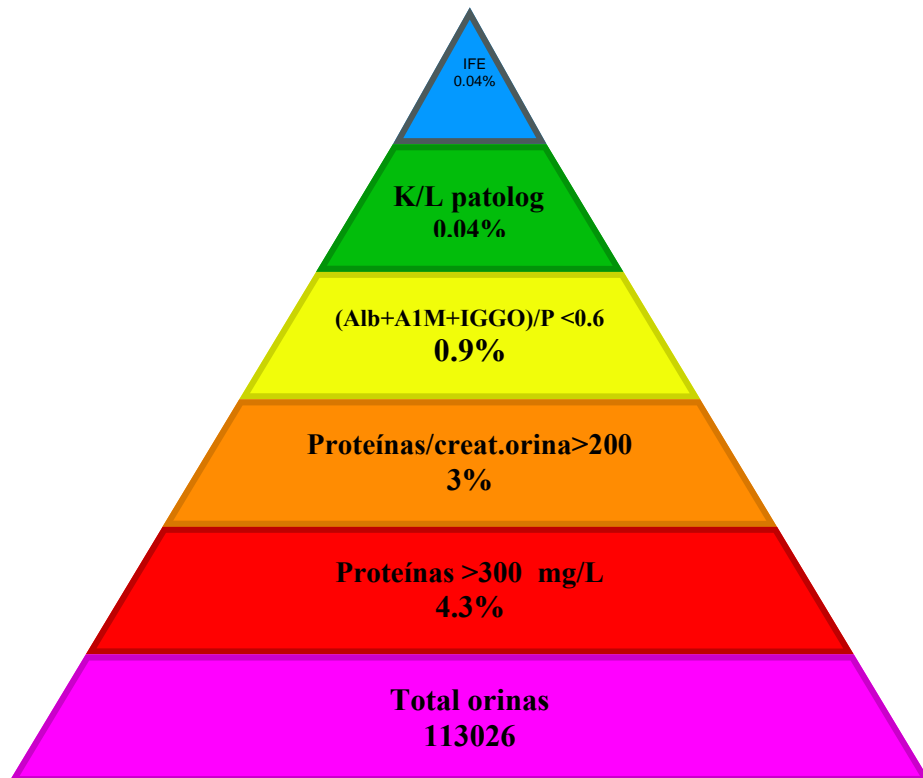
Después de evaluar el cociente de cadenas ligeras libres kappa/lambda resultó patológico en 50 orinas/año (0.04%), que son a las que se les realizó la técnica de inmunosustracción.



**Figura M 1: Esquema del PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LA PROTEINURIA**

\* rango normal entre 0.5 y 8





**Figura M 2: Representación gráfica de los porcentajes de muestras de orina analizados en cada escalón del proceso analítico.**

## **1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE PACIENTES EN EL PROTOCOLO:**

Las muestras de orina que presentaron una o varias de las siguientes características fueron excluidas del protocolo:

- Muestras de orina correspondientes a pacientes menores de 16 años.
- Creatinina en orina menor de 0.3 g/L.
- Proteínas totales en orina < 500 mg/L con leucocitos > 100 cel/ $\mu$ l y/o hematuria > 400 cel/ $\mu$ l.

Estas características ocurren con una frecuencia media de 1800 muestras de orina/año.

### **1.3. SELECCIÓN DE PUNTOS DE CORTE DEL COCIENTE KAPPA/LAMBDA (K/L) EN ORINA:**

A las 68 primeras muestras que presentaron unas concentraciones de cadenas ligeras libres urinarias superiores a 10 mg/L se les realizó la técnica de inmunosustracción para determinar la presencia o no de componente monoclonal en orina.

Los resultados que se obtuvieron tras realizar la inmunosustracción se utilizaron para establecer los puntos de corte del cociente de cadenas ligeras libres Kappa/Lambda en orina que presentaron mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Una vez establecidos los puntos de corte del cociente Kappa/Lambda se empezó a aplicar este criterio al resto de las muestras de orina del estudio, realizándose la técnica de inmunosustracción sólo a las orinas que lo presentaban dentro del rango establecido como patológico.

## **2. MÉTODO ANALÍTICO:**

### **2.1. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS:**

#### **Proteínas totales en orina:**

Determinación cuantitativa por método colorimétrico basado en la formación del complejo de rojo de pirogalol y molibdato, en el sistema COBAS INTEGRA 700 de ROCHE DIAGNOSTICS.

#### **Creatinina en orina:**

Determinación cuantitativa por reacción cinética de Jaffé, en medio tamponado, sin desproteínización, en el sistema COBAS INTEGRA 700 de ROCHE DIAGNOSTICS.

#### **Leucocitos y hematíes en orina:**

Determinación por citometría de flujo e impedancia eléctrica en el sistema UF-100 (SYSMEX CORPORATION).

#### **Alfa-1-microglobulina, microalbúmina e inmunoglobulina G en orina; cadenas ligeras Kappa y Lambda totales en suero; inmunoglobulinas A, G y M en suero:**

Determinación cuantitativa por nefelometría cinética en el sistema inmunoquímico IMAGE de BECKMAN COULTER. Este sistema mide la velocidad de incremento de la dispersión de la luz producida por las partículas suspendidas en la solución, resultantes de los complejos formados durante una reacción antígeno-anticuerpo. En todas estas técnicas se realiza chequeo de exceso de antígeno.

**Cadenas ligeras libres Kappa y Lambda en orina:**

Determinación cuantitativa con reactivos de New Scientific Company adaptados al nefelómetro IMAGE de BECKMAN COULTER. El método se basa en la reacción de inmunoprecipitación en fase líquida con antiseros adsorbidos específicos para los determinantes “Hidden” (ocultos) de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas. En estas técnicas no se realiza chequeo de exceso de antígeno. Cuando había un desfase con la concentración total de proteínas, y las concentraciones de cadenas ligeras libres estaban bajas, se procedía a la repetición de su determinación en orina diluida.

**Proteinograma:**

La separación electroforética de las proteínas en suero y orina se realiza en el sistema de electroforesis capilar PARAGON CZE 2000 Versión 1.6 (BECKMAN COULTER). Utiliza capilares de sílice fundida de muy pequeño diámetro (20-200  $\mu\text{m}$ ). Éstos tienen en su interior grupos silanoles ionizados con cargas negativas, los cuales atraen a los cationes del tampón formando una doble capa, la cual, a su vez, se rodea de otra capa catiónica con una atracción más débil (capa difusa), que es capaz de ponerse en movimiento cuando se aplica una diferencia de potencial. En su marcha arrastra a los iones hidratados del tampón, dando lugar a un flujo del disolvente hacia el cátodo, *flujo electroosmótico*. La velocidad del flujo electroosmótico es mayor que la velocidad electroforética de cada una de las proteínas, por lo que éstas migrarán hacia el cátodo (migración a contracorriente). La detección se hace por absorbancia directa a 214 nm, a través de una pequeña ventana en el capilar cerca del cátodo. No requiere tinción. Un detector ultravioleta controla la migración de las fracciones de proteínas. Cada proteína dará un impulso eléctrico distinto que se transforma en picos y que luego se integra en bandas.

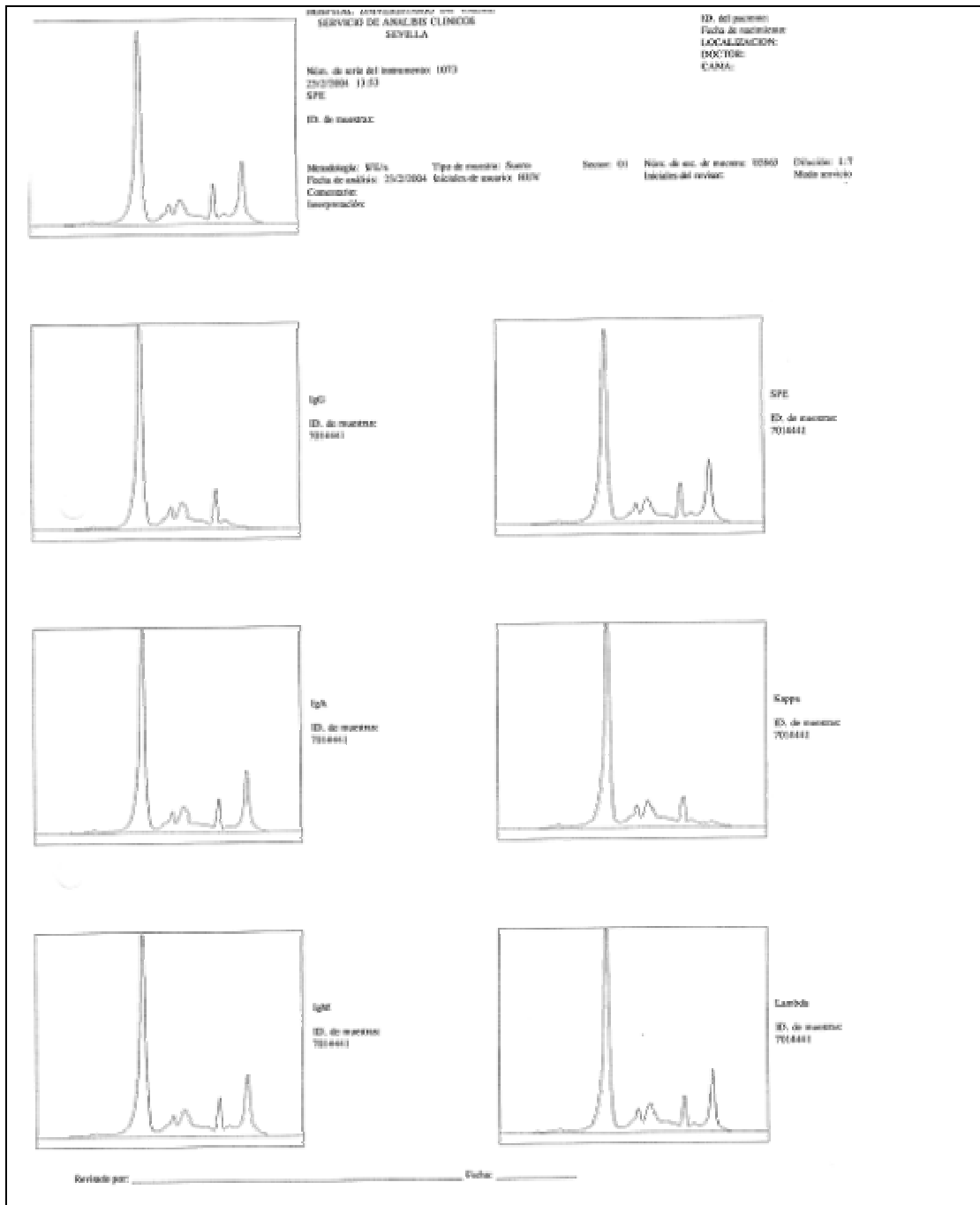
**Identificación inmunológica de componentes monoclonales:**

Se realiza, tanto en suero como en orina, por la técnica de electroforesis de inmunofijación por inmunosustracción efectuada en el sistema de electroforesis capilar PARAGON CZE 2000 Versión 1.6 (BECKMAN COULTER). Se utilizan los reactivos

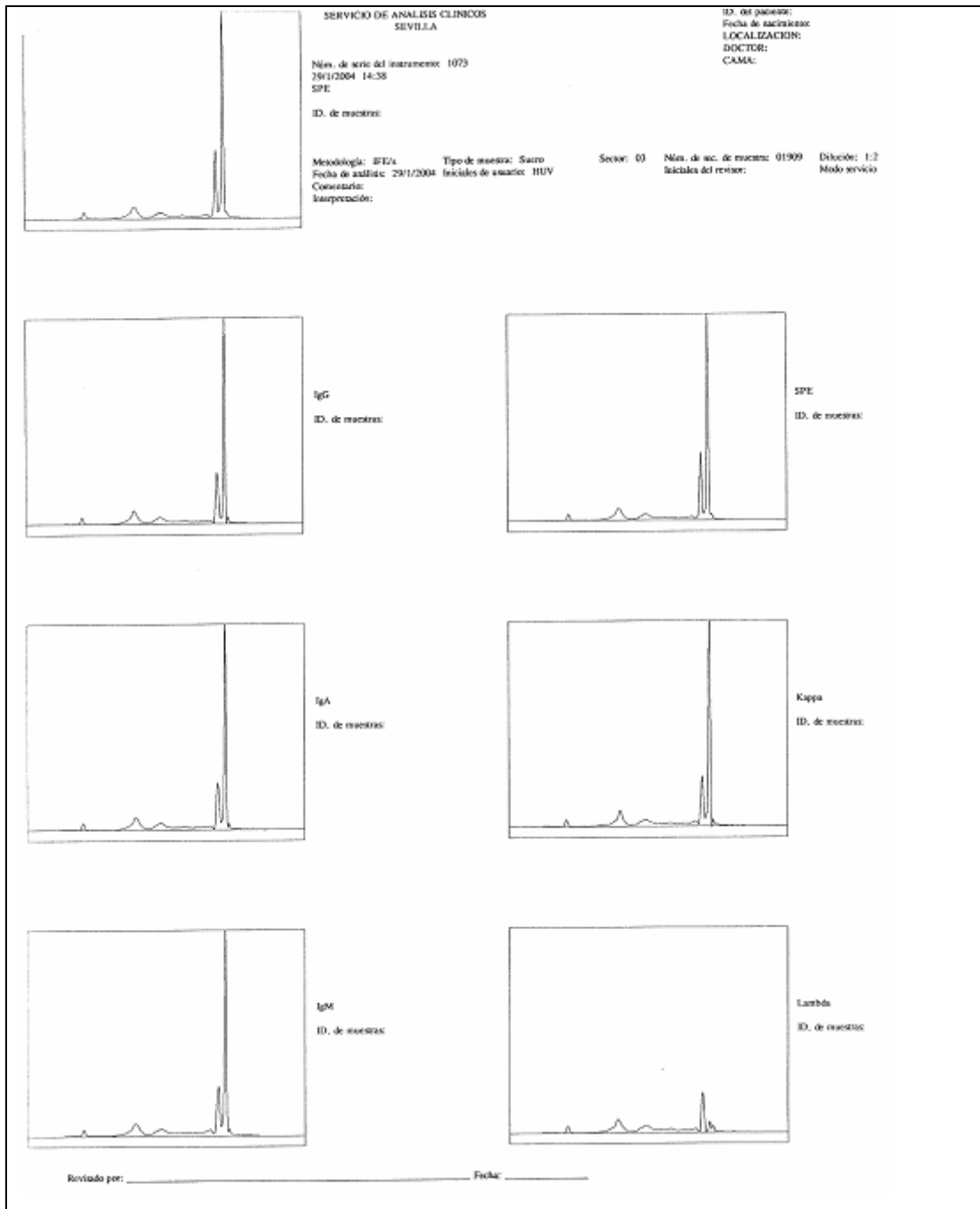
para la electroforesis capilar de inmunofijación por inmunosustracción de BECKMAN COULTER.

***Procedimiento de inmunosustracción:***

- Por cada muestra se utiliza un segmento con siete pocillos; la muestra se diluye en uno de los pocillos, depositándose alícuotas de la misma en cinco pocillos diferentes: tres pocillos contienen microesferas de sefarosa recubiertas con antisueros monoespecíficos frente a cadenas pesadas IgG, IgA e IgM respectivamente, y los otros dos pocillos contienen microesferas recubiertas con antisueros monoespecíficos frente a cadenas ligeras kappa y lambda respectivamente. En otro de los pocillos, que no contiene ningún reactivo, se añade otra alícuota de la muestra que se comporta como referencia.
- La muestra es incubada con las microesferas de sefarosa unidas a los antisueros correspondientes; a ellas se unen las respectivas inmunoglobulinas, si la muestra las presenta, formando complejos de alta densidad que se depositan en el fondo del pocillo, desapareciendo de esa muestra.
- Después de la incubación, se analizan las muestras de los seis pocillos y automáticamente se imprimen los proteinogramas correspondientes a cada una de ellas.
- *Las inmunoglobulinas son identificadas por la reducción o ausencia de los picos correspondientes, cuando son comparados con el proteinograma de referencia de la muestra no tratada.* La ausencia de inmunosustracción de componentes monoclonales en las cinco especificidades de anticuerpos puede indicar la necesidad de efectuar otro análisis de las proteínas (figs. M 3 y M 4). La inmunosustracción parcial o incompleta indica que es necesario diluir la muestra y realizar nuevamente la técnica.



**Figura M 3: Inmunosustracción en suero: Pico monoclonal IgG Kappa.**



**Figura M 4: Inmunosustracción en orina: Pico monoclonal de cadenas ligeras libres lambda.**



Existen dos *protocolos de actuación* diferentes según sea el tipo de muestra a analizar y la concentración del componente monoclonal (tabla M1):

- Suero:
  - Si la concentración de inmunoglobulina en suero es inferior a 200 mg/L se programa una dilución 1/2.
  - Si la concentración de inmunoglobulina en suero está entre 200 y 3000 mg/L se programa una dilución 1/7 (es la dilución que viene preestablecida en el aparato).
  - Si la concentración de inmunoglobulina en suero está entre 3000 y 5000 mg/L se programa una dilución 1/15.
  
- Orina (cuando la muestra es orina, debe primeramente concentrarse y desalinizarse antes de cualquier procedimiento de electroforesis):
  - Si la concentración de cadenas ligeras libres en orina es inferior a 140 mg/L, se programa una dilución  $\frac{1}{2}$  y se añaden 50  $\mu$ l del concentrado de orina en el primer pocillo del segmento de inmunosustracción perforando la platina.
  - Si la concentración de cadenas ligeras libres en orina oscila entre 140 y 200 mg/L, se programa una dilución  $\frac{1}{2}$ , pero sin añadir concentrado de orina en el primer pocillo del segmento.
  - Si la concentración de cadenas ligeras es mayor de 200 y menor de 1000 mg/L, se programa una dilución 1/7.
  - Si la concentración de cadenas ligeras es superior a 1000 mg/L, se programa una dilución 1/15.

**Tabla M1: Protocolo de inmunosustracción en el sistema Paragon CZE 2000.**

MUESTRA	DILUCIÓN ÓPTIMA RECOMENDADA	CONCENTRACIÓN COMPONENTE MONOCLONAL
SANGRE	1:2	< 200 mg/L
	1:7(preestablecida)	200 – 3000 mg/L
	1:15	3000 – 5000 mg/L
ORINA	1:2 + 50 µL c.o.1 <sup>er</sup> pocillo	< 140 mg/L
	1:2	140 – 200 mg/L
	1:7	200 – 1000 mg/L
	1:15	>1000 mg/L

Abreviatura = c.o: concentrado de orina.

## **2.2. PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACIÓN DE LA ORINA:**

Se han valorado dos procedimientos de concentración de la orina que emplean sistemas de filtración diferentes:

### ***Concentración con sistema VIVASPIN 20 (Vivascience):***

- Este sistema realiza una ultrafiltración de las proteínas.
- Requiere un volumen de muestra entre 14 ml y 20 ml, según se utilice centrífuga de ángulo fijo o centrífuga de cabezal basculante, respectivamente.
- La membrana que utiliza retiene proteínas con un MWCO (Molecular Weight Cut-Off) por encima de 10000 Daltons.
- La muestra de orina, previamente centrifugada, se coloca en el sistema de filtración y se centrifuga en una centrífuga de cabezal basculante a 3000 g durante 16 minutos.
- Se desecha la orina del sedimento y se añade al sobrenadante 5 ml de buffer de electroforesis.
- El proceso de desalinización requiere otra centrifugación a 3000 g durante 10 minutos.
- Se recupera un volumen de muestra concentrada entre 200 y 1000  $\mu$ l, al que se le realiza la inmunosustracción.

### ***Concentración con el sistema YM-30 Microcon<sup>R</sup> (Millipore Corporation):***

- A diferencia del sistema anterior, el sistema Microcom retiene en el filtro las proteínas a estudiar.
- Es adecuado para volúmenes de muestra pequeños (400  $\mu$ l-2400  $\mu$ l).
- El límite establecido de peso molecular nominal (NMWL: Nominal Molecular Weight Limit) en Daltons es de 30000.
- Se colocan 400  $\mu$ l de muestra de orina previamente centrifugada en cada vial, hasta un total de 6 viales por muestra, si el volumen de orina lo permite (2.4 ml).

- Se centrifugan los viales a 14000 g durante 10 minutos en una centrífuga de ángulo fijo. Después de este proceso la totalidad de líquido es filtrado y quedan sobre la membrana las proteínas retenidas. Con este paso se ha realizado la concentración y desalinización.
- Se añade a cada vial 80  $\mu$ l de buffer de electroforesis sin tocar la membrana.
- Se invierten varias veces los viales y se recupera el contenido total para realizar la inmunosustracción.

### **3. MÉTODO ESTADÍSTICO:**

- La estadística referente al número de orinas procesadas en el laboratorio, así como el número de determinaciones de pruebas derivadas del protocolo aplicado, y los datos del número de peticiones de proteinuria de Bence Jones por el clínico, se obtuvieron mediante el programa INFOMEGA (Versión 3.0 de ROCHE DIAGNOSTICS).
- Los puntos de corte de mayor sensibilidad y especificidad, así como el área bajo la curva ROC se obtuvieron con el programa estadístico CBstat (Versión 4.3.1.) (K. LINNET 2003).
- El estudio comparativo de los dos sistemas de concentración de orina se realizó con el programa estadístico S.P.S.S. (Versión 13).
- La estadística descriptiva se realizó utilizando los programas estadísticos CBstat (Versión 4.3.1) y S.P.S.S. (Versión 13).
- La prueba estadística U de Mann-Whitney se realizó con el programa estadístico CBstat (Versión 4.3.1.) (K. LINNET 2003).
- La prueba estadística Chi Cuadrado se realizó con el programa estadístico S.P.S.S. (Versión 13).

## ***V - RESULTADOS:***

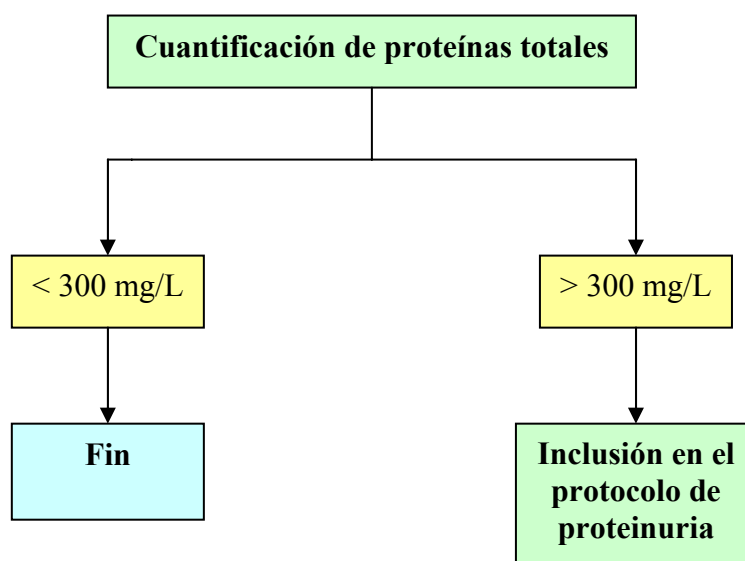
---



## **1. PROTOCOLO DE ESTUDIO CUANDO APARECE UNA PROTEINURIA:**

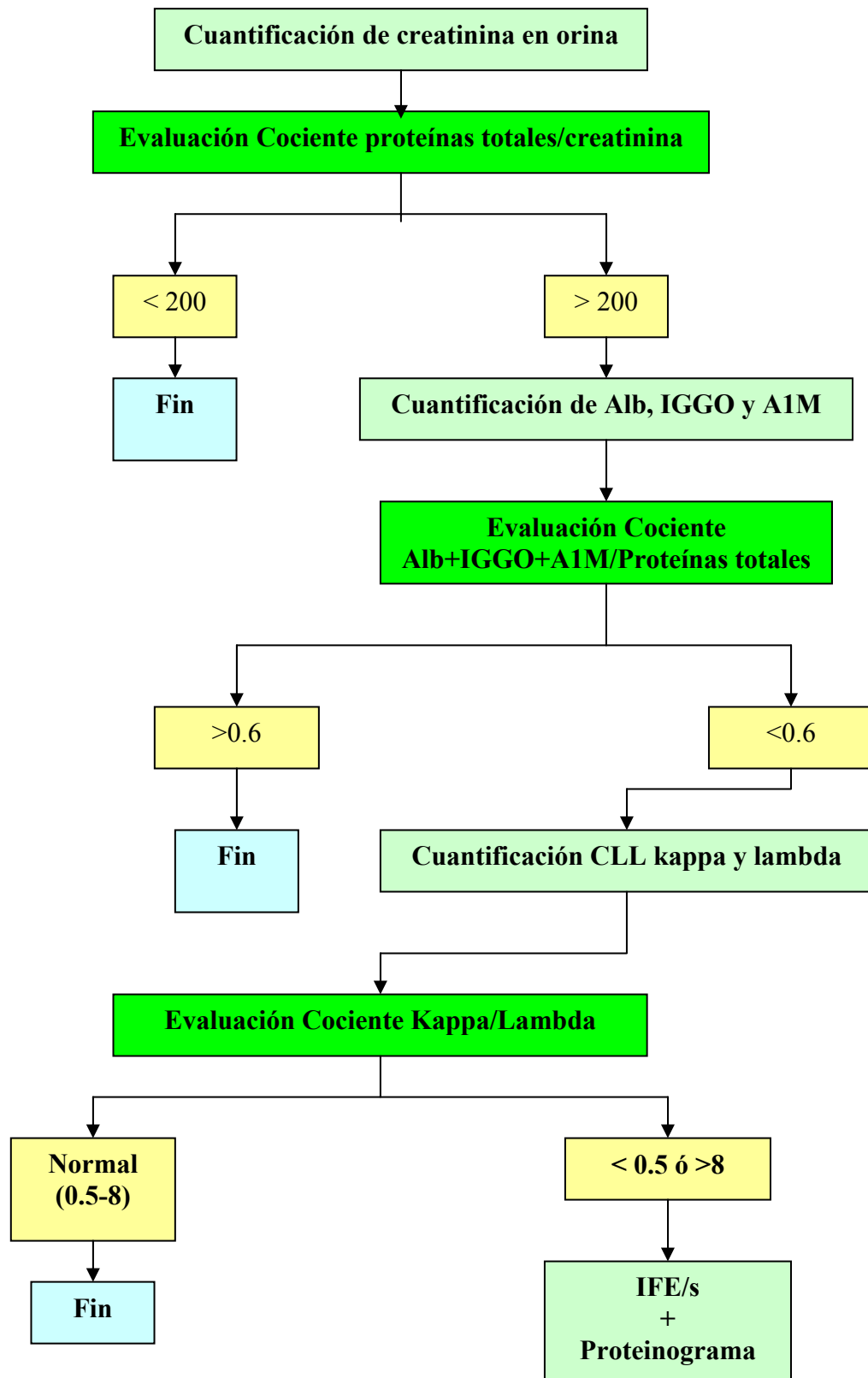
Las muestras de orina con una cuantificación de proteínas totales mayor de 300 mg/L se las incluye en el **protocolo de estudio de proteinuria** (figuras R 1 y R 2):

- Comienza con la cuantificación de creatinina en orina.
- Cuando el cociente proteínas totales/creatinina en orina es mayor de 200 mg/g de creatinina se cuantifica albúmina, IgG y  $\alpha$ 1-microglobulina.
- Se calcula el cociente de la suma de estas tres proteínas entre las proteínas totales, y si es menor o igual a 0.6 se cuantifican cadenas ligeras libres kappa y lambda.
- Se evalúa el cociente Kappa/Lambda y se procede según su resultado:
  - Cuando su valor está comprendido entre 0.5 y 8 se considera normal y finaliza el estudio de la orina.
  - Cuando su valor es menor de 0.5 ó mayor de 8 se considera patológico y se realiza la inmunosustracción (IFE/s) para determinar la presencia o no de pico monoclonal en orina. En este caso, si el paciente no tiene hecho proteinograma en suero, se recupera el suero, si tiene pedidas otras determinaciones bioquímicas, para realizarle el proteinograma, y si esto no es posible, se le aconseja al paciente que vuelva a extraerse sangre para poder realizarlo, y así, completar el estudio.



**Figura R 1: Proceso de inclusión en el protocolo de proteinuria.**





**Figura R 2: Esquema del estudio de la proteinuria en el laboratorio de Bioquímica.**  
 Abreviaturas = Alb: Albúmina; IGGO: Inmunoglobulina G en orina; A1M:  $\alpha$ 1-microglobulina; CLL: cadenas ligeras libres; IFE/s: Inmunosustracción

## **2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL COCIENTE ENTRE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS Y PROTEÍNAS TOTALES:**

Se estableció el valor del punto de corte menor o igual de **0.6** para el **cociente**

$$\frac{\text{Alb+A1M+IGGO}}{\text{PT EN ORINA}}$$

en base a los resultados obtenidos en estudios previos<sup>40, 75</sup>, el cual proporciona una sensibilidad del 100% (intervalo de confianza de 100-100).

Se ha hecho una valoración de lo que sucedería si se considera el valor del punto de corte menor o igual de **0.5**, obteniéndose en este caso una sensibilidad del 99% (intervalo de confianza de 96-100).

Si se hubiera aplicado el punto de corte  $\leq 0.5$ , sólo 3 muestras del grupo de Picos Orina Sí (92 muestras en total) se habrían quedado sin diagnosticar. Las características particulares de estas muestras se resumen a continuación:

- Todas la muestras presentaban un pico monoclonal en orina de cadenas ligeras libres kappa.
- La concentración de cadenas ligeras libres kappa en cada una de las tres muestras fue de 32, 115 y 277 mg/L, respectivamente (rango de referencia normal:  $< 10$  mg/L).
- Las muestras con concentraciones de 32 y 277 mg/L de kappa libre pertenecían a pacientes diagnosticados previamente de pico monoclonal en orina por su inclusión en el protocolo, y cuyos valores del cociente previos fueron siempre menores de 0.5. Cuando se analizaron estas muestras ya habían recibido tratamiento para la gammapatía monoclonal.
- La muestra con concentración de 115 mg/L de kappa libre pertenecía a un paciente que ya estaba diagnosticado de pico monoclonal en suero antes de incluirse en nuestro protocolo. Este paciente sería el único que se habría quedado sin diagnóstico de pico M en orina si se hubiera aplicado el punto de corte  $\leq 0.5$ .

Al aplicar el punto de corte  $\leq 0.6$  se han realizado 1068 determinaciones de cadenas ligeras anuales. Si se hubiera aplicado el punto de corte  $\leq 0.5$  se habrían realizado 810 determinaciones anuales.

### **3. SELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE CORTE DEL COCIENTE KAPPA/LAMBDA EN ORINA:**

Se seleccionaron 33 muestras de orina que presentaron pico monoclonal (en 18 muestras era pico monoclonal tipo kappa y en 15 era tipo lambda) tras la realización de la electroforesis, y un número aproximado de muestras (35) que no presentaron pico monoclonal. Las 68 muestras de orina tenían una concentración de cadenas ligeras libres por encima del rango de referencia (10 mg/L).

Se buscó el punto de corte del cociente kappa/lambda de máxima sensibilidad diagnóstica en detrimento de la especificidad, como corresponde a cualquier procedimiento de screening.

En el caso de **picos kappa**, el punto de corte de **8** del cociente K/L presentó una sensibilidad del 100% (intervalo de confianza de 100-100) y una especificidad del 74% (intervalo de confianza de 60-89). El área bajo la curva ROC fue de 0,981.

Para los **picos lambda**, el punto de corte de **0,5** del cociente K/L presentó una sensibilidad del 100% (intervalo de confianza de 100-100) y una especificidad del 94% (intervalo de confianza de 86-100). El área bajo la curva ROC fue de 0,998.

Según esto, el **rango de referencia normal del cociente K/L** quedó establecido entre los valores de **0.5 – 8**. Estos puntos de corte han servido para seleccionar las muestras a las que se les tenía que hacer inmunosustracción durante el resto del estudio.

La **sensibilidad y especificidad global**, según los puntos de corte del cociente kappa/lambda en orina establecidos previamente, ha sido:

- La sensibilidad para el diagnóstico de *picos monoclonales Kappa en orina* con el punto de corte de 8 fue del 100% (intervalo de confianza de 100-100), y la especificidad fue del 71% (intervalo de confianza de 60-80). El área bajo la curva ROC fue de 0.98 (Fig. R 3).

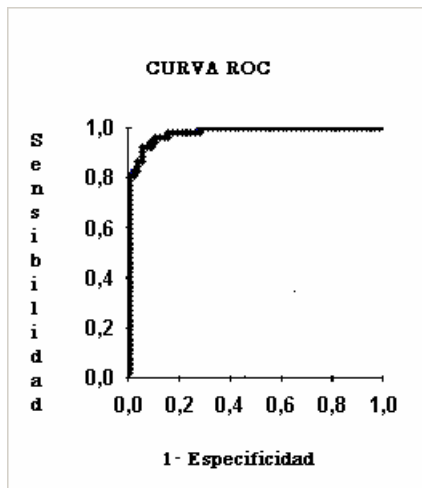


Figura R 3: Curva ROC picos Kappa.

- En el caso de *picos monoclonales Lambda en orina* el punto de corte de 0.5 ha conseguido una sensibilidad del 100% (intervalo de confianza de 100-100) y una especificidad del 83% (intervalo de confianza de 73-92). El área bajo la curva ROC ha sido de 0.99 (Fig. R 4).

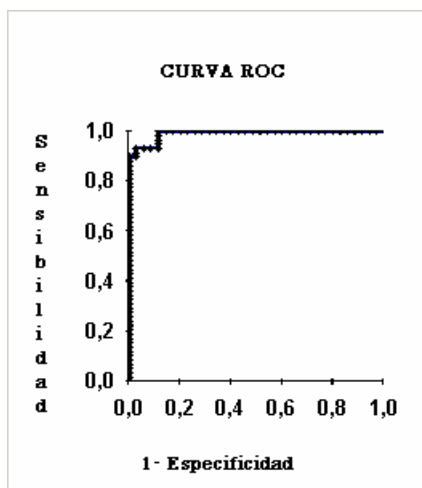


Figura R 4: Curva ROC picos Lambda

#### **4. COMPARACIÓN DE DOS PROCEDIMIENTOS DE CONCENTRACIÓN DE ORINA:**

Se ha hecho un estudio comparativo de dos procedimientos de concentración de orina que emplean sistemas de filtración diferentes: sistema Vivaspin 20 y sistema YM-30 Microcon.

Se estudiaron 23 pacientes tomados al azar cuyas orinas se concentraron antes de realizar la inmunosustracción por los dos sistemas de concentración antes mencionados. La descripción de los resultados es la siguiente:

**- 13 pacientes presentaban pico monoclonal en orina:**

\* 8 *pacientes* presentaban un *pico monoclonal en orina tipo kappa*. De ellos, 7 obtuvieron el mismo resultado de la inmunosustracción tras la concentración de la orina por los dos procedimientos; las concentraciones de cadenas ligeras libres oscilaron en un rango entre 145 y 7418 mg/g creatinina. 1 paciente presentó tras la inmunosustracción resultados diferentes: fue positivo cuando se concentró la orina por el sistema Vivaspin y negativo cuando se concentró con el sistema Microcon; la concentración de cadenas ligeras libres kappa en este paciente fue de 93 mg/g creatinina.

\* 5 *pacientes* presentaban un *pico monoclonal en orina tipo lambda*. De ellos, 4 obtuvieron el mismo resultado de la inmunosustracción tras la concentración de la orina por los dos procedimientos; las concentraciones de cadenas ligeras libres oscilaron en un rango entre 343 y 5750 mg/g creatinina. 1 paciente presentó tras la inmunosustracción resultados diferentes: fue negativo cuando se concentró la orina por el sistema Vivaspin y positivo cuando se concentró con el sistema Microcon; la concentración de cadenas ligeras libres lambda en este paciente fue de 958 mg/g creatinina.

**- 10 pacientes no presentaban pico monoclonal en orina:** todos obtuvieron el mismo resultado de la inmunosustracción tras la concentración de la orina por los dos procedimientos. Las concentraciones de la cadena ligera libre predominante oscilaron en un rango de 13 y 228 mg/g creatinina.

Para comparar los resultados obtenidos (tabla R 1) después de utilizar ambos sistemas de concentración de orina aplicamos el test estadístico de McNemar para muestras apareadas, siendo el resultado *no significativo* ( $p=1$ ), es decir, no hay evidencias de que un sistema de concentración produzca resultados diferentes, tras la inmunosustracción, al otro.

Al aplicar la medida de acuerdo Kappa de Cohen, que nos da una medida de concordancia de los 2 sistemas de concentración al clasificar a los pacientes, obtenemos el resultado de 0.826 con una  $p < 0.0005$ .

Las medidas de validez del sistema Microcon frente al sistema Vivaspin son las siguientes:

- Sensibilidad: 90.9%
- Especificidad: 91.7%
- Valor predictivo positivo: 90.9%
- Valor predictivo negativo: 91.7%

Estas medidas de validez son las mismas cuando se compara el sistema Vivaspin frente al sistema Microcon, puesto que, como vemos en la tabla R 1, los resultados netos de ambos sistemas han sido iguales.

**Tabla R1: Pacientes con Pico Sí o Pico No según el sistema de concentración de orina utilizado.**

	S. Vivaspin Picos Sí	S. Vivaspin Picos No	Total
S. Microcon Picos Sí	10	1	11
S. Microcon Pico No	1	11	12
Total	11	12	23

## 5. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA:

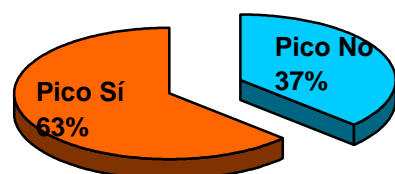
### 5.1 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN MUESTRAS DE ORINA:

En los 3 años que ha durado el estudio se han seleccionado por este protocolo 146 muestras de orina, correspondientes a 106 pacientes. Del total de muestras, 122 fueron incluidas desde el principio en el protocolo por presentar una concentración de proteínas totales superior a 300 mg/L; el resto (24 muestras) no se incluyeron desde el principio en el protocolo por presentar una concentración de proteínas totales inferior a 300 mg/L, o no estar cuantificadas; sin embargo más tarde se incluyeron por diferentes razones: 12 muestras tenían pedida la determinación de proteinuria de Bence Jones directamente por el clínico; 3 muestras pertenecían a pacientes ya diagnosticados previamente de proteinuria de Bence Jones, por lo que eran controles conocidos; el resto (9 muestras) tenían una concentración de proteínas en orina inferior a 300 mg/L, pero al tener pedida en la petición la cuantificación de creatinina en orina se vio que el cociente proteínas totales/creatinina era superior a 200 mg/g creatinina, y por ello fueron incluidas en el estudio.

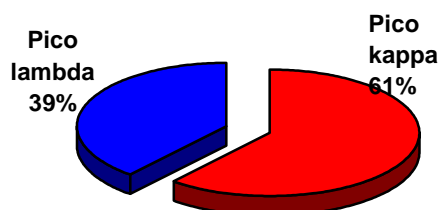
El resultado obtenido después de realizarles la electroforesis de orina ha sido el siguiente: 92 muestras (63%), correspondientes a 55 pacientes, presentaron pico monoclonal, y 54 muestras (37%), correspondientes a 51 pacientes, no lo presentaron.

De las muestras con pico monoclonal, 56 (61%) tenían pico Kappa, y 36 (39%) tenían pico Lambda (Fig. R 5).

**n = 146** (muestras totales)



**n = 92** (muestras con pico)



**Figura R 5: Detección de picos monoclonales.**

A la práctica totalidad de muestras de orina se les cuantificaron: proteínas totales, creatinina, albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina, inmunoglobulina G y cadenas ligeras libres kappa y lambda. Se intentó realizar electroforesis al suero correspondiente a cada muestra de orina, y si el proteinograma era patológico se hacía cuantificación de inmunoglobulinas G, A y M, y cadenas ligeras kappa y lambda totales. De las muestras de orina con resultado Pico Sí (92 muestras), sólo 9 no se acompañaban de muestra de suero al mismo tiempo, aunque se le pudo realizar el proteinograma en otro momento a 6, por lo que sólo tres muestras de orina correspondientes a tres pacientes no se acompañaron de proteinograma en el período de tiempo que duró el estudio. De las muestras de orina con resultado Pico No (58 muestras) 15 no se acompañaban de muestra de suero al mismo tiempo ni en otro momento del estudio.

Al ser las distribuciones de estos datos bastante asimétricas se representan los valores de las medianas, rangos y percentiles en las tablas R 2, R 3 y R 4. Observamos que al aplicar el test estadístico U de Mann-Whitney entre los parámetros urinarios de las muestras de orina que presentan pico monoclonal y las que no lo presentan existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en todos, excepto en el cociente IGGO/creatinina.

**Tabla R 2: Resultados de los parámetros urinarios en las muestras de orina.**

	PICOS ORINA SÍ		PICOS ORINA NO		NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
	Mediana (rango)	P.25 - P.75*	Mediana (rango)	P.25 - P.75*	
<b>Proteínas orina</b> (mg/L)	910 (76-11568)	392.7 - 1682.2	522.6 (47-2108)	310 - 700	P<0.001
<b>Proteínas/creatinina</b> (mg/g creatinina)	1159 (97.5-17165)	435.3 - 2607.5	327.6 (35.4-2748)	214.3 - 598.5	P<0.001
<b>Albúmina/creatinina</b> (mg/g creatinina)	68.8 (3.75-780.6)	23.8 - 163.7	29.6 (1.8-531.7)	10.5 - 90.5	P<0.01
<b>A1M/creatinina</b> (mg/g creatinina)	97.3 (10.1-574)	39.6 - 238.1	45 (2.8-1214.8)	20.8 - 98.7	P<0.001
<b>IGGO/creatinina</b> (mg/g creatinina)	9.4 (2.8-697)	5.7 - 17.8	8 (1.4-155.8)	5.7 - 14.9	n.s.**
<b><u>Alb+A1M+IGGO</u></b> <b>Proteínas</b>	0.2 (0.01-08)	0.09 - 0.3	0.3 (0.03-0.9)	0.25 - 0.5	P<0.001

Abreviaturas = Alb: Albúmina; AIM:  $\alpha$ 1-microglobulina; IGGO: Inmunoglobulina G en orina

\*Percentil 25 - Percentil 75

\*\*no significativo



**Tabla R 3: Resultados de la determinación de cadenas ligeras libres Kappa en orina.**

	PICOS ORINA KAPPA		PICOS ORINA NO		NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
	Mediana (rango)	P.25 - P.75*	Mediana (rango)	P.25 - P.75*	
<b>Kappa libre orina</b> (mg/L)	346 (19-6740)	129 - 1120	43.9 (2-265)	18.8 - 72.8	P<0.001
<b>Kappa/creatinina</b> (mg/g creatinina)	366.3 (33.1-21533.5)	175.2- 1736.1	30.4 (1.3-228.1)	13.4 – 54.9	P<0.001
<b>Kappa/Lambda</b>	59.7 (8.2-2950)	33.7 - 250.8	4.2 (0.06-25)	1.7 - 8.3	P<0.001

\*Percentil 25 – Percentil 75

**Tabla R 4: Resultados de la determinación de cadenas ligeras libres Lambda en orina.**

	PICOS ORINA LAMBDA		PICOS ORINA NO		NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
	Mediana (rango)	P.25 - P.75*	Mediana (rango)	P.25 - P.75*	
<b>Lambda libre orina</b> (mg/L)	795.5 (56.1-13380)	200 - 1355	8.75 (2-217)	4.9 -18.6	P<0.001
<b>Lambda/creatinina</b> (mg/g creatinina)	9603.7 (59.8-16979.7)		7.12 (0.7-151.6)	3.6 – 16.8	P<0.001
<b>Kappa/Lambda</b>	0.011 (0.0009-0.35)	0.0035 - 0.03	4.2 (0.06-25)	1.7 - 8.3	P<0.001

\*Percentil 25 – Percentil 75

## 5.2. SEXO Y EDAD DE LOS PACIENTES:

### 5.2.1. Distribución por sexo:

De los 106 pacientes a los que se les realizó la inmunosustracción de orina, 73 (69%) fueron hombres y 33 (31%) fueron mujeres.

Al estudiar la distribución de sexo según el resultado de la prueba de inmunosustracción, encontramos que en PICOS SÍ fueron 37 hombres (67%) y 18 mujeres (33%), y en PICOS NO fueron 36 hombres (71%) y 15 mujeres (29%). Al aplicarle la prueba estadística de Chi-cuadrado no se encontró diferencia significativa respecto al sexo entre PICOS SÍ y PICOS NO.

Al estudiar la distribución de sexo en PICOS SÍ, encontramos que en PICOS KAPPA eran 66% hombres y 34% mujeres, y en PICOS LAMBDA eran 70% hombres y 30% mujeres. Al aplicarle la prueba estadística de Chi-cuadrado tampoco se encontró diferencia significativa respecto al sexo entre los dos tipos de picos (Fig. R 6).

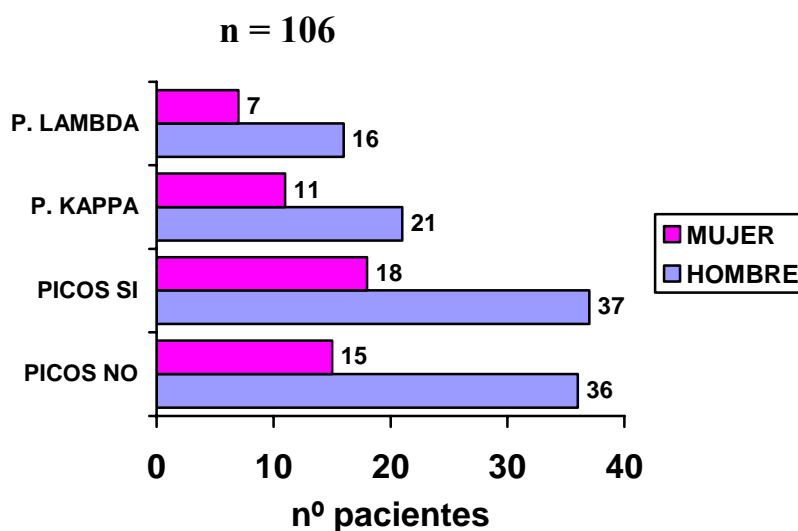


Figura R 6: Distribución de pacientes por sexo.

### 5.2.2. Distribución por edad:

El rango de edad de los pacientes osciló de la siguiente manera:

- PICOS ORINA NO: 16 – 92 años.
- PICOS ORINA SÍ: 44 – 87 años.
- PICOS ORINA KAPPA: 48 – 86 años.
- PICOS ORINA LAMBDA: 44 – 87 años.

Al no cumplir la distribución por edad las características de normalidad aplicamos el test estadístico U de Mann-Whitney, y observamos que al comparar PICOS SI y PICOS NO existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, al comparar PICOS KAPPA y PICOS LAMBDA observamos que no existe diferencia significativa. A continuación se representan los valores de las medianas, rangos y percentiles en las tablas R 5 y R 6, así como la distribución por edad de los pacientes en las figuras R 7 y R 8:

**Tabla R 5: Datos de la distribución por edad entre PICOS NO/PICOS SÍ.**

	PICOS NO	PICOS SÍ
<b>Mediana (rango) *</b>	62.5 <sup>***</sup> (16-92)	69.5 <sup>***</sup> (44-87)
<b>P.25 – P.75<sup>**</sup></b>	42 - 74	65 - 77
<b>Nº pacientes</b>	51	55

\* edad en años

\*\* Percentil 25-Percentil 75

\*\*\*  $p < 0.01$

**Tabla R 6: Datos de la distribución por edad entre PICOS KAPPA/PICOS LAMBDA.**

	PICOS KAPPA	PICOS LAMBDA
<b>Mediana (rango) *</b>	70 <sup>***</sup> (48-86)	69.5 <sup>***</sup> (44-87)
<b>P.25 – P.75<sup>**</sup></b>	64 - 77	65 - 78
<b>Nº pacientes</b>	32	23

\* edad en años

\*\* Percentil 25-Percentil 75

\*\*\* diferencia no significativa

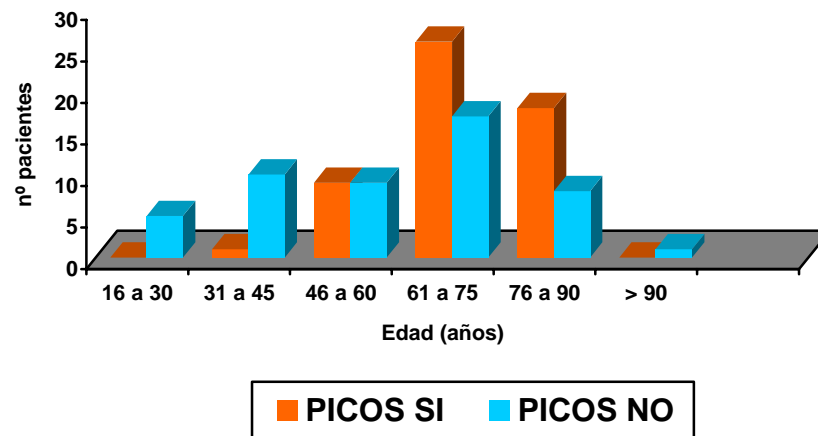


Figura R 7: Distribución de pacientes por edad en Picos No/Picos Sí.

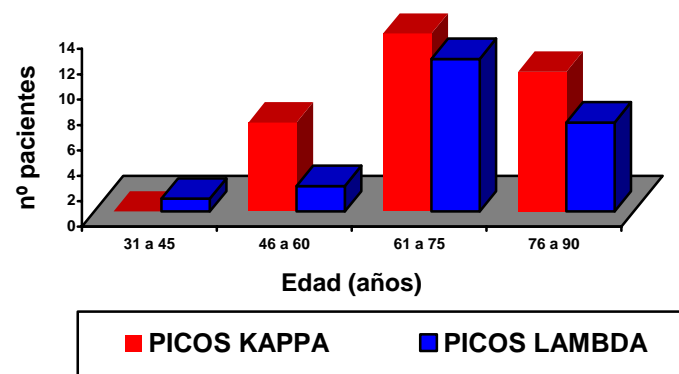


Figura R 8: Distribución de pacientes por edad en Picos Kappa/Picos Lambda

### 5.3. COMPONENTE MONOCLONAL EN SUERO:

De los 55 pacientes con pico en orina, el pico monoclonal fue tipo kappa en el 58% (32 pacientes) y tipo lambda en el 42% (23 pacientes). De estos pacientes con pico monoclonal en orina, 38 (69%) tenían pico en suero.

De los 51 pacientes que no presentaron pico monoclonal en orina, pero sí tenían el cociente K/L patológico, sólo 14 (27%) presentaron pico en suero.

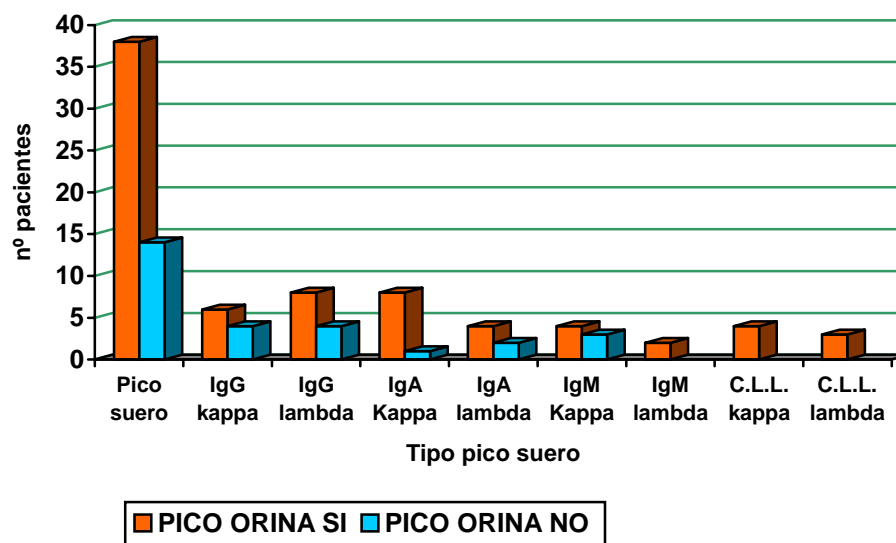
El 69% de pacientes (22 pacientes) con pico monoclonal en orina tipo kappa tenían a su vez pico monoclonal en suero; de ellos, 13 pacientes (59%) fueron diagnosticados primero de pico monoclonal en orina por el protocolo, y el diagnóstico de pico en suero fue posterior. Un 70% de pacientes (16 pacientes) que tenían pico monoclonal en orina tipo lambda presentaban al mismo tiempo pico monoclonal en suero; de ellos, 13 pacientes (81%) fueron diagnosticados primero de pico monoclonal en orina por el protocolo, y el diagnóstico de pico en suero fue posterior.

La distribución y la concentración de los componentes M en suero se representan en las tablas R 7 y R 8 y figura R 9:

**Tabla R 7: Distribución de picos monoclonales en suero.**

Pacientes	Picos suero	IgG		IgA		IgM		Cadenas ligeras libres	
		kappa	lambda	kappa	lambda	kappa	lambda	kappa	lambda
PICO ORINA SI n= 55	38	6*	8*	8	4	4	2	4	3
PICO ORINA NO n= 51	14	4	4	1	2	3			

\* Uno de los pacientes presentó dos picos monoclonales en suero, IgG kappa e IgG lambda.



**Figura R 9: Distribución de picos monoclonales en suero.**

Al ser la distribución de las concentraciones séricas de los componentes monoclonales asimétricas, se representan los valores de las medianas y rangos en la tabla R 8.

Observamos que al aplicar el test estadístico U de Mann-Whitney entre las concentraciones séricas de los componentes M correspondientes a los pacientes que presentan pico monoclonal en orina y los que no lo presentan no existe diferencia significativa. No se expresa el nivel de significación referido a cada tipo de componente M por ser el número de pacientes de cada grupo por separado muy pequeño.

**Tabla R 8: Concentración de componente M sérico.**

COMPONENTE M	PICO ORINA SI		PICO ORINA NO		NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
	Mediana (mg/dL)	Rango (mg/dL)	Mediana (mg/dL)	Rango (mg/dL)	
<b>IgG</b>	2430	1360-4950	1725	1060-2110	
<b>IgA</b>	1915	400-5330	950	604-3910	
<b>IgM</b>	1920	583-6330	702	655-761	
<b>CAD. LIGERAS KAPPA</b>	610	300-1840			
<b>CAD. LIGERAS LAMBDA</b>	490	465-537			
<b>TOTALES</b>	1860	300-6330	1350	604-3910	n.s.*

Abreviaturas = M: monoclonal; IgG: inmunoglobulina G; IgA: inmunoglobulina A; IgM: inmunoglobulina M; CAD: cadenas

\* no existe diferencia significativa al comparar la concentración de los componentes M séricos entre Picos orina Si y Picos orina No.

#### **5.4. CONCENTRACIONES MÍNIMAS DEL COMPONENTE M EN ORINA:**

##### **5.4.1. Picos Kappa:**

Se seleccionaron los 9 pacientes con concentraciones más bajas de kappa libre en orina. Se describen a continuación las características de los mismos, que quedan resumidas en la tabla R 9:

- El rango de concentración de kappa libre en orina osciló entre 19 mg/L y 82 mg/L. Cuando realizamos la corrección con la creatinina en orina (kappa/creatinina) la concentración osciló entre 33,1 y 211.7 mg/g creatinina.
- Según el resultado de las proteínas totales en orina sólo 2 pacientes (números 6 y 9) se hubiesen incluido en nuestro protocolo, pues el resto tenían una concentración menor de 300 mg/L. Se procesaron al haber sido pedida por el clínico la cuantificación de cadenas ligeras, o por ser un control conocido (nº 2).
- 5 pacientes presentaron un pico monoclonal claro en orina, mientras que 3 tenían un pico “dudoso”, es decir, la gráfica de la inmunosustracción era de difícil interpretación. Sólo un paciente (nº 2) no presentó pico monoclonal, ya que había recibido tratamiento de la gammapatía (en muestras anteriores sí presentó pico monoclonal en orina); el pico había desaparecido, pero el cociente K/L seguía siendo patológico.
- Todos los pacientes, excepto uno (nº 6), habían presentado pico monoclonal en suero. A dos pacientes (números 2 y 3) se les había negativizado tras tratamiento de la gammapatía cuando se les tomó estas muestras. El paciente número 9 presentó dos picos monoclonales en suero: IgG lambda e IgG kappa. Los pacientes con pico “dudoso” en orina presentaban una concentración del componente M en suero poco elevada.
- El rango de concentración de los componentes M en suero osciló entre 500 mg/dl y 1920 mg/dl.



**Tabla R 9: Concentraciones mínimas de Kappa en picos orina.**

Pacientes	Kappa orina (mg/L)	Proteínas orina (mg/L)	Kappa/creat (mg/g creat)	Pico orina	Pico suero	Componente M suero (mg/dl)
1º	19	120	33.1	Dudoso	IgM kappa	1500
2º	24.2	76	46.6	No*	No*	
3º	31.7	175	70.4	Sí	No*	
4º	37.1	250	100	Dudoso	IgM Kappa	1200
5º	57.5	150	93.2	Sí	IgA Kappa	1920
6º	67.5	707	211.7	Sí	No	
7º	70.8	147	46.9	Dudoso	IgG Kappa	700
8º	74.9	285	98	Sí	IgA Kappa	1500
9º	82.9	317	102.7	Sí	IgG Kappa e IgG lambda	700 500

Abreviaturas = M: monoclonal; IgG: inmunoglobulina G; IgA: inmunoglobulina A; IgM: inmunoglobulina M

\* Negativizado tras tratamiento

#### 5.4.2. Picos lambda:

Se seleccionaron los 9 pacientes con concentraciones más bajas de lambda libre en orina. Se describen a continuación las características de los mismos, que quedan resumidas en la tabla R 10:

- El rango de concentración de lambda libre en orina osciló entre 56.1 mg/L y 260.4 mg/L. Cuando realizamos la corrección con la creatinina en orina (lambda/creatinina) la concentración osciló entre 59.8 y 342.8 mg/g creatinina.
- Según el resultado de las proteínas totales en orina sólo un paciente (1º) no habría sido incluido en nuestro protocolo, pues en el resto su concentración fue superior a 300 mg/L.
- Todos los pacientes presentaron pico monoclonal en orina que no ofrecían dudas en su interpretación.

- 4 pacientes no se acompañaban de pico monoclonal en suero, ni en muestras anteriores o posteriores, con lo que el pico monoclonal sólo era manifiesto en orina.
- 5 pacientes sí presentaron pico monoclonal en suero, oscilando el rango de concentración del componente M entre 1390 mg/dl y 6100 mg/dl.

**Tabla R 10: Concentraciones mínimas de lambda en picos orina.**

Pacientes	Lambda orina (mg/L)	Proteínas orina (mg/L)	Lambda/creat (mg/g creat)	Pico orina	Pico suero	Componente M suero (mg/dl)
1°	56.1	233	59.8	Sí	IgA lambda	1650
2°	91.9	301	75.3	Sí	No	
3°	136	398	280.6	Sí	No	
4°	149.6	387	125.7	Sí	No	
5°	167.6	458	155	Sí	IgA lambda	3030
6°	180	962	342.9	Sí	IgG lambda	1990
7°	184	368	185.7	Sí	No	
8°	216	402	323.8	Sí	IgM lambda	6100
9°	260.4	650	121.4	Sí	IgG lambda	1390

Abreviaturas = M: monoclonal; IgG: inmunoglobulina G; IgA: inmunoglobulina A; IgM: inmunoglobulina M

### **5.5. PETICIONES DE PROTEINURIA DE BENCE JONES POR EL CLÍNICO:**

Durante el período de tiempo que ha durado el estudio han llegado al laboratorio 359 peticiones (correspondientes a 289 pacientes) para determinación de proteinuria de Bence Jones directamente pedidas por el clínico. Un total de 134 muestras de orina (37%) tuvieron un resultado de concentración de cadenas ligeras libres en orina superior al rango de normalidad establecido por la casa comercial (10mg/L), siendo de predominio kappa 92 muestras y de predominio lambda 42 muestras.

Concentraciones de kappa o lambda libres superiores a 10 mg/L y cociente kappa/lambda patológico ( $<0.5$  ó  $>8$ ) lo presentaron 48 muestras, que se correspondían con 31 pacientes.

Analizando estos 31 pacientes con cociente K/L patológico encontramos que se les realizó electroforesis a 21 pacientes (68%), los cuales están incluidos entre lo 106 pacientes que forman parte del estudio global.

Los **resultados de las electroforesis** fueron los siguientes:

- **8 pacientes** presentaron **pico monoclonal de cadenas ligeras libres kappa**, de los que: 5 estaban diagnosticados de pico monoclonal en orina por nuestro protocolo anterior a la petición de proteinuria de Bence Jones por el clínico; 3 pacientes se diagnosticaron al mismo tiempo por nuestro protocolo y por la petición del clínico. El rango de concentración de cadenas ligeras libres kappa osciló entre 57.5 y 9840 mg/L.
- **8 pacientes** presentaron **pico monoclonal de cadenas ligeras libres lambda**, de los que: 4 estaban diagnosticados de pico monoclonal en orina por nuestro protocolo anterior a la petición de proteinuria de Bence Jones por el clínico; 1 paciente se diagnosticó al mismo tiempo por nuestro protocolo y por la petición del clínico; y 3 pacientes no se incluyeron en nuestro protocolo, uno por presentar unas proteínas en orina de 233 mg/L ( $< 300$  mg/L), y 2 por no tener hecha la determinación de proteínas en orina. De estos 3 últimos pacientes, el primero

presentó una concentración de proteínas totales en orina por encima de 300 mg/L a los 6 meses posteriores a la primera petición; y la orina de los otros 2 pacientes, cuando les cuantificamos las proteínas totales también las tenían por encima de 300 mg/L. El rango de cadenas ligeras libres lambda osciló entre 104 y 2960 mg/L.

- **3 pacientes no presentaron pico monoclonal** en orina. Todos tenían proteínas en orina inferior a 300 mg/L, por lo que no hubieran sido incluidos en nuestro protocolo.
- **2 pacientes** presentaron un “**resultado dudoso**”, es decir, la gráfica de la electroforesis era de difícil interpretación. Ambos tenían unas proteínas en orina inferiores a 300 mg/L, por lo que no hubieran sido incluidos en nuestro protocolo. Estos 2 pacientes forman parte de los 3 que tenían pico monoclonal kappa con resultado dudoso mencionados en el apartado de concentraciones mínimas del componente M en orina.

Todos estos pacientes presentaban pico monoclonal en suero, excepto uno de los pacientes con pico en orina tipo lambda. La distribución de los picos monoclonales en suero se muestra en la tabla R 11:

**Tabla R 11: Peticiones de Proteinuria de Bence Jones por el clínico. Distribución de picos monoclonales en suero.**

Pacientes	Picos suero	IgG		IgA		IgM		Cadenas ligeras libres	
		kappa	lambda	kappa	lambda	kappa	lambda	kappa	lambda
PICO ORINA KAPPA n= 8	8	1		4				3	
PICO ORINA LAMBDA n= 8	7		2		2				3
PICO ORIN NO n= 3	3		1		1	1			
RESULTADO DUDOSO n= 2	2	1				1			

Abreviaturas = IgG: inmunoglobulina G; IgA: inmunoglobulina A; IgM: inmunoglobulina M

A 10 pacientes con cociente kappa/lambda patológico y concentración de cadenas ligeras libres kappa o lambda en orina superior a 10 mg/L, no se les realizó inmunosustracción por muestra de orina insuficiente. De éstos, 9 pacientes tenían el

cociente kappa/lambda a favor de kappa, y el rango de concentración de cadenas ligeras libres kappa osciló entre 16,8 y 117 mg/L. Tan sólo había un paciente con cociente kappa/lambda patológico a favor de lambda, cuya concentración de cadenas ligeras libres lambda fue de 131 mg/L. Hemos analizado las concentraciones de cadenas ligeras libres kappa de los 9 pacientes, comparándolas con las concentraciones de los pacientes con Picos orina No y Picos orina Sí tipo kappa del estudio. Para ello hemos aplicado el test estadístico U de Mann-Whitney, obteniendo diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) al comparar las concentraciones de los 9 pacientes con las de Picos orina Sí. Cuando comparamos con las de Picos orina No, no existe diferencia significativa. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla R 12.

**Tabla R 12: Peticiones de Proteinuria de Bence Jones por el clínico con cociente K/L patológico sin IFE/s. Estudio de la concentración de cadenas ligeras libres kappa en orina.**

	n° pacientes	Kappa libre (mg/L) mediana	Kappa libre (mg/L) P.25 – P.75	Nivel de significación
<b>K/L patológico sin IFE/s</b>	9	23	20.1 – 79.9	
<b>Picos orina No de todo el estudio</b>	51	43.95	18.8 – 72.8	n.s.*
<b>Picos orina Sí tipo kappa de todo el estudio</b>	56	400	150.3 – 1140	$p < 0.001^{**}$

\* no existe diferencia significativa al comparar la concentración de cadenas ligeras libres Kappa de las muestras a las que no se les realizó IFE/s con la de los Picos orina No totales.

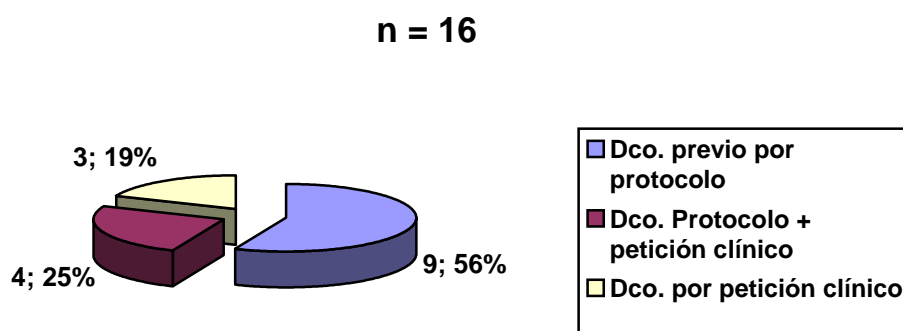
\*\* existe diferencia significativa al comparar la concentración de cadenas ligeras libres Kappa de las muestras a las que no se les realizó IFE/s con la de los Picos orina Sí totales.

Abreviaturas = P.25-P.75: Percentil 25-Percentil 75; K/L: kappa/lambda; IFE/s: inmunosustracción

Con estos resultados, vemos que de los 289 pacientes a los que el clínico les pidió la determinación de proteinuria de Bence-Jones, resultaron **16 pacientes (5.5%) con pico monoclonal en orina** (Fig. R 10), de los cuales:

- 9 pacientes (56 %) ya habían sido diagnosticados previamente por nuestro protocolo y pidieron estudio de proteinuria de Bence Jones como control.

- 4 pacientes (25%) fueron diagnosticados con la misma muestra de orina, a la vez, por la petición del clínico y por la inclusión en el protocolo.
- 3 pacientes (19%) fueron diagnosticados por la petición del clínico. No entraban en nuestro protocolo, 1 por presentar una concentración de proteínas totales en orina inferior a 300 mg/L, y el resto porque no le pedían proteínas totales en orina y se les determinó las cadenas ligeras libres directamente. Dos pacientes estaban diagnosticados de pico monoclonal en suero y uno no.



**Figura R 10: Distribución de diagnósticos por protocolo y clínico.**

Al ser las concentraciones de cadenas ligeras libres en orina en estos 16 pacientes muy asimétricas se representan las medianas en la tabla R 13.

**Tabla R 13: Peticiones de Proteinuria de Bence Jones por el clínico. Concentración de cadenas ligeras libres en orina en pacientes con pico monoclonal según las diferentes formas de diagnóstico.**

	PICOS KAPPA		PICOS LAMBDA	
	nº pacientes	Concentración CLL kappa (mg/L) mediana (rango)	nº pacientes	Concentración CLL lambda (mg/L) mediana (rango)
<b>Dco. previo por protocolo</b>	5	6740 (78 – 9840)	4	1840 (952 – 2960)
<b>Dco. protocolo + petición clínico</b>	3	142 (57 – 338)	1	180
<b>Dco. por petición clínico</b>			3	495 (122 – 665)

Abreviaturas = CLL: cadenas ligeras libres; Dco: Diagnóstico

## **5.6. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PROTOCOLO:**

El **78% de los pacientes** (43) con pico monoclonal en orina fue diagnosticado de posible gammapatía monoclonal por primera vez por nuestro protocolo, es decir, fueron **NUEVOS DIAGNÓSTICOS**. Sólo el 22% (12) tenían un diagnóstico previo de pico monoclonal en suero.

La distribución de diagnósticos nuevos por año fue la siguiente:

- 2002 (a partir del mes de Mayo): 10 casos nuevos
- 2003: 19 casos nuevos
- 2004: 13 casos nuevos
- 2005 (hasta el mes de Abril): 1 caso nuevo

Esto nos da una media de diagnóstico de pico monoclonal en orina de 14 casos nuevos por año durante los 3 años que ha durado nuestro estudio. Antes de implantar este protocolo de proteinuria los picos monoclonales en orina se detectaban cuando el clínico hacía la petición de proteinuria de Bence Jones directamente, presentando una media de diagnóstico de 5 casos nuevos por año.

De los 32 pacientes con pico monoclonal en orina tipo kappa, 23 (72%) se diagnosticaron de gammapatía monoclonal por primera vez al incluirlos en nuestro protocolo; el resto (9 pacientes) tenían diagnosticado pico monoclonal en suero previamente.

Respecto a los 23 pacientes con pico monoclonal en orina tipo lambda, 20 (87%) se diagnosticaron de gammapatía monoclonal por primera vez al incluirlos en nuestro protocolo; sólo 3 pacientes tenían diagnosticado pico monoclonal en suero previamente (tabla R 14).

**Tabla R 14: Rendimiento diagnóstico del protocolo.**

	<b>NUEVOS DIAGNÓSTICOS a partir de protocolo</b>	<b>Componente M en suero anterior a protocolo</b>
<b>Picos orina n = 55</b>	43 (78%)	12 (22%)
<b>Picos Kappa n = 32</b>	23 (72%)	9 (28%)
<b>Picos Lambda n = 23</b>	20 (87%)	3 (13%)

De los 51 pacientes que no presentaron pico monoclonal en orina, 14 (27%) tenían pico monoclonal en suero, siendo la clase de cadena ligera en 8 pacientes tipo kappa y en 6 pacientes tipo lambda. De estos 14 pacientes, en el 53% el diagnóstico de pico monoclonal en suero fue anterior al estudio de orina por inmunosustracción; en el resto (47%) se estudió la orina y el suero al mismo tiempo, es decir, no tenían diagnóstico de pico monoclonal en suero previo.



## 5.7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

### 5.7.1. PACIENTES CON PROTEINURIA DE BENICE JONES (PBJ):

Durante los 3 años que ha durado el estudio se ha hecho un seguimiento de los pacientes a los que diagnosticamos PBJ para saber el diagnóstico clínico de los mismos y su evolución. De los 55 pacientes con pico monoclonal en orina nos encontramos (tabla R 15) con que 22 pacientes tenían diagnóstico de MM. En el 64 % el componente M fue detectado por primera vez por nuestro protocolo, es decir, no tenían ninguna analítica anterior, tanto en suero como en orina, que indicara la presencia de un componente M; 2 pacientes tenían diagnóstico de gammapatía monoclonal tipo “smoldering”, de los que sólo en uno fue detectado el componente M por primera vez por nuestro protocolo; 25 pacientes tenían diagnóstico de MGUS, siendo detectado el componente M por nuestro protocolo por primera vez en el 96%; 6 pacientes presentaban otras enfermedades linfoproliferativas, detectándose el componente M por primera vez por nuestro protocolo en el 67%.

**Tabla R 15: Diagnóstico clínico de los pacientes con proteinuria de Bence Jones.**

Diagnóstico	Nº pacientes	Media de edad (rango)	1ª Detección de componente M por protocolo (%)
Mieloma múltiple	22	69 (58-79)	14 (64%)
Gammapatía monoclonal “smoldering”	2	74.5 (71-78)	1 (50%)
Gammapatía monoclonal de significado incierto	25	70 (48-87)	24 (96%)
Otras enfermedades linfoproliferativas	6	71 (63-86)	4 (67%)

A continuación se hace una descripción más detallada del tipo de gammapatía monoclonal de los pacientes, así como de los signos clínicos que presentaban más relevantes (criterios diagnósticos y pronósticos) (tablas R 16 y R 17), y su evolución hasta el término del estudio:

- MIELOMA MÚLTIPLE: 22 pacientes. Todos estos pacientes presentaban varios criterios diagnósticos de MM y síntomas clínicos característicos del mismo. El rango de edad osciló entre 58 y 79 años, con una media de 69 años. El tipo de MM se distribuye como sigue:
  - Bence Jones Kappa: 6 pacientes. Todos se diagnosticaron después de ser detectada la PBJ por nuestro protocolo. La excreción urinaria de cadenas ligeras libres kappa fue  $> 1000$  mg/g de creatinina en todos los pacientes, en ausencia de amiloidosis. Todos los pacientes, excepto uno, presentaron en la biopsia de médula ósea una plasmocitosis medular  $> 30\%$ . Aparecía disminución de las inmunoglobulinas plasmáticas en todos los pacientes, y 3 tenían lesiones osteolíticas. Todos los pacientes tenían aumento de la VSG, y sólo 4 presentaban una concentración de creatinina en suero superior a 2 mg/dL. Al término del estudio 2 pacientes estaban en fase de remisión del mieloma tras tratamiento con quimioterapia, 3 estaban en tratamiento con quimioterapia en ese momento y 1 paciente había fallecido.
  - Bence Jones Lambda: 4 pacientes. Todos se diagnosticaron después de ser detectada la PBJ por nuestro protocolo. La excreción urinaria de cadenas ligeras libres lambda fue  $> 1000$  mg/g de creatinina en todos los pacientes, excepto en uno, en ausencia de amiloidosis. Sólo 2 pacientes presentaron plasmocitosis medular  $> 30\%$  en el estudio de médula ósea. Todos tenían disminuidas las inmunoglobulinas plasmáticas, con aumento de la VSG, y ninguno presentaba una concentración de creatinina en suero superior a 2 mg/dL. Sólo uno presentó lesiones osteolíticas. Al término del estudio 2 pacientes habían fallecido y 2 estaban en fase de remisión del mieloma tras tratamiento con quimioterapia.

- IgG Kappa: 2 pacientes. 1 se diagnosticó después de ser detectada la PBJ por nuestro protocolo, y el segundo, cuando se incluyó en nuestro protocolo ya estaba diagnosticado de componente M en suero. La excreción urinaria de cadenas ligeras libres kappa era  $< 1000$  mg/g de creatinina en los dos casos. El primero, al cierre de nuestro estudio aún no tenía hecho estudio de médula ósea, pero ya cumplía criterios de MM, pues tenía una concentración en suero de IgG superior a 3.5 g/dL y disminuidas las inmunoglobulinas policlonales (criterios diagnósticos III+d). El segundo, en el estudio de médula ósea presentaba una plasmocitosis medular del 20 %, su concentración de IgG monoclonal en suero era  $> 3.5$ g/dL, las inmunoglobulinas plasmáticas policlonales estaban disminuidas y presentaba signos de insuficiencia renal. Ambos tenían aumento de la VSG, pero no presentaban lesiones osteolíticas. Al término del estudio estaban en seguimiento por el Servicio de Hematología, habiendo recibido el segundo paciente tratamiento con quimioterapia.
- IgG Lambda: 2 pacientes. 1 paciente se diagnosticó después de ser detectada la PBJ por nuestro protocolo y el segundo estaba ya diagnosticado de componente M en suero. Los 2 pacientes tenían una excreción urinaria de cadenas ligeras libres lambda  $> 1000$  mg/g de creatinina, en ausencia de amiloidosis. En el estudio de médula ósea presentaron una plasmocitosis medular del 20% y 21 %, respectivamente. Ambos presentaban disminución de las inmunoglobulinas plasmáticas policlonales y aumento de la VSG. Sólo uno presentaba una concentración de creatinina en suero superior a 2 mg/dL y lesiones osteolíticas. Al término del estudio un paciente estaba en tratamiento con quimioterapia (el que fue detectada la PBJ por nuestro protocolo) y otro había fallecido.
- IgA Kappa: 5 pacientes. Todos habían sido diagnosticados de componente M en suero con anterioridad a su inclusión en nuestro protocolo. Sólo un paciente presentó una excreción urinaria de cadenas ligeras libres kappa  $> 1000$  mg/g de creatinina, en ausencia de

amiloidosis. La concentración de IgA monoclonal en suero fue  $> 2\text{g/dL}$  en 2 pacientes. 2 pacientes tenían una plasmocitosis medular  $< 30\%$  (15% y 28%, respectivamente), y en el resto era superior al 30%. Todos los pacientes presentaban disminución de las inmunoglobulinas plasmáticas policlonales. Todos tenían aumentada la VSG, y sólo 1 tenía una concentración de creatinina en suero superior a  $2\text{ mg/dL}$ . 3 pacientes presentaban lesiones osteolíticas. 1 paciente presentaba un plasmocitoma en mandíbula, demostrado por biopsia. Otro paciente fue diagnosticado en el año 2003 de gammapatía monoclonal tipo “smoldering” (el que presentó una plasmocitosis medular del 15%) evolucionando a mieloma múltiple al año siguiente. Al término del estudio, éste último junto con 2 pacientes más, seguían tratamiento por el Servicio de Hematología, y 2 pacientes habían fallecido.

- IgA Lambda: 3 pacientes. 2 pacientes se diagnosticaron después de ser detectada la PBJ por nuestro protocolo; sólo uno estaba diagnosticado de componente M en suero con anterioridad. En un paciente la excreción urinaria de cadenas ligeras libres lambda fue  $> 1000\text{ mg/g creatinina}$ , en ausencia de amiloidosis, y su concentración de IgA monoclonal sérica era  $< 2\text{g/dL}$ ; los 2 pacientes restantes tenían una concentración de IgA monoclonal sérica  $> 2\text{g/dL}$ . Sólo 1 paciente presentó en el estudio de médula ósea una plasmocitosis medular  $> 30\%$ , y 2 presentaron lesiones osteolíticas. Ningún paciente tenía una concentración de creatinina en suero superior a  $2\text{ mg/dL}$ . Todos tenían disminuidas las inmunoglobulinas plasmáticas policlonales y aumentada la VSG. Al término del estudio los 3 pacientes estaban recibiendo tratamiento por el Servicio de Hematología.
- GAMMAPATÍA MONOCLONAL “SMOLDERING”: 2 pacientes. Ninguno presentaba síntomas clínicos de MM. El componente M en suero fue tipo IgA Kappa (concentración de IgA:  $1910\text{ mg/dL}$ ) en uno e IgG Lambda (concentración de IgG:  $1990\text{ mg/dL}$ ) en otro. El primero fue diagnosticado después de ser detectada la PBJ por nuestro protocolo y el segundo ya estaba diagnosticado de componente M en suero. La excreción urinaria de cadenas

ligeras libres fue  $< 1000$  mg/g creatinina en ambos pacientes. En el estudio de médula ósea presentaban una plasmocitosis medular  $< 10\%$ . Ambos tenían aumentada la VSG, y sólo el 2º tenía disminución de las inmunoglobulinas policlonales en suero. La edad era de 78 años el primero y 71 el segundo. Al término del estudio estaban clínica y analíticamente estables, siendo controlados periódicamente por el servicio de Hematología.

- GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO:

- *PBJ >1000 mg/g creatinina:* 5 pacientes. En todos los pacientes lo primero que se detectó fue la PBJ. Ninguno presentaba amiloidosis. Las cadenas ligeras libres en orina fueron tipo kappa en 2 pacientes y tipo lambda en 3 pacientes. 4 pacientes se acompañaban de componente M en suero. Las inmunoglobulinas policlonales séricas estaban disminuidas en 3 pacientes, y 1 tenía aumentada la VSG. Ninguno presentaba síntomas clínicos relacionados con mieloma. El rango de edad osciló entre 64 y 82 años, con una media de 75 años. Al término del estudio 2 pacientes habían fallecido por causas no relacionadas con la gammapatía monoclonal. Los 3 pacientes restantes estaban siendo controlados periódicamente, 2 pacientes por su médico de cabecera y 1 paciente por el Servicio de Hematología. Ninguno presentó evolución ascendente del componente monoclonal durante el período de tiempo del estudio.
- *PBJ <1000 mg/g creatinina:* 20 pacientes. En todos los pacientes lo primero que se detectó fue la PBJ, excepto uno, que tenía un diagnóstico previo de componente M en suero. Ninguno presentaba amiloidosis. Las cadenas ligeras libres en orina fueron tipo kappa en 11 pacientes y tipo lambda en 9 pacientes. 10 pacientes se acompañaban de componente M en suero. 1 paciente presentaba dos tipos de componente M (IgG Kappa e IgG lambda). 9 pacientes tenían aumentada la VSG; sólo 1 paciente tenía disminuidas las inmunoglobulinas policlonales séricas, y también sólo 2 presentaban una concentración de creatinina en suero superior a 2 mg/dL. Ninguno presentaba síntomas clínicos relacionados con mieloma. A 6 pacientes se les había realizado estudio de médula ósea,

siendo el resultado normal. El rango de edad osciló entre 44 y 87 años, con una media de 68 años. Al término del estudio 2 pacientes habían fallecido por causas no relacionadas con la gammopatía monoclonal; 6 pacientes estaban siendo controlados periódicamente por el servicio de Hematología; el resto eran controlados por su médico de cabecera o servicios médicos distintos al de Hematología. Ninguno presentó evolución ascendente del componente monoclonal durante el período de tiempo del estudio.

- OTRAS ENFERMEDADES LINFOPROLIFERATIVAS: 6 pacientes. Estos pacientes presentaban una patología hematológica diferente a MM: Macroglobulinemia de Waldenström (2 pacientes), leucemia linfocítica crónica tipo B (3 pacientes), leucemia aguda mieloblástica (1 paciente). A 4 pacientes se les diagnosticó el componente M en orina por el protocolo antes de tener el diagnóstico de su enfermedad hematológica. Sólo 2 pacientes presentaban signos de insuficiencia renal. El rango de edad osciló entre 63 y 86 años, con una media de 71 años. Al término del estudio 2 pacientes habían fallecido; el resto recibían tratamiento por el Servicio de Hematología.

**Tabla R 16: Distribución de cadenas ligeras libres según diagnóstico clínico.**

Diagnóstico clínico	Nº total pacientes	Isotipo cadenas ligeras libres			
		Kappa		Lambda	
		nº pacientes	Cociente K/L(media)na)	nº pacientes	Cociente K/L(media)na)
<b>Mieloma múltiple</b>	22	13	(115.9)*	9	(0.0084)**
<b>GM “smoldering”</b>	2	1	(42.8)	1	(0.011)
<b>MGUS</b>	25	13	(46.4)*	12	(0.0121)**
<b>Otras ELF</b>	6	5	(18.9)	1	(0.029)

Abreviaturas = GM: gammopatía monoclonal; MGUS: gammopatía monoclonal de significado incierto; ELF: enfermedades linfoproliferativas.

\* p <0.05. Existe diferencia significativa entre los cocientes K/L de los pacientes con MM y con MGUS que excretan cadenas ligeras libres kappa.

\*\* n.s. No existe diferencia significativa entre los cocientes K/L de los pacientes con MM y con MGUS que excretan cadenas ligeras libres lambda.

Tabla R 17: Pacientes con criterios diagnósticos y pronósticos desfavorables.

Diagnóstico clínico	PBJ >1000 mg/g crea	Creatinina sérica >2mg/dL	Albúmina sérica <3.5 g/dL	$\beta$ 2-microglobulina >3.5 mg/L	Disminución Igs policlonales	Aumento VSG	Presencia osteólisis
Mieloma Múltiple n = 22	13	5	11	9	22	19	10
GM “smoldering” n = 2	0	0	0	0	1	2	0
MGUS n = 25	5	1	10	0	4	11	0
Otras ELF n = 6	6	1	3	0	2	4	0

Abreviaturas = PBJ: proteinuria de Bence Jones; crea: creatinina; GM: gammapatía monoclonal; MGUS: gammapatía monoclonal de significado incierto; ELF: enfermedades linfoproliferativas; Igs: inmunoglobulinas; VSG: velocidad de sedimentación globular.

### 5.7.2. PACIENTES CON COMPONENTE M EN SUERO SIN PBJ:

De los 14 pacientes con componente M en suero sin PBJ, sólo a 7 se les ha hecho estudio de médula ósea. El diagnóstico clínico que presentaron fue el siguiente:

- MIELOMA MÚLTIPLE: 1 paciente (83 años). Estaba ya diagnosticado cuando se incluyó en nuestro protocolo. En el estudio de médula ósea presentaba una plasmocitosis medular del 69 %. Así mismo, presentaba lesiones osteolíticas, sin signos de insuficiencia renal. Al término del estudio estaba recibiendo tratamiento por el Servicio de Hematología.
- GAMMAPATÍA MONOCLONAL “SMOLDERING”: 1 paciente (70 años). Cuando se incluyó en nuestro protocolo (año 2003) fue diagnosticado de MGUS, evolucionando a gammapatía monoclonal “smoldering” en el año 2005. En el estudio de médula ósea presentaba una plasmocitosis medular del 5%. Tenía disminuida la concentración de inmunoglobulinas policlonales séricas. No presentaba signos de insuficiencia renal ni osteólisis. Al término del estudio estaba siendo revisado periódicamente en el Servicio de Hematología.

- GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO: 12 pacientes. A 6 de ellos se les realizó estudio de médula ósea, presentando 3 pacientes una plasmocitosis medular < 5%, y ausencia de plasmocitosis medular el resto. 6 pacientes tenían aumentada la VSG y 2 tenían signos de insuficiencia renal. Al término del estudio 1 paciente había fallecido por patología cardíaca; el resto de los pacientes se mantenían estables, sin aumentar el componente M en suero. El rango de edad osciló entre 27 y 86 años.



## 5.8. PATOLOGIA RENAL SEGÚN MARCADORES PROTEICOS:

Como sabemos, el estudio de proteinuria nos permite clasificar las proteinurias en glomerulares, tubulares o mixtas. A continuación se hace una descripción de las concentraciones de las distintas proteínas en orina encontradas en nuestros pacientes, así como de la creatinina en suero que presentaban. Los rangos normales de referencia que se aplican en nuestro laboratorio son los siguientes:

- creatinina en suero: 0.6-1.3 mg/dL
- albúmina/creatinina (en orina): 0-20 mg/g creatinina en orina
- IgG/creatinina (en orina): 0-10 mg/g creatinina en orina
- $\alpha$ 1-microglobulina/creatinina (en orina): 0-14 mg/g creatinina en orina

**5.8.1. Pacientes con MM y creatinina en suero no patológica (fig. R 11 y tabla R 18):** Fueron 13 pacientes. 10 pacientes presentaban una proteinuria mixta, siendo la proteinuria glomerular de tipo “no selectiva” en 2 y “selectiva” en el resto. 2 pacientes presentaban sólo proteinuria tubular. Además, había 1 paciente que presentaba una excreción aumentada de  $\alpha$ 1-microglobulina y de IgG, pero no de albúmina (estaba diagnosticado de MM IgG Lambda).

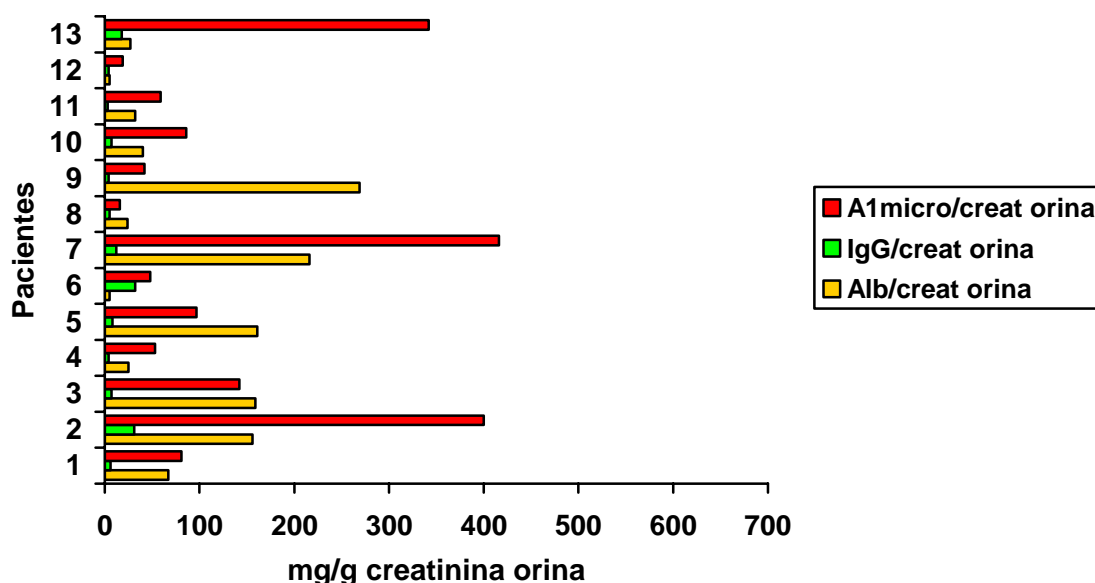


Figura R 11: Pacientes con MM y creatinina en suero no patológica.

### 5.8.2. Pacientes con MM y creatinina en suero patológica (fig. R 12 y tabla R 18):

Fueron 9 pacientes. Todos presentaban niveles patológicos en orina de albúmina/creatinina y  $\alpha$ 1-microglobulina/creatinina, por lo que la proteinuria era mixta (glomerular y tubular). En cuanto al tipo de proteinuria glomerular, vimos que en 3 pacientes era de tipo “no selectiva” claramente, en otros 3 la excreción urinaria de IgG estaba ligeramente aumentada y en 3 era normal, por lo que era de tipo “selectiva”.

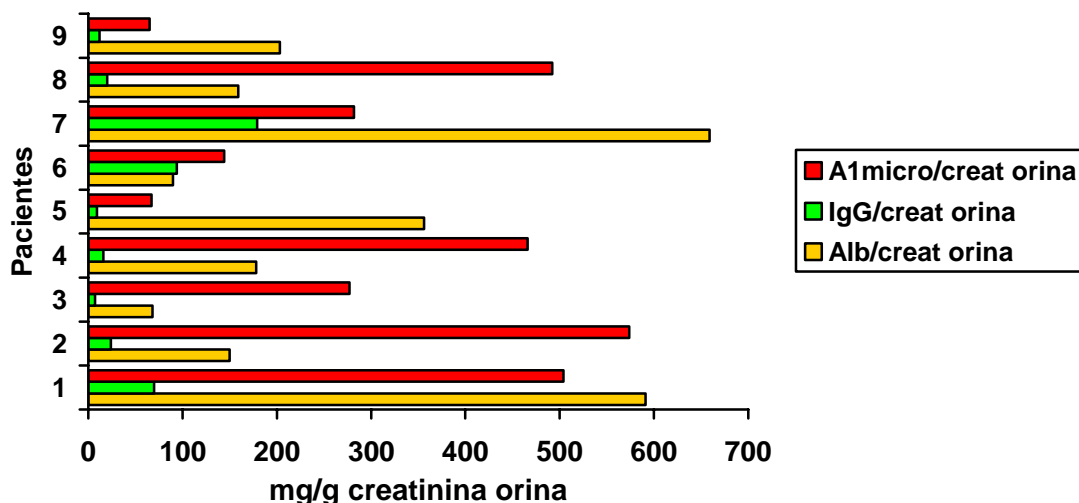


Figura R 12: Pacientes con MM y creatinina en suero patológica.

### 5.8.3. Pacientes con GM “smoldering” (fig. R 13 y tablas R 18-19):

Fueron 2 pacientes. Los 2 tenían una concentración de creatinina en suero normal, presentando sólo una excreción aumentada de albúmina y de  $\alpha$ 1-microglobulina, por lo que la proteinuria era mixta, siendo la glomerular tipo “selectiva”.

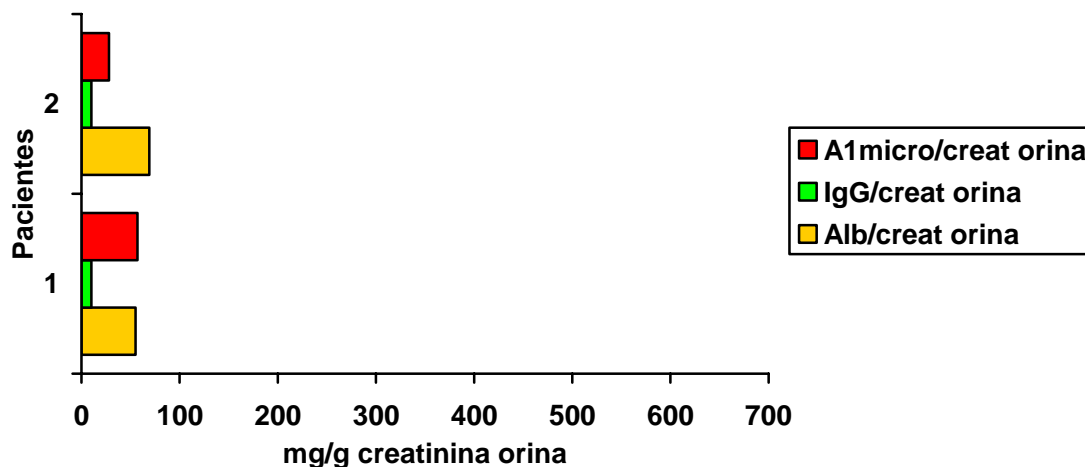
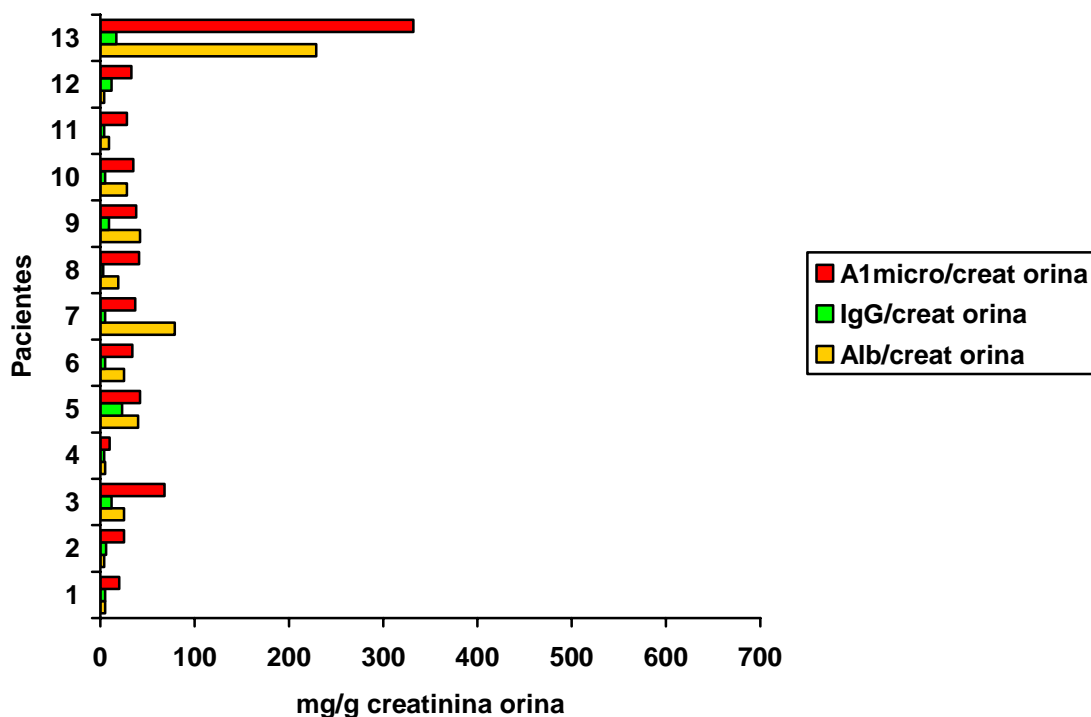


Figura R 13: Pacientes con GM “smoldering” y creatinina en suero no patológica.

**5.8.4. Pacientes con MGUS, PBJ < 1000 mg/g creatinina y creatinina en suero no patológica** (fig. R 14 y tabla R 18): Fueron 13 pacientes. De ellos, 8 presentaban una proteinuria mixta, siendo la glomerular de tipo “no selectiva” en 2 pacientes y “selectiva” en 6 pacientes; la excreción de proteínas en estos pacientes no era muy abundante, excepto en dos. 4 pacientes presentaban una proteinuria sólo tubular y 1 paciente no tenía aumentada la excreción de ninguna de las proteínas específicas.



**Figura R 14: Pacientes con MGUS, PBJ < 1000 mg/g creatinina y creatinina en suero no patológica.**

**5.8.5. Pacientes con MGUS, PBJ < 1000 mg/g creatinina y creatinina en suero patológica** (fig. R 15 y tabla R 19): Fueron 7 pacientes. Todos presentaban una proteinuria mixta, siendo la glomerular de tipo “no selectiva” en un paciente, y de tipo “selectiva” en el resto.

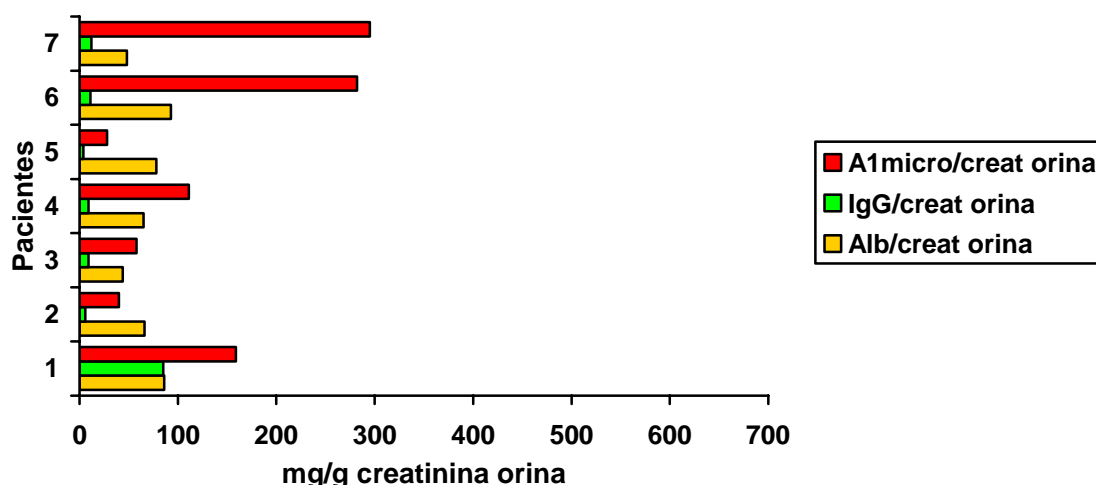


Figura R 15: Pacientes con MGUS, PBJ < 1000 mg/g creatinina y creatinina en suero patológica.

#### 5.8.6. Pacientes con MGUS y PBJ > 1000 mg/g creatinina (fig. R 16 y tablas R 18-

19): Fueron 5 pacientes. Todos los pacientes tenían una concentración de creatinina en suero normal excepto uno. 3 pacientes presentaban una proteinuria mixta, siendo la glomerular de tipo “no selectiva” en 1 y “selectiva” en 2 pacientes. 2 pacientes presentaban una excreción aumentada de  $\alpha$ 1-microglobulina y, sólo ligeramente, de IgG, pero no de albúmina; el que tenía la excreción de IgG más alta presentaba un componente M en suero de tipo IgG Kappa; respecto al otro paciente, no presentaba componente M en suero.

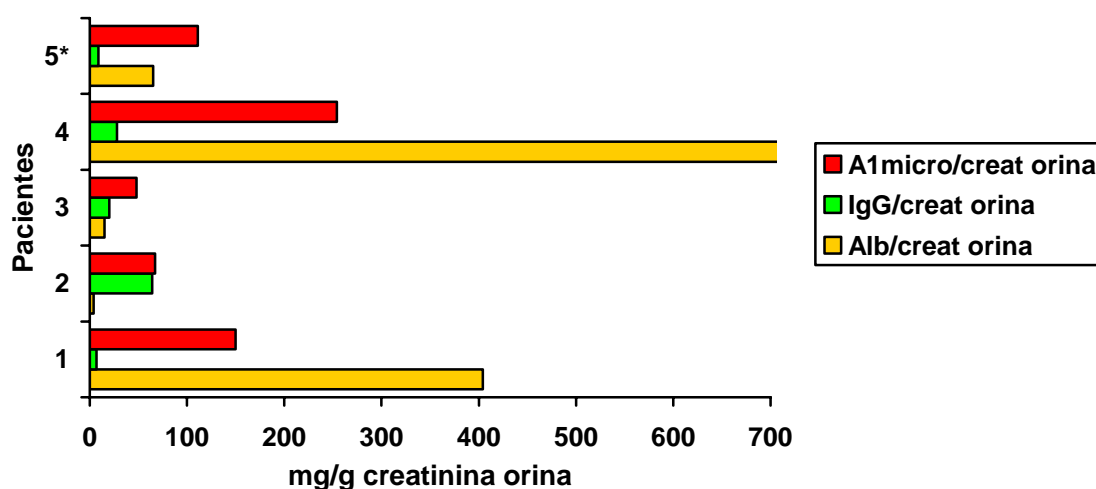
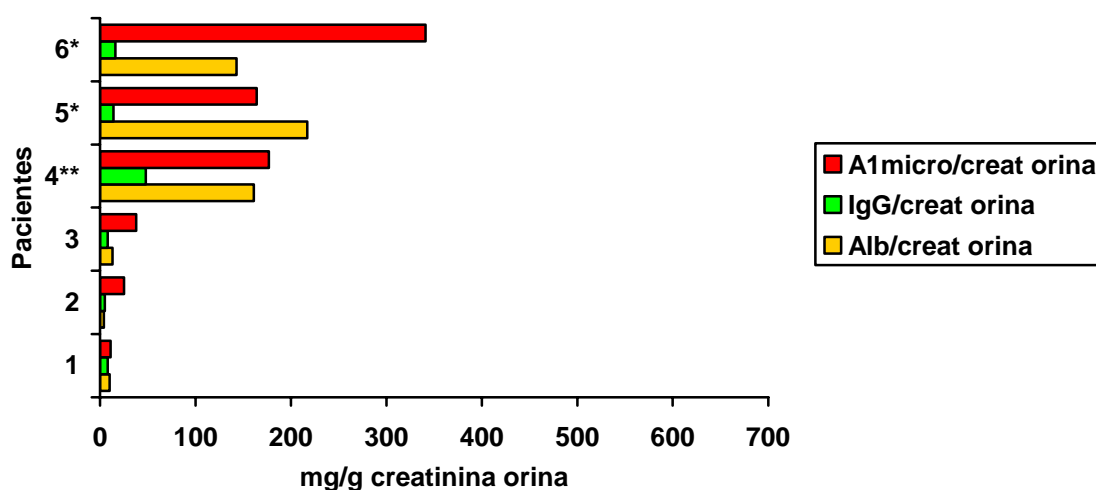


Figura R 16: Pacientes con MGUS y PBJ > 1000 mg/g creatinina.

\*Sólo 1 paciente tenía un valor de creatinina en suero patológico.

**5.8.7. Pacientes con otras enfermedades linfoproliferativas (fig. R 17 y tablas R 18-19):** Fueron 6 pacientes. Todos los pacientes tenían una concentración de creatinina en suero normal excepto uno. 3 pacientes presentaban una proteinuria mixta, siendo la glomerular de tipo “no selectiva” en 1 (paciente que tenía la concentración de creatinina en suero patológica) y “selectiva” en 2 (ambos presentaban una PBJ > 1000 mg/g creatinina). 2 pacientes presentaban una proteinuria sólo tubular, aunque con niveles de  $\alpha$ 1-microglobulina poco aumentados. 1 paciente no tenía aumentada la excreción de ninguna de las proteínas específicas.



**Figura R 17: Pacientes con otras enfermedades linfoproliferativas.**

\* PBJ > 1000 mg/g creatinina

\*\* Sólo este paciente tenía creatinina en suero patológica

**Tabla R 18: Distribución de pacientes con marcadores proteicos en orina patológicos y creatinina sérica normal.**

		Nº pacientes	Alb orina > 20 mg/g crea	IgG orina > 10 mg/g crea	A1M orina > 14 mg/g crea
<b>Mieloma múltiple</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>	7	4	2	7
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>	6	6	1	6
<b>GM “smoldering”</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>	2	2		2
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>				
<b>MGUS</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>	13	8	2	12
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>	4	2	3	4
<b>Otras ELF</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>	3			2
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>	2	2		2

Abreviaturas = PBJ: proteinuria de Bence Jones; crea: creatinina; GM: gammapatía monoclonal; MGUS: gammapatía monoclonal de significado incierto; ELF: enfermedades linfoproliferativas; Alb: albúmina; IgG: inmunoglobulina G; A1M:  $\alpha$ 1-microglobulina.

**Tabla R 19: Distribución de pacientes con marcadores proteicos en orina patológicos y creatinina sérica patológica.**

		Nº pacientes	Alb orina > 20 mg/g crea	IgG orina > 10 mg/g crea	A1M orina > 14 mg/g crea
<b>Mieloma múltiple</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>	3	3	3	3
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>	6	6	3	6
<b>GM “smoldering”</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>				
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>				
<b>MGUS</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>	7	7	1	7
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>	1	1		1
<b>Otras ELF</b>	<b>PBJ &lt; 1000 mg/g crea</b>	1	1	1	1
	<b>PBJ &gt; 1000 mg/g crea</b>				

Abreviaturas = PBJ: proteinuria de Bence Jones; crea: creatinina; GM: gammapatía monoclonal; MGUS: gammapatía monoclonal de significado incierto; ELF: enfermedades linfoproliferativas; Alb: albúmina; IgG: inmunoglobulina G; A1M:  $\alpha$ 1-microglobulina.



## *VI - DISCUSIÓN:*

---





## **1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO DE PROTEINURIA:**

### **1.1. ESTUDIO DE PROTEINURIA EN ENFERMEDADES SISTÉMICAS:**

La enfermedad renal crónica (ERC) constituye un problema de salud pública extraordinariamente importante. Afecta aproximadamente al 11 % de la población adulta de Estados Unidos. La prevalencia de estadios tempranos de la enfermedad (10.8%) es más de 100 veces mayor que la prevalencia de fallo renal (0.1%). En España se desconoce cual es la prevalencia de la afectación renal en nuestra población<sup>97, 98</sup>. Simal et al., en un estudio realizado entre 1997 y 2000 en personas entre 15 y 85 años, en un área de Valladolid, concluyen que la prevalencia de ERC en estadio 2 (definido como daño renal con ligero descenso del Filtrado Glomerular) afecta al menos a 1/3 de la población general, mientras que aquellos incluidos en el estadio 3 (definido como moderado descenso del Filtrado Glomerular) representan casi el 8%<sup>99</sup>. Actualmente está en marcha el Estudio EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia renal crónica en España), cuyo objetivo es estudiar la prevalencia poblacional de ERC en una muestra representativa de la población española de edad igual o superior a 20 años. Los datos apuntan a una prevalencia de ERC en la muestra de 7.7 %<sup>100</sup>.

Uno de los motivos más importantes para estudiar la insuficiencia renal oculta es que está muy bien establecido que los pacientes que tienen afectación renal tienen un alto riesgo de mortalidad cardiovascular. Por tanto, la importancia del deterioro de la función renal y su correcta determinación se deriva del hecho de que probablemente ello sea un índice de la salud vascular del organismo, a lo que hay que unir el hecho de que las personas con enfermedad renal tienen generalmente un exceso de factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la diabetes o la hiperlipidemia. Así pues, la importancia de la determinación temprana de la ERC no solamente está basada en la posibilidad de enlentecer la progresión, sino también de identificar los factores de riesgo cardiovasculares<sup>98</sup>.

Por tanto, la detección precoz de los trastornos renales y del tracto urogenital por los procedimientos diagnósticos del laboratorio es muy importante. Los síntomas están a menudo ausentes, o son atípicos, durante un largo período de tiempo,

permaneciendo sin diagnosticar hasta llegar a un estadio en el que las intervenciones terapéuticas son a menudo ineficaces. Ya que diversas enfermedades renales primarias y secundarias producen fallo renal, y con frecuencia, la muerte, un laboratorio moderno debe ser capaz de detectar un trastorno de la función renal en un estadio en el que las medidas terapéuticas puedan prevenir la progresión de la enfermedad <sup>58,63</sup>.

El análisis de orina habitual es una combinación de una evaluación cualitativa de la presencia de proteína, glucosa, cetona, sangre, nitritos, leucocitos y pH usando la tira reactiva, junto con un examen microscópico del sedimento de la muestra de orina. Sin embargo, hay que señalar que esta estrategia diagnóstica no puede satisfacer todas las necesidades de un screening de laboratorio fiable en nefrología, pues no es capaz de detectar las alteraciones renales incipientes <sup>58</sup>.

La proteinuria persistente es el principal marcador de enfermedad renal. Otros marcadores incluyen alteraciones en el sedimento de orina, alteraciones en parámetros químicos tanto en sangre como en orina, y estudios de imagen anormales. Las personas con una filtración glomerular normal, pero con marcadores de enfermedad renal alterados, tienen aumentado el riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica <sup>88,97</sup>.

Los procedimientos diagnósticos para la detección de proteinuria en el laboratorio moderno deben permitir no sólo la detección de la excreción patológica de proteínas, sino también la cantidad, patrón y composición de las proteínas urinarias. En concreto, el seguimiento de un patrón específico de proteinuria ofrece una información valiosa para la diferenciación de todas las formas clínicamente relevantes de proteinuria y, por lo tanto, para la caracterización de una nefropatía <sup>58</sup>.

La nefropatía asociada con Diabetes Mellitus es la causa más frecuente de enfermedad renal en estadio final en Europa, EE.UU. y Japón. El primer signo relacionado con la afectación renal es muy a menudo la microalbuminuria (excreción urinaria de albúmina de 20-200 µg/minuto o 30-300 mg/24 h), que es clasificada como nefropatía incipiente. En este estadio puede permanecer estable, avanzar hacia proteinuria manifiesta, o regresar hasta niveles normales. La microalbuminuria afecta a 20-40% de los pacientes después de 10-15 años de comenzar la diabetes. La progresión a macroalbuminuria (excreción de albúmina urinaria mayor de 200 µg/minuto o mayor

de 300 mg/ 24 h) o nefropatía abierta, ocurre en el 20-40% de pacientes en un período de 15-20 años después del comienzo de la diabetes. La hipertensión arterial y la proteinuria pueden acelerar el deterioro de la filtración glomerular y la progresión a estadio final de la enfermedad renal<sup>53, 54, 58, 101</sup>.

En estudios realizados en enfermos renales diabéticos y no diabéticos demuestran que una reducción precoz de la proteinuria está asociada con una progresión más lenta de la enfermedad renal crónica. En el estudio *Ramipril Efficacy In Nephropathy* (REIN), la severidad de la proteinuria inicial fue asociada con un deterioro más rápido de la filtración glomerular. El estudio *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) y un reciente meta-análisis de 11 estudios implicando 1850 pacientes con enfermedad renal proteinúrica no diabéticos, han demostrado que una reducción de la excreción de proteínas en orina estaba independientemente asociada con un bajo riesgo de progresión de enfermedad renal crónica. Además, resultados del estudio *Reduction of End Points in NIDDM (Diabetes Mellitus no insulin-dependiente) with Angiotensin II Antagonist Losartan* (RENAAL) muestran que el nivel de proteinuria residual durante la terapia era un fuerte marcador de progresión de la enfermedad renal. También hay evidencias de que la proteinuria es un marcador de riesgo cardiovascular, como muestra el estudio realizado por Dick de Zeeuw et al. Por tanto, basándonos en estos estudios, se acepta que la reducción de la proteinuria es un factor protector a nivel renal y cardíaco, y, así, puede ser considerado como un objetivo terapéutico independiente en el manejo de pacientes con enfermedad renal crónica<sup>44, 76, 101, 102</sup>.

Los niveles de creatinina y urea en suero no son marcadores satisfactorios porque no están directamente correlacionados con el rango de filtración glomerular. De hecho, la creatinina en suero permanece en rangos normales hasta que la filtración glomerular se reduce al 50%. Además, la creatinina, producida en gran medida por la masa muscular, depende de la edad, el sexo y el peso corporal, y su concentración en suero no está relacionada sólo con la función renal. Por tanto, si nos basamos en estos parámetros la incidencia de disfunción renal es infraestimada. Ésta aumenta cuando se elige el aclaramiento de creatinina, ya que se correlaciona mejor con la filtración glomerular, y aún más si se aplican fórmulas de cálculo del filtrado glomerular, como la ecuación de Cockcroft-Gault, o la ecuación MDRD (The Modification of Diet in

Renal Disease), en las que se incluyen como factores para la estimación del filtrado glomerular la edad, el peso, el sexo y la raza (según la ecuación utilizada). Sin embargo, no es suficiente para identificar lesiones tubulares mínimas. Todos estos parámetros tampoco posibilitan la definición exacta de la situación del daño (tubular, glomerular, o mixta) o su severidad. Consecuentemente, no son suficientes para la identificación temprana de un deterioro renal, ya que no se correlacionan con el grado de atrofia tubular, o el número de cilindros. Por el contrario, la biopsia renal puede definir exactamente el tipo y grado de daño renal; aunque, naturalmente, este procedimiento está indicado sólo en pacientes seleccionados <sup>58, 70, 88, 97, 103, 104</sup>.

El aumento de albúmina urinaria es considerado actualmente como factor predictor de mortalidad y morbilidad en diabetes mellitus, tanto insulín-dependiente como no-insulín-dependiente. La albuminuria es un factor predictor conocido muy fuerte de enfermedad cardiovascular en diabetes mellitus no-insulín-dependiente. La albuminuria también es un factor de riesgo en pacientes no diabéticos con hipertensión, en pacientes con enfermedad vascular y un predictor de fallo cardíaco; así mismo, también es un factor predictor de mortalidad en personas mayores en general <sup>75, 88, 101</sup>.

Las alteraciones primarias del glomérulo afectan al intersticio tubular y viceversa, ya que la estructura tridimensional de la nefrona está estrechamente entrelazada. Se deriva de ello el que los tipos mixtos glomerular/tubular sean frecuentes en enfermedades renales avanzadas. Por otro lado, la afectación del intersticio tubular, frecuentemente asintomática y a menudo infravalorada, es sin embargo crítica en la evolución final de las enfermedades renales. Las proteínas marcadoras de la función del intersticio tubular reflejan estas alteraciones y son indicadoras del pronóstico <sup>60</sup>.

Hay estudios en los que se ha visto deterioro de la reabsorción tubular de proteínas de bajo peso molecular en pacientes diabéticos insulín-dependientes, pero sin evidencia de microalbuminuria, lo que indica que el estudio de las proteínas marcadoras tubulares detectarían de forma precoz la alteración funcional de los túbulos renales <sup>105</sup>.

Por lo tanto, el reconocimiento precoz de daño renal en pacientes con diabetes e hipertensión, así como en pacientes en tratamiento con drogas nefrotóxicas,

principalmente mediante el screening de albuminuria, pero también con la cuantificación del resto de las proteínas específicas, hará posible actuar sobre los factores asociados con la regresión de la proteinuria, y así, evitar la progresión de la enfermedad renal incipiente a forma abierta. Incluso nuevos grupos de pacientes deben ser incluidos en esta estrategia usando técnicas de medida sensibles cuando se prevea el deterioro de la función renal a largo plazo<sup>53, 54, 64, 75</sup>.

Según las guías inglesas (*UK guidelines*) para la identificación, manejo y remisión de la enfermedad renal crónica en adultos, las indicaciones para determinar proteinuria son las siguientes<sup>88</sup>:

- La proteinuria es uno de los más importantes marcadores de presencia de daño renal, requiriendo su cuantificación para determinar el estadio de enfermedad renal crónica y para guiar futuros tratamientos, principalmente cuando el grado de filtración glomerular es  $< 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ .
- Estudio de hematuria, tanto macroscópica como microscópica.
- Evaluación inicial de pacientes con hipertensión.
- Cuando existe un edema inexplicable, para descartar un síndrome nefrótico.
- Cuando se sospecha fallo cardíaco, para determinar si hay una enfermedad renal crónica asociada, que puede causar también retención de sal con similares consecuencias clínicas.
- Cuando hay enfermedad multisistémica, como el lupus eritematoso sistémico, vasculitis.
- Evolución de Diabetes Mellitus.
- Seguimiento de la gravedad de una enfermedad renal conocida.
- Como screening actualmente sólo se hace en la mayoría de los laboratorios en poblaciones seleccionadas de alto riesgo de padecer enfermedad renal crónica.

El desarrollo de los ensayos inmunológicos de proteínas específicas en la orina ha llevado a una considerable mejora de la detección precoz, la evaluación del pronóstico y la monitorización terapéutica de las enfermedades del riñón y de las vías urinarias<sup>60</sup>.

El examen básico mediante tiras reactivas y/o microscópico debería ser complementado con una determinación cuantitativa y sensible en la orina de las proteínas totales o de las principales proteínas urinarias marcadoras como albúmina, IgG y  $\alpha$ 1-microglobulina. El diagnóstico diferencial completo puede ser logrado midiendo únicamente unas pocas proteínas marcadoras. Esto reemplaza a la laboriosa técnica del SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis), que además es sólo cualitativa, en la evaluación del tipo o esquema de proteinuria <sup>60</sup>.

## **1.2. ESTUDIO DE PROTEINURIA EN PACIENTES CON GAMMAPATÍA MONOCLONAL:**

La incidencia de la participación renal en el MM, informado en la literatura, varía considerablemente. Posibles razones son la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas (pacientes seleccionados con avanzado daño renal en los centros de nefrología, y pacientes con mieloma de nuevo diagnóstico en cualquier estadio en los departamentos de hematología), o la baja sensibilidad de los parámetros usados normalmente para la definición del daño. Como ya se ha comentado, los niveles de creatinina y urea en suero no son marcadores satisfactorios de daño renal, así como tampoco lo es el aclaramiento de creatinina o el uso de fórmulas de cálculo del filtrado glomerular. Si nos basamos en estos parámetros la incidencia de disfunción renal es infraestimada. No permiten la identificación temprana de un deterioro renal, ya que no se correlacionan con el grado de atrofia tubular, o el número de cilindros. Por tanto, la necesidad de una definición más exacta de daño renal en pacientes con MM ha llevado a muchos autores a buscar nuevos marcadores de función renal <sup>70, 106, 107</sup>.

Una alta concentración de cadenas ligeras libres en el filtro glomerular puede causar toxicidad a nivel de las células del túbulo proximal. Sin embargo, numerosos factores están implicados en la patogénesis de la nefrotoxicidad de las cadenas ligeras libres, pues la función renal puede permanecer estable por varios años o deteriorarse rápidamente, sin estar en relación directa con las propiedades y cantidad de las mismas. Esto lleva a la necesidad de utilizar un indicador temprano de disfunción tubular, como puede ser la proteína  $\alpha$ 1-microglobulina. La determinación seriada de esta proteína también puede ser usada como instrumento en el seguimiento de pacientes con proteinuria de cadenas ligeras, pues cuando aparece una alta excreción urinaria de  $\alpha$ 1-microglobulina puede servir como indicador de inminente fallo renal <sup>57</sup>. Además, dependiendo de la función glomerular y tubular, las concentraciones de cadenas ligeras libres en suero y en orina pueden no cambiar en el mismo grado, de manera que la monitorización de cadenas ligeras libres sólo en suero es cuestionable para detectar el grado de enfermedad en pacientes con proteinuria de Bence Jones y disfunción tubular. La *Myeloma Management Guidelines* recomienda la cuantificación seriada de cadenas



ligeras libres tanto en suero como en orina, así como la cuantificación de proteínas totales en orina <sup>108</sup>.

Un estudio de A. Corso et al. realizado con una cohorte de 111 pacientes con mieloma concluye que las proteínas urinarias  $\alpha$ 1-microglobulina, IgG y albúmina son parámetros fiables y sensibles que revelan precozmente el daño renal, y recomiendan su uso rutinario para definir y monitorizar la función renal en pacientes con MM. Su uso puede ser particularmente ventajoso en pacientes con mieloma indolente asintomático, para la identificación de aquellos en quienes esté indicada una definición histológica con una biopsia renal, o en quienes puedan obtener ventaja de una terapia temprana <sup>70, 107</sup>.

Como ya se ha dicho, el estudio de las proteínas urinarias hace posible poner de relieve incluso un daño inicial tubular o glomerular. El uso de las proteínas urinarias en pacientes con mielomas tiene, además, un impacto clínico diferente según sea el estadio de la enfermedad. En pacientes con mieloma en estadio temprano, sea como primera observación o como progresión lenta de una historia previa de MGUS, la identificación de daño renal subclínico puede motivar la decisión de iniciar la terapia. A la inversa, en pacientes con un tumor de gran tamaño, para quienes el tratamiento está siempre indicado, la exacta monitorización de la función renal es importante para una evaluación más exhaustiva de la respuesta a la terapia <sup>70</sup>. Además, ya que la reversibilidad del fallo renal está relacionada con su severidad, una identificación temprana del daño renal junto con una rápida y efectiva terapia aumenta la posibilidad de obtener la normalización de la función renal <sup>107, 109</sup>.

### **1.3. IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DE PROTEINURIA DE BENGE JONES (PBJ):**

La excreción urinaria de proteínas de Bence Jones tiene un significado clínico importante, tanto diagnóstico como pronóstico, por su asociación frecuente a enfermedades malignas<sup>92, 110</sup>. La excreción urinaria de cantidades significativas de PBJ está sólo ocasionalmente asociada con una gammapatía monoclonal “benigna”, o gammapatía monoclonal de significado incierto, mientras que es un elemento muy importante del mieloma múltiple y enfermedades linfoproliferativas malignas relacionadas. A la inversa, parece ser bastante excepcional descubrir la existencia de proteinuria de Bence Jones pura en individuos aparentemente sanos, en quienes no hay evidencia de desarrollo de MM, amiloidosis sistémica, u otra enfermedad linfoproliferativa maligna durante largo tiempo de seguimiento<sup>111</sup>.

La proteinuria de Bence Jones debe evaluarse siempre considerando la situación clínica individual de cada paciente y la presencia de otros signos y síntomas clínicos como anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, o lesiones osteolíticas<sup>9, 92</sup>.

#### **1.3.1. Factor pronóstico en las gammapatías monoclonales:**

Beetham nos describe tres razones fundamentales para estudiar la PBJ<sup>10</sup>:

1. El 14-20 % de los casos de mieloma se caracterizan por PBJ como el único componente monoclonal.
2. La presencia de PBJ es altamente predictiva de ser una gammapatía monoclonal maligna. Es central en la valoración inicial del paciente con componente monoclonal en suero. También es importante en la valoración pronóstica y subsecuente manejo de un paciente con componente monoclonal en suero en quien el diagnóstico inicial es incierto.
3. En la amiloidosis AL, la detección de PBJ puede proporcionar un importante indicador de la presencia de esta enfermedad y consecuentemente su investigación y precoz tratamiento.

Se han realizado numerosos estudios (ya citados en la Introducción de este trabajo) por diferentes autores (Kyle, Beetham, Cesana, Pascali, Vincent Audard y Dino Veneri, entre otros) en pacientes con gammapatías monoclonales, llegando a la conclusión de que la existencia de **proteinuria de Bence Jones** es un **criterio de mal pronóstico**, tanto en las formas malignas ya establecidas, como en las gammapatías monoclonales de significado incierto <sup>10, 26, 27, 32, 33</sup>.

Aunque se han descrito casos de Proteinuria de Bence Jones “idiopática” <sup>24, 26</sup>, generalmente está estrechamente relacionada con una proliferación de células B maligna (mieloma múltiple, macroglobulinemia o leucemia linfática crónica, entre otras), muchas veces precediendo a otros síntomas de la enfermedad por muchos años <sup>112</sup>.

La cantidad de cadenas ligeras monoclonales en la orina proporciona un índice de la masa tumoral de los pacientes para futura monitorización de aumento o disminución de los valores <sup>17</sup>. Cuando la cantidad de cadenas ligeras que se filtra a través de los glomérulos sobrepasa la capacidad de reabsorción de los túbulos proximales, se excretan cadenas ligeras en la orina. La cantidad de cadenas ligeras excretada en un período fijo de tiempo con frecuencia es proporcional a la cantidad de cadenas ligeras producidas, que a su vez es proporcional al número de células plasmáticas neoplásicas. De esta manera, las mediciones seriadas de la cantidad de cadenas ligeras excretadas en el tiempo son una manera práctica de hacer el seguimiento de la masa tumoral y los efectos del tratamiento <sup>6</sup>.

Mariastella Graziani et al. han realizado una Guía para el Análisis de Proteína de Bence Jones para el Comité de Proteínas Plasmáticas de la Federación Internacional de Química Clínica, en la que nos detallan la utilidad clínica de la determinación de la proteína de Bence Jones. Así, es útil su determinación para el seguimiento de <sup>82</sup>:

- Pacientes con componente monoclonal en suero: al diagnóstico y durante el seguimiento.
- Pacientes con sospecha de tener una gammapatía monoclonal, por la clínica o por los resultados de laboratorio siguientes:
  - \* Dolor óseo, fatiga, infecciones recurrentes, púrpura, edema.

\* Hipogammaglobulinemia inesperada en adultos, inexplicable aumento de la velocidad de sedimentación globular, anemia, leucopenia y trombocitopenia, proteinuria.

### 1.3.2. Nefrotoxicidad:

Además de la importancia de estudiar la PBJ por su característica de ser marcador tumoral, su estudio precoz también está justificado por su acción lesiva *per se* a nivel renal <sup>112</sup> (tal como se ha descrito detalladamente en la introducción).

El fallo renal ocurre de forma variable e impredecible en aproximadamente el 50% de los pacientes con PBJ, por lo que la presencia de ésta es decisiva para la morbilidad y mortalidad. La disfunción tubular se ve en el 98% de pacientes con PBJ > 1 g/24h <sup>106, 107</sup>. Muchos factores pueden modular y sustentar tal nefropatía, pero las proteínas de Bence Jones solas son suficiente causa. Sin embargo, no todas las proteínas de Bence Jones son nefropatogénicas. Así, el diagnóstico del laboratorio debe tener dos objetivos principales:

- Detección y cuantificación de la excreción urinaria de proteínas de Bence Jones. El screening de proteinuria de Bence Jones en la rutina clínica está indicado cuando aparece una diferencia entre las proteínas totales y la suma de otras proteínas urinarias <sup>79</sup>.
- Identificación de las características estructurales relativas al potencial nefropatogénico de las proteínas de Bence Jones. Aparentemente, este potencial es cifrado por distintas propiedades fisico-químicas de las proteínas de Bence Jones individuales. Conociendo tales propiedades, se pueden predecir las consecuencias de la exposición de las proteínas de Bence Jones sobre la función renal y decidir la intervención terapéutica. Algunas de las características que pueden estar implicadas en la nefropatogénesis incluyen carga superficial de la proteína, autoagregación, y coprecipitación con glicoproteína de Tamm Horsfall tubular. Sin embargo, actualmente no hay aún un procedimiento que pueda permitir la predicción de nefropatogenicidad de estas proteínas. Además, las investigaciones de varias propiedades fisico-químicas no han proporcionado resultados equivalentes <sup>79, 111</sup>.

Existe un debate relacionado con la existencia de Mieloma Múltiple, y sobre todo, la presencia de PBJ, como *factor de riesgo para el uso de medios de contraste*. El factor de riesgo más importante en la nefrotoxicidad inducida por medios de contraste es la existencia previa (frecuentemente no reconocida), de insuficiencia renal, por lo que las enfermedades que cursan frecuentemente con algún grado de insuficiencia renal son consideradas como factor de riesgo para la producción de nefrotoxicidad por medios de contraste, como la Diabetes Mellitus y el Mieloma Múltiple, entre otras <sup>113</sup>. Varios estudios indican que los factores de riesgo para insuficiencia renal aguda en pacientes con MM no incluyen tanto los medios de contraste, sino más bien, la hipercalcemia, la deshidratación, las infecciones y la Proteinuria de Bence Jones, aunque cuando existen estos factores, posiblemente el uso de medios de contraste aumente el riesgo de insuficiencia renal <sup>114</sup>. Por tanto, la existencia de estudios contradictorios sobre este tema, sugiere que el MM y la PBJ no deban ser considerados como una contraindicación específica para la administración de medios de contraste, aunque la prudencia clínica sugiere realizarlos sólo cuando sean esenciales en el estudio del paciente, evitando en lo posible la coexistencia de otros factores de riesgo, como la deshidratación <sup>68, 83, 115</sup>.

## **2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS. VENTAJAS Y DESVENTAJAS:**

### **2.1. PROTEÍNAS TOTALES:**

Los métodos de precipitación con ácido, los de unión a colorantes, así como los nefelométricos y turbidimétricos son los indicados para la determinación de proteínas totales. Sin embargo, ningún procedimiento detecta todas las proteínas en orina, por lo que no son satisfactorios. Los valores medios facilitados por distintos métodos son muy diferentes, pudiendo llegar a doblarse de uno a otro. La precisión es pobre, siendo el método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico (SSA) el que presenta peor coeficiente de variación <sup>15, 49, 75</sup>.

Las tiras reactivas convencionales disponibles sólo pueden evidenciar afecciones renales avanzadas y no resultan satisfactorias para excluir una enfermedad renal, puesto que su límite de detección (entre 150 y 300 mg/L) excede en mucho el límite superior del rango de referencia de individuos sanos (20-100 mg/L dependiendo del volumen de orina). Además, miden principalmente la albúmina, por lo que moléculas más pequeñas presentes en gran parte de las proteinurias tubulares y/o pre-renales, son evidenciadas mucho peor, o casi nada, por las tiras reactivas. También en los métodos fotométricos clásicos, como el Biuret, el límite de detección (120 mg/L) resulta demasiado elevado <sup>60, 84</sup>.

Los métodos que usan el rojo de pirogalol o el cloruro de bencetonio ofrecen un compromiso aceptable. Su límite de detección es de 40-60 mg/L, y por ello son capaces de medir dentro del límite superior del rango de referencia de los individuos sanos, pudiendo además ser automatizados <sup>60</sup>.

## **2.2. PROTEÍNAS ESPECÍFICAS:**

Los métodos turbidimétricos y los de unión a colorantes tienen curvas de calibración no lineales, y presentan sensibilidades desiguales para proteínas individuales. Muchos infraestiman las proteínas de bajo peso molecular en la proteinuria tubular, y las cadenas ligeras de inmunoglobulinas en la proteinuria por sobrecarga <sup>15</sup>.

La separación electroforética de las proteínas urinarias según su peso molecular por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis) es una técnica bien establecida, pero su introducción en la práctica del laboratorio de rutina es difícil por varias razones <sup>58</sup>:

- La detección de las proteínas en orina no es cuantitativa.
- La interpretación de sus resultados requiere especialistas de laboratorio experimentados.
- Los métodos de tinción tienen considerables variaciones de sensibilidad.
- El procedimiento es técnicamente difícil y no es fácil automatizarlo.

Los métodos inmunológicos (principalmente nefelometría, turbidimetría, RIA y ELISA) son los más utilizados para la cuantificación de las proteínas específicas en orina <sup>15, 75</sup>.

Los instrumentos actuales de nefelometría aseguran la elevada sensibilidad analítica requerida para medir correctamente las proteínas dentro del rango de referencia normal, cuyo límite superior se acerca o es incluso inferior a 1 mg/g de creatinina (p. ej. transferrina, proteína ligada a retinol,  $\beta$ 2-microglobulina). Los instrumentos son también capaces de manejar correctamente las situaciones de exceso de antígeno que se presentan frecuentemente en muestras con proteinuria <sup>60</sup>.

El inmunonefelómetro IMAGE, de Beckman-Coulter presenta los siguientes límites de detección: albúmina, 2 mg/L; transferrina, 1 mg/L; IgG, 3 mg/L;  $\alpha$ 1-microglobulina, 3 mg/L; proteína ligada a retinol, 0.5 mg/L <sup>50</sup>. Por lo tanto, la sensibilidad analítica permite detectar concentraciones por debajo del rango de referencia normal.

### **2.3. PROTEINA DE BENICE JONES:**

La cuantificación de la proteína de Bence Jones está limitada por problemas metabólicos y analíticos. La excreción de esta proteína está influenciada principalmente por su grado de polimerización, por la función renal, y por la tasa de deposición de la proteína en diferentes tejidos. Como ocurre con otras proteínas urinarias, la medida exacta de la proteína de Bence Jones no puede realizarse de forma fácil con las técnicas de laboratorio actuales, debido a diferencias en sensibilidad y a la falta de estandarización, tanto en análisis cuantitativos como cualitativos <sup>82, 116</sup>.

El método preferido para la determinación de proteína de Bence Jones debe confirmar que las dos características fundamentales de la misma están presentes: que son cadenas ligeras libres y monoclonales <sup>82, 117</sup>.

La proteína de Bence Jones es soluble a temperatura ambiente y a temperatura corporal. Precipita al calentarla entre 45 °C y 60 °C y se redisuelve cuando la orina sigue calentándose hasta conseguir el punto de ebullición (alrededor de 100 °C). Basándose en esta característica, se realizaba un método de screening descrito por Bence Jones en 1845 para el diagnóstico de proteinuria de Bence Jones. Sin embargo, es un método poco sensible y específico. La presencia de grandes cantidades de proteínas y fosfatos disminuye la precisión del test. Se observan falsos positivos cuando precipitan otras globulinas con el ácido acético que se utiliza en esta técnica. La interferencia de estas proteínas puede evitarse enfriando la orina a temperatura ambiente, filtrando y repitiendo el proceso de calentamiento. Se puede producir un falso negativo si la proteína de Bence Jones está demasiado concentrada <sup>12, 49, 118, 119</sup>.

Este test de calor está actualmente rechazado para diagnosticar proteinuria de Bence Jones. Tampoco son admitidos para este propósito los métodos de precipitación y unión a colorantes, pues son insensibles e inexactos para detectar proteína de Bence Jones. Así mismo, los test de tira reactiva son sensibles principalmente a la albúmina y pueden no detectar la presencia de proteína de Bence Jones <sup>17, 75, 82, 89, 120</sup>. Algunos autores defienden que los casos de proteinuria tubular y proteinuria de Bence Jones puras son relativamente raros, y que la mayoría se acompañan de microalbuminuria, lo que produciría un test de tira reactiva positivo para proteínas (siempre que se utilizaran



las tiras reactivas albúmina-específicas cuyo límite de detección está por encima de 20-40 mg/L), seguidamente se procedería a la cuantificación de las mismas por otras técnicas, y por tanto, no quedarían sin diagnóstico estos pacientes (si se utilizan las tiras reactivas convencionales no se puede detectar microalbuminuria). Sin embargo, otros autores, como Boege, cuestionan esta frecuente asociación de proteinuria tubular y de Bence Jones con microalbuminuria; Roshini S. Abraham et al. afirman que la proteinuria que implica esencialmente cadenas ligeras no causa hiperalbuminuria, apareciendo la albúmina en pequeñas cantidades, ya que la función glomerular está intacta <sup>89, 106</sup>. En nuestro estudio, todos los pacientes con proteinuria de Bence Jones y creatinina sérica patológica, presentaban algún grado de alteración glomerular; sin embargo, entre los pacientes que tenían la creatinina sérica normal (37 pacientes), el 24% sólo presentaba alteración de la función tubular, manteniendo normal la función glomerular.

Actualmente, en muchos laboratorios, la electroforesis de proteínas (en gel de agarosa o acetato de celulosa) en la orina concentrada es el primer procedimiento utilizado para la detección de la proteína de Bence Jones y, si es necesario, se prosigue con la inmunofijación o inmunosustracción para la identificación de bandas no habituales <sup>10, 82, 118</sup>. Estos procedimientos no carecen de problemas técnicos y de dificultades de interpretación:

- Para identificar proteínas de Bence Jones en muy baja concentración se recomienda que la muestra de orina sea concentrada entre 100 y 150 veces, sin tener en cuenta la cantidad total de proteínas en la orina. Una excesiva concentración por encima de 150 veces es poco aconsejable, porque puede causar un aumento del fondo de la tinción, apareciendo con ello múltiples bandas debidas a las cadenas ligeras policlonales, que pueden ser confundidas con un componente monoclonal <sup>121</sup>.
- La utilización de concentradores produce una recuperación variable de las distintas proteínas, lo que ha originado la propuesta del uso de colorantes proteicos más sensibles que no requieran la concentración de la orina previa a la electroforesis <sup>118, 122</sup>.

- Los métodos clásicos de electroforesis, que utilizan como soporte de migración el acetato de celulosa o el gel de agarosa, presentan una escasa sensibilidad analítica para detectar concentraciones pequeñas de proteína de Bence Jones <sup>51, 123, 124</sup>. La sensibilidad de la electroforesis de evidenciar la presencia de PBJ depende del colorante empleado. Sobre acetato de celulosa se estima como sigue <sup>68</sup>:
  - Rojo Ponceau S y Negro Amido: 1000 mg/L
  - Azul brillante Coomassie: 75-300 mg/L
  - Oro coloidal: 1-6 mg/L

Por lo tanto, mientras que con el Oro coloidal se puede emplear la muestra no concentrada, con los demás colorantes es necesaria una concentración más o menos importante.

La electroforesis de alta resolución en gel de agarosa con colorantes sensibles puede llegar a tener un límite de detección de 100 mg/L en orina concentrada <sup>92</sup>.

- La sensibilidad analítica diferente entre los distintos sistemas de electroforesis, causa una variable en la interpretación de los análisis de proteinuria de Bence Jones entre laboratorios <sup>110</sup>.
- La migración de las proteínas de Bence Jones es impredecible debido al amplio intervalo de sus puntos isoeléctricos <sup>123</sup>.
- Se produce con frecuencia una superposición de las proteínas de Bence Jones con las bandas habituales del proteinograma <sup>123</sup>.
- La utilización de la electroforesis de proteínas urinarias, como paso previo para decidir si se prosigue con una inmunofijación, puede dar lugar a errores, tales como el enmascaramiento de una pequeña banda monoclonal por una excreción de cantidades importantes de proteínas, o porque una excreción elevada de la proteína de Bence Jones presente un aspecto policlonal <sup>118, 124</sup>.
- Los procedimientos electroforéticos basados en la evaluación densitométrica del componente monoclonal presentan también el inconveniente de que las diferentes proteínas tienen diferente afinidad por los colorantes empleados en la

electroforesis, y no se ha demostrado que coloraciones iguales para distintas proteínas correspondan a igual concentración de proteína <sup>92</sup>.

- La inmunofijación tampoco está exenta de problemas, tanto técnicos para alcanzar las concentraciones óptimas de antígeno y anticuerpo (exceso de antígeno), como interpretativos, sobre todo cuando se usan anticuerpos dirigidos contra las cadenas ligeras totales. La utilización de estos anticuerpos puede producir la ocultación de la proteína de Bence Jones en proteinurias patológicas, principalmente las de tipo nefrótico y en aquéllas con una excreción del componente monoclonal sérico, por una superposición en el recorrido electroforético de ambas cadenas ligeras, las cadenas ligeras pertenecientes a las inmunoglobulinas policlonales o monoclonales y las cadenas ligeras libres, fenómeno llamado co-migración. Este problema no parece ocurrir cuando se utilizan anticuerpos dirigidos exclusivamente contra las cadenas ligeras libres <sup>10, 71, 118, 125</sup>.
- Las cadenas ligeras ligadas a las cadenas pesadas formando la inmunoglobulina, tienen algunos determinantes antigénicos “ocultos”, es decir, determinantes que no son capaces de reaccionar con el antisuero, porque están estéricamente enmascarados en su unión con la cadena pesada de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras libres tienen “expuestos” dichos determinantes, y por tanto, son capaces de reaccionar con el antisuero. Esta característica permite obtener antisueros que reaccionan sólo con los determinantes “ocultos” de las cadenas ligeras, y por lo tanto, evidencian directa y específicamente las cadenas ligeras libres <sup>68</sup>. Cuando existen cadenas ligeras libres monoclonales en orina reaccionan mayoritariamente con un solo tipo de antisuero anti Cadenas Ligeras Libres, kappa o lambda, mientras que si son cadenas ligeras libres policlonales forman una banda electroforética más ancha que reacciona con ambos tipos de antisueros anti Cadenas Ligeras Libres, tanto kappa como lambda. Ambos tipos de cadenas ligeras libres pueden coexistir en la misma orina <sup>117</sup>.
- Otro problema que afecta a la interpretación es la aparición del llamado patrón “ladder” (en escalera) de cadenas ligeras libres policlonales. Este fenómeno es debido a la característica de las cadenas ligeras policlonales, normalmente pero no exclusivamente kappa, de producir un cambio del patrón de electroforesis e

inmunofijación al producir múltiples bandas. El aspecto morfológico habitual es de 3 a 8 bandas kappa igualmente espaciadas, cuya intensidad es máxima en la cara catódica del centro del patrón y disminuye anódica y catódicamente; aproximadamente el 25% de los casos se acompañan de 3 a 5 bandas lambda más débiles que las kappa. Estas cadenas ligeras “ladders” no son proteínas de Bence Jones, hecho constatado por la aparición de este patrón en personas normales cuando la absorción de proteína por el túbulo renal ha sido inhibida por la administración de L-arginina. Más frecuentemente, se han visto en orina de pacientes mayores que presentan una proteinuria tubular acompañando enfermedades inflamatorias. La única trascendencia es que ante la presencia de estas cadenas ligeras es difícil excluir proteína de Bence Jones, pues ésta puede co-migrar con una de la bandas que constituyen las cadenas ligeras “ladders”<sup>10, 71, 92, 121</sup>.

Se han aprobado alternativas al uso de los métodos electroforéticos para facilitar la detección e identificación de la proteína de Bence Jones por parte de algunos grupos, como el *European Urinalysis Group*, la *International Federation of clinical Chemistry* (IFCC), entre otros: los métodos inmunoquímicos (nefelométricos y turbidimétricos) para la cuantificación de cadenas ligeras libres en orina pueden ser usados como screening inicial para excluir proteinuria de Bence Jones, combinándolo con inmunofijación o inmunosustracción en caso de un resultado positivo con clonalidad desconocida<sup>15, 75, 82, 126</sup>. Sin embargo, estos métodos inmunoquímicos tampoco están exentos de problemas:

- Si el anticuerpo usado en el método inmunoquímico es contra cadenas ligeras totales (libres y unidas) todas las muestras con inmunoglobulina urinaria resultarán positivas y, puesto que la IgG está presente en la orina incluso en leves alteraciones glomerulares, habrá un alto porcentaje de “falsos positivos”, por lo que será necesario documentar que las cadenas ligeras son libres. Por tanto, es preferible usar anticuerpos contra cadenas ligeras libres, que nos van a cuantificar sólo este tipo de cadena<sup>68, 82</sup>.
- Los anticuerpos contra cadenas ligeras libres no son capaces de distinguir las monoclonales de las policlonales, por lo que es preciso definir la clonalidad<sup>82, 112</sup>.

- El peso molecular de la proteína de Bence Jones es bastante variable; en orina, puede aparecer como monómeros (22 kDa), dímeros (44 kDa), fragmentos de peso molecular bajo, o puede mostrar un alto grado de polimerización. El estado de agregación/fragmentación de las cadenas ligeras libres en orina es muy variable e impredecible, dependiendo de muchos factores (ej.: concentración, pH). En suma, el anticuerpo usado para la cuantificación va dirigido contra epítomos que pueden quedar ocultos en las moléculas de inmunoglobulinas y ser mal reconocidos, por lo que hay diferente grado de reactividad de los antisueros frente a las diferentes proteínas de Bence Jones, y por ello, existe la posibilidad de fallar en la cuantificación <sup>82, 92, 112</sup>.
- La imprecisión de los métodos cuantitativos en los extremos del rango dinámico (clínicamente muy relevante: los niveles bajos para el seguimiento de la remisión, y los niveles altos para documentar la progresión) está mal definida <sup>82</sup>.
- No hay estandarización de los métodos disponibles para la cuantificación de cadenas ligeras libres en orina. Los resultados pueden ser significativamente diferentes entre métodos; esto representa un serio problema considerando la frecuente movilidad de los pacientes <sup>82, 116</sup>.

Aunque los métodos inmunoquímicos no pueden determinar directamente la clonalidad, la relación kappa/lambda alterada es muy sugestiva de clonalidad, particularmente si es extrema. Por otro lado, esta relación puede ser normal al comienzo de la enfermedad o durante la remisión clínica, y los aumentos en la concentración de cadenas ligeras libres policlonales pueden enmascarar concentraciones bajas de cadenas ligeras libres monoclonales. Así mismo, las gammapatías biclonales de diferentes tipos de cadenas ligeras libres pueden producir una relación kappa/lambda normal aunque las concentraciones de ambas moléculas estén aumentadas. En todas estas situaciones la clonalidad debe ser confirmada por electroforesis <sup>127</sup>.

A pesar de estas limitaciones, el beneficio potencial de los métodos inmunoquímicos para el seguimiento de las gammapatías monoclonales es considerable, pues mejora la sensibilidad, la precisión y el coste <sup>127</sup>. Hay autores que

opinan que estos métodos pueden ser considerados como métodos alternativos o complementarios para la detección de PBJ <sup>126</sup>. Otros opinan que pueden usarse como prueba de cribado en población seleccionada sin sospecha clínica de gammapatía monoclonal en combinación con electroforesis de alta resolución de la orina para descartar muestras negativas o proteinurias de Bence Jones no relevantes <sup>128</sup>.

La cuantificación nefelométrica permite usar muestras de orina no concentradas y sin pretratamiento, con buena especificidad, ya que los anticuerpos empleados como reactivos reaccionan sólo con los determinantes antigénicos de las cadenas ligeras libres. Además, presenta un comportamiento uniforme en cada individuo, lo que permite monitorizar su excreción en el seguimiento de los pacientes; también orientan sobre cuánto debe concentrarse las muestras para estudios posteriores. Es recomendable que el seguimiento de los pacientes se realice en el mismo laboratorio para minimizar la variabilidad analítica <sup>68, 82, 116, 118</sup>.

Están disponibles test nefelométricos en sistemas automatizados con suficiente sensibilidad analítica (límite de detección: 5 mg/L) <sup>60</sup>. El inmunonefelómetro IMMAGE presenta un límite de detección de 2 mg/L, muy por debajo del límite inferior del rango de referencia normal establecido para las cadenas ligeras libres en orina (10 mg/L).

## **2.4. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS:**

Los métodos electroforéticos pueden agruparse en dos grandes grupos: los basados en la separación de las proteínas en soportes sólidos y posterior tinción de las bandas con colorantes con afinidad por las proteínas, y los basados en la separación de las proteínas en una fase líquida y cuantificación por medición de la absorbancia del enlace peptídico <sup>129</sup>.

Todos los procedimientos basados en la unión a colorantes, en mayor o menor medida dependiendo del colorante utilizado, presentan los problemas derivados de la desigual captación por unidad de masa de las diversas proteínas. Fundamentalmente aparece esta diferencia de afinidad por el colorante entre la albúmina y las globulinas, junto con la pérdida de linealidad en la captación de colorante por la proteína y la inhibición de su captación por los grupos prostéticos que forman parte de la molécula de proteína. Los procedimientos basados en la medida de la absorbancia del enlace peptídico obvian los problemas anteriormente citados, pero tanto los primeros como los segundos presentan la dificultad de la separación del componente monoclonal respecto al resto de las bandas del proteinograma, requiriendo, principalmente con los componentes monoclonales de baja concentración, la delimitación manual de los mismos <sup>129</sup>.

### **2.4.1. Análisis de suero mediante electroforesis:**

Diversos autores han estudiado la correlación entre la electroforesis capilar en zona (CZE) y la electroforesis en gel de agarosa o en acetato de celulosa (Graziani, Bossuyt, Godey, Ihara, Petrini, Katzmann) en suero. Los coeficientes de correlación más altos se observaron de manera concluyente en la fracción de las gammaglobulinas y de la albúmina. Los coeficientes de correlación más bajos se observaron en la fracción de las  $\alpha$ 1-globulinas y de las  $\beta$ -globulinas (esto está relacionado, probablemente, con el hecho de que la delimitación de estas fracciones no siempre es sencilla) <sup>91</sup>.

Bergón, en un estudio que realizó de los procedimientos electroforéticos con 66 muestras de suero con componente M, llegó a las siguientes conclusiones <sup>129</sup>:

- La capacidad de la electroforesis capilar para detectar componentes monoclonales de muy baja concentración (1 g/L), unido a su menor variabilidad con respecto a los otros procedimientos en las concentraciones medias y altas, hace de éste el procedimiento electroforético más adecuado para la detección y el seguimiento de componentes monoclonales, a pesar de las sobreestimaciones que de los mismos hace a concentraciones bajas, aunque inferiores a las efectuadas por los otros procedimientos basados en la captación de colorante.
- Un razonamiento similar se puede hacer para el seguimiento de componentes monoclonales con altas concentraciones en suero, pues aunque la electroforesis capilar los sobreestima en un 6-7%, los otros procedimientos los infraestiman en cerca de un 25% en el intervalo analítico comprendido entre 60.2 y 120.4 g/L.

Jolliff y Blessum, en un estudio de 240 muestras de suero con distintas disproteinemias, incluidas gammapatías monoclonales, demostraron una concordancia del 96% entre la electroforesis en gel de agarosa y la electroforesis capilar. Esta última presentó una mayor resolución en la fracción de albúmina. En otro estudio en el que evaluaron 100 muestras con una proteína monoclonal, observaron una concordancia del 100% entre la electroforesis capilar y la electroforesis en gel de agarosa en la detección de gammapatías monoclonales que estaban dentro de los límites de concentración detectables o más altos <sup>91</sup>.

Se han realizado otros muchos estudios comparando los tipos de electroforesis, llegando a la conclusión de que la electroforesis capilar es un método sensible para la detección de las proteínas monoclonales en suero, análogo o, incluso en algunos casos, mejor que la electroforesis en acetato de celulosa o en gel de agarosa. Esto unido a la automatización, los tiempos de ejecución cortos, la no necesidad de densitómetro, el mayor intervalo analítico, la mejor repetibilidad, hace de la electroforesis capilar el procedimiento más idóneo para la detección y seguimiento de las concentraciones de los componentes monoclonales en suero <sup>71, 91, 130</sup>.

Así mismo, también se ha observado que la **inmunosustracción** es una técnica fiable para la caracterización de las proteínas monoclonales. Al ser una técnica de sustracción, no puede alcanzar la sensibilidad de la inmunofijación, en la que la



combinación de dos proteínas, antígeno y anticuerpo, aumenta la cantidad de captación de colorante casi en 10 veces, aunque ésta requiere una gran atención en el control de la concentración de antígenos para maximizar la sensibilidad. Una ventaja adicional de la inmunosustracción es que es un método rápido (tarda unos 30 minutos frente a las dos horas que precisa una inmunofijación) y es automatizado. Además, no utiliza reactivos tóxicos y los residuos son escasos <sup>71,91</sup>.

#### **2.4.2. Análisis de orina mediante electroforesis:**

El análisis directo de las proteínas en las muestra de orina, incluida la detección de proteína de Bence Jones, es obstaculizado por diversas razones en la electroforesis capilar. En primer lugar, la concentración de proteínas en las muestras de orina es baja, por lo que muchas veces las muestras deben ser concentradas. Además, la orina contiene con frecuencia sustancias de peso molecular bajo (por ejemplo, fármacos) que muestran absorbancia a 214 nm y que generan unos picos de interferencia que pueden comigrar con las proteínas de interés. Por lo tanto, a fin de reducir la señal de fondo, es necesario depurar las muestras concentradas de dichas sustancias de interferencia. Sin embargo, con un tratamiento de la orina adecuado, hay estudios, como el de Jolliff et al., en el que se evalúa el sistema de electroforesis capilar en el Paragon CZE 2000 para la detección de cadenas ligeras monoclonales en orina, comparado con la electroforesis en gel de agarosa convencional, y concluye que existe una completa concordancia entre el sistema CZE y la electroforesis en gel de agarosa en la detección de cadenas ligeras libres en orina <sup>91,131</sup>.

Otro estudio que apoya el uso de la electroforesis capilar para la identificación de proteínas en orina es el realizado por M. A. Jenkins et al., en el que comparan la capacidad de la electroforesis capilar y la electroforesis en gel de agarosa de alta resolución para identificar y estimar el contenido de albúmina y proteína de Bence Jones en orina, obteniendo un coeficiente de correlación entre ambos métodos de 0.93 y 0.95, respectivamente <sup>132</sup>.

G. Kolios et al. realizaron un estudio para determinar la capacidad del sistema de electroforesis capilar Paragon CZE 2000 para distinguir la proteinuria glomerular de la tubular y para identificar las proteínas de Bence Jones, comparándolo con los

métodos convencionales (electroforesis en gel de agarosa e inmunonefelometría), llegando a la conclusión de que los diferentes patrones electroforéticos obtenidos con el uso del sistema de electroforesis capilar correlacionan muy bien con los métodos convencionales <sup>133</sup>.

Las mayores ventajas de la electroforesis capilar frente a la electroforesis en gel de agarosa para la determinación de proteínas en orina, son, como ocurría en suero, la automatización, los tiempos de ejecución cortos, la no necesidad de densitómetro, el mayor intervalo analítico y la mejor repetibilidad; lo que la convierte en una técnica muy útil en los laboratorios clínicos <sup>132, 133</sup>.

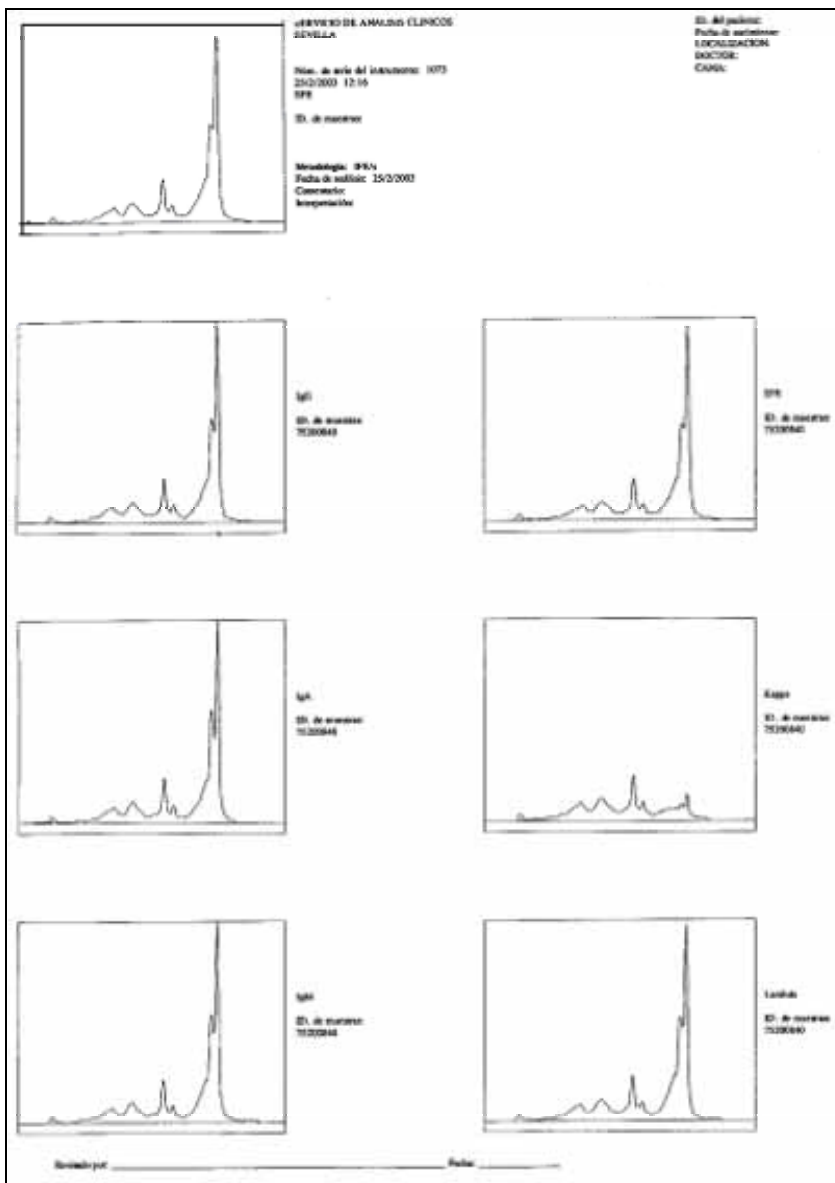
Una vez que se ha detectado la presencia de un componente monoclonal en orina hay que identificar el tipo de cadena ligera libre que lo compone. Para ello podemos emplear la técnica de inmunofijación o la técnica de inmunosustracción.

La técnica de inmunofijación (IFE) en gel de agarosa de alta resolución es el método de elección para identificar la proteinuria de Bence Jones por su sensibilidad y especificidad, pero es un procedimiento largo de realizar y caro <sup>124</sup>.

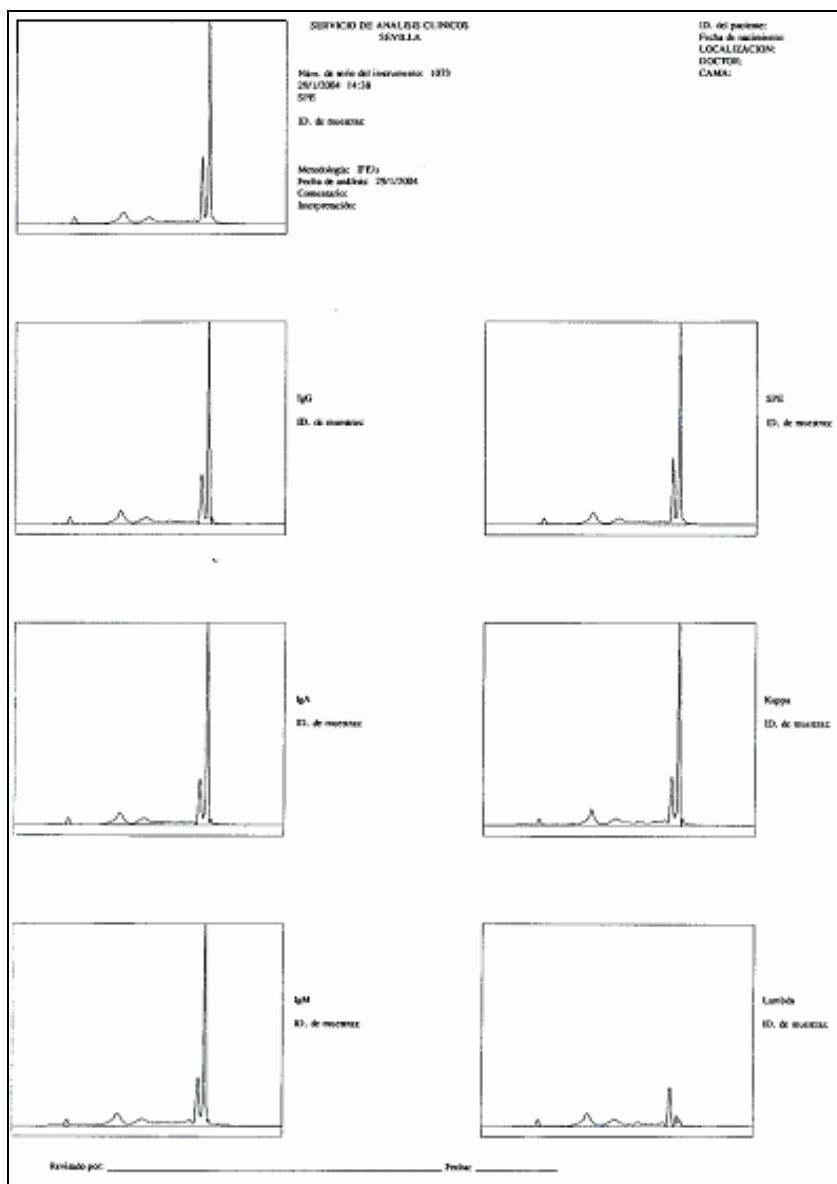
Para el inmunotipado del componente monoclonal, la técnica IFE que emplea antisueros frente a cadenas ligeras totales (libres y totales unidas), puede no distinguir una comigración de cadenas ligeras libres con inmunoglobulinas monoclonales, o cadenas ligeras libres monoclonales en presencia de una alta concentración de cadenas ligeras policlonales. Este inconveniente quedaría resuelto con la utilización de antisueros frente a cadenas ligeras libres, aunque no siempre se utilizan por su elevado coste <sup>68</sup>. La alta sensibilidad de la IFE puede resultar en un patrón “ladder” asociado con proteinuria de cadenas ligeras libres policlonales, apareciendo pequeños picos heterogéneos de cadenas ligeras libres monoclonales; este problema está acentuado por una concentración excesiva de la orina, lo que a veces puede solventarse con una simple dilución <sup>71</sup>.

La técnica de inmunosustracción (IFE/s) en el equipo de electroforesis capilar Paragon CZE 2000 emplea antisueros sólo frente a cadenas ligeras totales (además de las inmunoglobulinas específicas), lo que en principio parece que podría ser un

inconveniente. Sin embargo, en nuestro laboratorio, previamente a la aplicación de la técnica IFE/s, se realiza la cuantificación directa de cadenas ligeras libres por nefelometría, lo que nos hará sospechar de la existencia o no de monoclonalidad. Con la técnica de IFE/s lo que hacemos es confirmar o no la sospecha. Cuando existe monoclonalidad de cadenas ligeras libres, aunque el antisuero utilizado contenga anticuerpos frente a cadenas ligeras totales, como el pico monoclonal es sólo de cadenas ligeras libres, reaccionará principalmente con él, sustrayéndolo en el electroferograma específico. Esto lo podemos observar en los ejemplos de inmunosustracciones de orina con componente M de las figuras D 1 y D 2.



**Figura D 1: Inmunosustracción de orina con componente monoclonal de cadena ligera libre kappa.**



**Figura D 2: Inmunosustracción de orina con componente monoclonal de cadena ligera libre lambda.**

En un estudio hecho por Cussonneau et al. para valorar la utilidad del uso de antiseros frente a cadenas ligeras libres concluye que para el estudio de monoclonalidad debería de reevaluarse su utilidad, pues no ofrecen mucha información adicional sobre los antiseros frente a cadenas ligeras totales, debiendo tener en cuenta también, que los antiseros frente a cadenas ligeras libres son muy costosos <sup>71, 134</sup>.

En las tablas D 1 y D 2 se hace una comparación de las técnicas más habituales empleadas en los laboratorios de rutina para el estudio de las cadenas ligeras

libres y proteinuria de Bence Jones, en cuanto a la información analítica que ofrecen y las limitaciones más desatacadas de cada una <sup>68, 123</sup>. Como vemos, no existe ninguna técnica que cubra todas las necesidades analíticas de sensibilidad y especificidad como para poder emplearla sola en el diagnóstico de proteinuria de Bence Jones, por lo que lo más adecuado será utilizar varias que se complementen para llegar a un diagnóstico de certeza.

El empleo simultáneo de nefelometría en fase líquida empleando antisueros frente a cadenas ligeras libres y la IFE/s utilizado en nuestro laboratorio cumple con la información sobre la presencia específica de cadenas ligeras libres, su carácter mono o policlonal y su concentración, de una manera rápida y totalmente automatizada.

**Tabla D 1: Comparación de técnicas para el estudio de la PBJ y CLL.**

TÉCNICAS	Señal de anormalidad	Información sobre presencia de CLL			
		Presencia		Distribución	Concentración
		Genérica Proteínas	Específica de CLL	Monoclonal o Policlonal	Especificidad CLL
<b>Termo test y similares</b>	Turbidez	SI	SI/NO	NO	NO
<b>Tiras reactivas</b>	Variación color	SI	NO	NO	NO
<b>Proteínas totales en orina</b>	Presencia proteínas	SI	NO	NO	NO
<b>Electroforesis</b>	Banda sospechosa	SI	NO	SI	NO
<b>IFE con As. Anti-CLT</b>	Banda CL		NO	SI	NO
<b>IFE con As. Anti-CLL</b>	Banda CLL		SI	SI	NO
<b>IFE/s</b>	Banda CL		NO	SI	NO
<b>Inmunoprecipitación en fase líquida- CLT</b>	Presencia medible de CL		NO	NO	NO
<b>Inmunoprecipitación en fase líquida- CLL</b>	Presencia medible de CLL		SI	NO	SI

Abreviaturas = PBJ: proteinuria de Bence Jones; CLL: cadenas ligeras libres; IFE: inmunofijación; As: antisuero; CLT: cadenas ligeras totales; CLL: cadenas ligeras libres; IFE/s: inmunofijación por sustracción.

**Tabla D 2: Limitaciones de las técnicas para el estudio de la PBJ y CLL.**

<b>TÉCNICAS</b>	<b>LÍMITES</b>
<b>Termo test y similares</b>	Sensibilidad insuficiente. Interferencias.
<b>Tiras reactivas</b>	Sensibilidad insuficiente. Reaccionan casi exclusivamente con la Albúmina.
<b>Proteínas totales en orina</b>	Sensibilidad insuficiente
<b>Electroforesis</b>	Sensibilidad variable con la distribución. Sensibilidad dependiente del colorante. Poco estandarizable.
<b>IFE con As. Anti-CLT</b>	Sensibilidad variable con la distribución. Sensibilidad dependiente del colorante y los antisueros. Poco estandarizable.
<b>IFE con As. Anti-CLL</b>	Sensibilidad variable con la distribución. Sensibilidad dependiente del colorante y los antisueros. Poco estandarizable. Falsos negativos con algunos antisueros.
<b>IFE/s</b>	Sensibilidad variable con la distribución. Sensibilidad dependiente de los antisueros. Poco estandarizable.
<b>Inmunoprecipitación en fase líquida- CLT</b>	Posible falta de paralelismo entre muestra y calibrador. Interferencias con las Inmunoglobulinas.
<b>Inmunoprecipitación en fase líquida- CLL</b>	Posible falta de paralelismo entre muestra y calibrador.

Abreviaturas = PBJ: proteinuria de Bence Jones; CLL: cadenas ligeras libres; IFE: inmunofijación; As: antisuero; CLT: cadenas ligeras totales; CLL: cadenas ligeras libres; IFE/s: inmunofijación por sustracción.

### **3. ELECCIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO:**

#### **3.1. ELECCIÓN DEL TIPO DE MUESTRA DE ORINA:**

Para la evaluación cuantitativa de proteinuria la medida de la excreción de proteínas en orina de 24 horas ha sido el antiguo “gold standard”. Sin embargo, en los últimos años varios estudios han defendido que la medida de la excreción de proteínas debe ser hecha en una muestra de la primera orina de la mañana, con lo que se evitarían los errores frecuentes de diuresis que ocurren cuando se recoge la orina durante 24 horas, además de la incomodidad que supone para el paciente. Un inconveniente de la recogida de una muestra aleatoria de orina es la alta variabilidad existente en la concentración de proteínas en un mismo individuo en distintos momentos del día, debido a la variación en la cantidad de agua excretada, es decir, a la variación en la concentración de la orina (aunque la tasa de excreción renal de proteínas y creatinina sea constante a lo largo de las 24 horas). Se considera mejor la **primera orina de la mañana** porque tiende a ser la muestra más concentrada del día, y no se ve afectada por factores posturales, actividad física, consumo de proteínas, y factores hemodinámicos. Para corregir los errores de cuantificación que pueden ocurrir por la variación en la concentración de la muestra de orina se mide la relación entre proteína y creatinina en orina (**ratio proteína/creatinina**). Esta relación corrige variaciones de la concentración urinaria debidas a la hidratación, ya que tanto las proteínas como la creatinina urinarias son muy solubles en agua sufriendo una dilución en orina muy similar. Hay suficientes datos en la bibliografía para demostrar una fuerte correlación entre la relación proteína/creatinina en una muestra simple de orina y la excreción de proteínas en 24 horas. La determinación de creatinina es técnicamente fácil. Esto proporciona un método alternativo para el seguimiento de la excreción de proteínas por orina, tanto de la albúmina como del resto de las proteínas que pueden aparecer en orina. Además, es más fácil de obtener la muestra por el paciente y menos costoso <sup>11, 15, 39, 58, 64, 88, 97, 117, 121, 135, 136</sup>.

El Colegio Americano de Patólogos define los métodos para la detección y cuantificación de las proteínas de Bence Jones considerando muestras de orina de 24 horas. Sin embargo, la recogida de la orina de 24 horas es molesta y se presta a muchos errores en la recolección, además de ser las proteínas de Bence Jones particularmente

propensas a la degradación bacteriana. Algunos autores recomiendan el uso de la 2ª orina de la mañana, expresando la concentración de proteína de Bence Jones en relación a la creatinina urinaria <sup>82, 92, 106</sup>.

Según la Guía en el diagnóstico y manejo del mieloma múltiple 2005 publicada por British Society for Haematology, la cuantificación de la excreción urinaria de cadenas ligeras puede ser realizada directamente en una colección de orina de 24 horas, o calculada en una muestra de orina simple en relación a la concentración de creatinina urinaria <sup>111</sup>.

Respecto al cociente kappa/lambda en orina, Nakano et al. realizaron un estudio de las variaciones diurnas de cadenas ligeras libres en orina, llegando a la conclusión de que la variabilidad diurna del cociente kappa/lambda fue menor que la que se produce en las concentraciones de las respectivas cadenas ligeras libres por separado, por lo que el cociente de cada muestra de orina a lo largo del día fue casi igual que el de la orina de 24 horas <sup>110</sup>.

En individuos sanos la creatinina urinaria casi en su totalidad es filtrada por el glomérulo, y sólo trazas son secretadas por los túbulos. Sin embargo, la excreción de creatinina puede variar en relación con el peso corporal, la edad, el sexo y la función renal. También pueden afectarla enfermedades crónicas como el hipo- e hipertiroidismo, el ejercicio físico intenso, y comidas con alto contenido proteico, que aumentan las concentraciones de creatinina urinaria <sup>75</sup>. Además, si la concentración de creatinina en orina es menor de 0.3 g/L, los analitos referidos a la creatinina pueden ser sobreestimados <sup>42</sup>. Todo esto, unido a que la proteinuria también se ve influenciada por ciertas circunstancias, como el ejercicio físico, la fiebre, el stress emocional severo y cambios de postura, hace que no puedan ser excluidas las muestras de orina de 12 ó 24 horas en determinadas situaciones <sup>11</sup>. En nuestro laboratorio, cuando diagnosticamos un componente monoclonal en suero no conocido anteriormente, y no disponemos de muestra de orina de ese paciente, aconsejamos al clínico que nos envíe una muestra de orina de 24 horas para descartar la proteinuria de Bence Jones.



### **3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE MUESTRAS Y PACIENTES:**

- 3.2.1. Edad del paciente:** la gammapatía monoclonal puede aparecer a cualquier edad, pero es infrecuente antes de la pubertad, aumentando su frecuencia con la edad <sup>6</sup>. Basándonos en esta incidencia pusimos como punto de corte la edad de 16 años para incluir los pacientes en nuestro protocolo.
- 3.2.2. Creatinina en orina < 0.3 g/L:** como ya se ha mencionado anteriormente, cuando la concentración de creatinina en orina es menor de 0.3 g/L los analitos referidos a la misma pueden ser sobreestimados <sup>42</sup>, no siendo comparables con las concentraciones en la orina de 24 horas <sup>137</sup>, por lo que para evitar falsos positivos los hemos excluido del estudio.
- 3.2.3. Presencia de hematuria y/o leucocituria:** la hematuria aislada puede causar falsos positivos de proteinuria debido a la lisis de los hematíes y la consiguiente liberación de hemoglobina en la orina <sup>138</sup>. En caso de hematuria microscópica, cualquier cantidad superior a indicios ocasionales de proteínas es anómala. Si la hematuria es macroscópica, una excreción de proteínas > 500 mg/m<sup>2</sup>/día es significativa <sup>87</sup>. La infección urinaria puede causar producción de proteínas por el organismo y reacciones celulares, por lo que también puede ser causa de falso positivo de proteinuria <sup>64</sup>. Aunque no existe correlación entre el grado de hematuria y leucocituria, y la concentración de proteínas en orina, una leve proteinuria (inferior a 500 mg/L) puede ser achacable a la presencia de hematíes y/o leucocitos en orina. Cuando la muestra de orina presenta de hematuria y/o leucocituria, entra en el protocolo de proteinuria a partir de una concentración de 500 mg/L de proteínas totales.

### **3.3. ELECCIÓN DEL PUNTO DE CORTE DE PROTEINURIA:**

Cuando se detecta proteinuria en una muestra de orina, lo adecuado es verificar su persistencia antes de entrar en el protocolo diagnóstico, ya que hay proteinurias secundarias a fiebre, ejercicio intenso, quemaduras, etc., que, generalmente, son transitorias<sup>67</sup>. Sin embargo, nosotros hemos incluido las muestras de orina desde la primera vez que llegan al laboratorio. Esto ha tenido que ser así por la falta de n° de historia clínica en los pacientes extrahospitalarios, y nuestro sistema informático de laboratorio utiliza este criterio para crear un histórico del paciente. Por tanto, el mirar de forma individual si cada una de las 500 muestras de orina que llegan al laboratorio cada día, tienen una petición previa de proteinuria, resulta inviable.

Cuando la proteinuria es menor de 500 mg/24 horas (300 mg/L si consideramos una diuresis normal de aproximadamente 1.5 litros en 24 horas) el paciente sin factores de riesgo no necesita estar sujeto a más investigaciones, aunque sí debe tener un seguimiento para ver evolución<sup>62, 67</sup>. Si la proteinuria en una orina aleatoria es mayor de 300 mg/L, por el motivo explicado anteriormente, es incluida en el protocolo de estudio.

### **3.4. ELECCIÓN DEL PUNTO DE CORTE DEL COCIENTE PROTEÍNA/CREATININA EN ORINA:**

Para estimar más exactamente la excreción proteica en orina determinamos también la concentración de creatinina en la misma, y así corregir los posibles efectos del estado de hidratación del paciente sobre la concentración de proteínas.

En personas sanas el rango de excreción de proteína urinaria es  $< 150$  mg/día, la relación de proteína/creatinina corresponde a una concentración  $< 100$  mg de proteína por gramo de creatinina <sup>85</sup>.

Si la concentración de las proteínas es inferior al límite de referencia superior, de 100 a 120 mg/g de creatinina, resulta improbable que se trate de una proteinuria de importancia diagnóstica, siempre a condición de que no haya otras indicaciones o signos de enfermedades renales o de enfermedades que afecten al riñón. Sin embargo, un porcentaje considerable de pacientes con factores de riesgo (p. ej. diabetes mellitus o hipertensión) presentan concentraciones elevadas de albúmina o  $\alpha$ 1-microglobulina incluso con una concentración de proteínas totales dentro del rango de referencia. En estas patologías, deberían dosificarse las proteínas marcadoras más sensibles y específicas para la función glomerular y la función tubular <sup>60</sup>.

El cociente albúmina/creatinina disminuye ligeramente con la edad. También es ligeramente mayor en mujeres que en hombres, por ser la excreción de creatinina menor en mujeres. El coeficiente de variación intraindividual de la excreción de albúmina día a día es aproximadamente de 20 – 30%, incluso mayor en pacientes diabéticos, por lo que las decisiones diagnósticas no deben estar basadas en una única medida, especialmente si el resultado está en los límites de decisión <sup>75</sup>.

La *American Diabetes Association* y la *Nacional Kidney Foundation* recomiendan el seguimiento de proteinuria para detectar enfermedad renal crónica dividiendo los pacientes en dos grupos <sup>88,97</sup>:

1. Los pacientes sin factores de riesgo asociados con un cociente proteínas totales/creatinina  $>$  de 200 mg/g deben someterse a una evaluación diagnóstica

para determinar si precisan tratamiento. Si es  $<$  de 200 mg/g deberán reevaluarse periódicamente para detectar precozmente un aumento de la proteinuria.

2. Los pacientes con factores de riesgo asociados deben ser estudiados para detectar microalbuminuria periódicamente, y si ésta existe aplicar las medidas terapéuticas adecuadas.

Basándonos en estos datos anteriores, hemos establecido el punto de corte para seguir el protocolo en nuestras muestras de orina en 200 mg de proteína total/g de creatinina, a partir del cual se hará un estudio de proteínas específicas en la orina.

### **3.5. ESTUDIO DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS URINARIAS. Elección del punto de corte del Cociente (albúmina + IGGO + $\alpha$ 1-microglobulina)/proteínas totales:**

Un aumento de la excreción total de proteína no justificado por las proteínas específicas medidas hará sospechar la presencia de una proteína plasmática de baja masa molar (proteína de Bence Jones, lisozima, mioglobina,  $\beta$ 2-microglobulina, hemoglobina) que se está filtrando libremente por el glomérulo en cantidades importantes como para saturar la capacidad reabsortiva del túbulo proximal y excretarse en la orina <sup>139</sup>.

Boege et al. proponen un screening de muestras de orina para proteinuria de Bence Jones. Tiene un primer paso en el que medirían inmunonefelométricamente proteínas totales, albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina, transferrina e IgG, a todas las orinas, sin hacer una selección previa en relación a la concentración de proteínas totales (esta concentración sólo la utilizan para realizar prediluciones de las muestras, previas a la determinación de las proteínas específicas, y así, evitar el efecto de “exceso de antígeno”). Seguidamente calculan la relación entre la suma de las concentraciones de las proteínas específicas y la concentración de proteínas totales. Consideran que el estudio de proteinuria de Bence Jones está indicado cuando el cociente entre los cuatro marcadores y las proteínas totales es menor de 0.69. El siguiente paso sería la cuantificación de cadenas ligeras de inmunoglobulinas y calcular el cociente kappa/lambda para diferenciar monoclonalidad de policlonalidad (no utilizan antisueros frente a cadenas ligeras libres, sino frente a cadenas ligeras totales). Ellos concluyen que con este procedimiento un pequeño número de muestras conteniendo proteínas de Bence Jones puede ser detectado en un gran colectivo con alta sensibilidad y selectividad, obteniendo los resultados en pocos minutos. Así mismo, opinan que este método tiene gran utilidad en el seguimiento de la enfermedad porque facilita datos cuantitativos acerca de la proteinuria de Bence Jones además de la implicación renal <sup>112</sup>. Sin embargo, la determinación directa de las proteínas específicas a todas las orinas que llegan al laboratorio sin una selección previa, que delimite las orinas que presentan concentraciones de proteínas totales patológicas, tendría un bajo rendimiento diagnóstico, resultando muy costoso, lo que convierte a esta propuesta de screening poco viable.

El cociente entre la suma de los marcadores proteicos y las proteínas totales presenta el inconveniente de que, actualmente, la medición de la concentración de proteína en orina presenta variabilidad según el método empleado, pudiéndose producir estimaciones erróneas por acumulación de errores en las medidas. No obstante, Bergón et al. recomiendan la cuantificación de las proteínas totales en orina para detectar posibles errores en la medición de las proteínas individuales por exceso de antígeno. También consideran que medir la excreción urinaria de albúmina, IgG y  $\alpha$ 1-microglobulina es importante por la valiosa información que proporcionan sobre el estado funcional del glomérulo y del túbulo, facilitando la interpretación de los cocientes kappa/lambda y orientando sobre los procedimientos a utilizar<sup>118</sup>.

*European Urinary Guidelines* establece como **punto de corte del cociente (albúmina + IGGO +  $\alpha$ 1-microglobulina)/proteína total** el valor de **0.6** para diferenciar una proteinuria renal cuando es  $> 0.6$ , de la sospecha de proteinuria pre-renal, como la proteinuria de Bence Jones, cuando es  $< 0.6$ <sup>75</sup>. Este valor discriminante coincide con el establecido por Guder et al.<sup>40</sup>. Otros autores, como Ivandic et al. establecen el valor discriminante en  $0.7$ <sup>62</sup>.

Basándonos en estos estudios nosotros hemos aplicado el valor de **0.6** para el punto de corte del **cociente (albúmina + IGGO +  $\alpha$ 1-microglobulina)/proteína total**.

Hemos valorado cuántas determinaciones de cadenas ligeras libres habríamos dejado de realizar si hubiéramos aplicado el **valor de 0.5** para ese cociente, y los resultados habrían sido aproximadamente 250 determinaciones menos al año, un 24 %. Al analizar los pacientes que se habrían quedado sin diagnosticar pico monoclonal en orina hemos visto que sólo un paciente no se hubiera incluido en el protocolo y, por tanto, no se hubiera diagnosticado de pico monoclonal en orina en ese momento. Sin embargo, este paciente ya estaba diagnosticado de pico monoclonal en suero, por lo que, o bien el clínico, o desde el laboratorio, se le pediría posteriormente la determinación de cadenas ligeras libres directamente, y por tanto se diagnosticaría en ese momento.

### **3.6. ESTUDIO DE CADENAS LIGERAS LIBRES:**

El diagnóstico de proteinuria de Bence Jones tiene una importante influencia en los pasos terapéuticos de las gammopatías monoclonales, y debe ser confirmada tan pronto como sea posible. En el mieloma múltiple su incidencia es de 40 – 50%, pero en la población general baja llamativamente su incidencia; en nuestro estudio apareció proteinuria de Bence Jones con una frecuencia de 31 orinas/año (0.03% del total de orinas que se analizan en el laboratorio anualmente). Con estos resultados, podemos decir que la detección de la proteinuria de Bence Jones en la población general, de forma sistemática, tendría un bajo rendimiento diagnóstico. Por ello, no sería práctico cuantificar cadenas ligeras en orina sistemáticamente a toda la población, sino que hay que buscar protocolos diagnósticos válidos para cualquier laboratorio de rutina que nos permitan identificar pacientes con proteinuria de Bence Jones en los que no haya ninguna sospecha clínica, y poder aplicar una terapéutica precoz a ese paciente, sin tener que esperar a que su determinación sea pedida directamente por el clínico.

#### **Cociente kappa/lambda:**

Robinson et al. mostraron que la relación kappa/lambda en las muestras de orina con proteinuria de Bence Jones estaba marcadamente aumentada o disminuida, según el tipo de cadena ligera predominante, mientras que en el caso de pacientes con proteinuria general y en sujetos control la relación permanecía en el estrecho rango normal <sup>110</sup>.

Bergón et al. nos hablan de la importancia de establecer un cociente kappa/lambda para discriminar orinas a las que no habría que hacerles inmunofijación. Ellos analizaron 1037 muestras de orina de 24 horas, a las que se les había solicitado un estudio de la proteína de Bence Jones, por electroforesis e inmunofijación, cuantificándose la excreción de proteína total, albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina, IgG y las cadenas ligeras totales de inmunoglobulinas por nefelometría a punto final. Seleccionaron los valores discriminantes de 1 y 2.8 para el cociente K/L totales, con una sensibilidad diagnóstica de 97 % (93-99 %) y una especificidad diagnóstica de 67 % (64-70 %). A las orinas con resultados comprendidos entre 1 y 2.8 no se les hacía ningún estudio adicional, mientras que las que tenían resultado  $< 1$  ó  $> 2.8$  se les

efectuaba una inmunofijación para detectar la posible existencia de proteinuria de Bence Jones <sup>118</sup>.

*European Urianálisis Guidelines* establece los valores del cociente kappa/lambda para cadenas ligeras totales en los rangos siguientes <sup>75</sup>:

- < 1: proteinuria de cadenas ligeras monoclonales tipo lambda
- 1 – 5.2: proteinuria de cadenas ligeras policlonales
- > 5.2: proteinuria de cadenas ligeras monoclonales tipo kappa

Los rangos anteriores coinciden con los establecidos por Boege et al.; ellos estudian 87 pacientes con gammopatía monoclonal. Comparan los resultados obtenidos por inmunofijación y los obtenidos por el cociente kappa/lambda tras cuantificar las cadenas ligeras totales por nefelometría. Obtienen una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97% <sup>112</sup>.

Siede y Regeniter dicen que una relación de cadenas ligeras libres kappa/lambda normal excluye casi completamente una proteinuria de Bence Jones, y la costosa inmunofijación resulta innecesaria pudiendo ser evitada en un gran número de pacientes <sup>60</sup>.

Ninguno de los estudios mencionados especifica haber realizado la determinación de cadenas ligeras libres para el establecimiento del cociente K/L, incluso algunos autores, como Boege y Bergón, nos dicen que han determinado cadenas ligeras totales para el establecimiento del mismo, por lo que ellos miden conjuntamente, no sólo las cadenas ligeras libres, sino también las unidas a inmunoglobulinas, lo que puede dar errores en la interpretación del cociente K/L.

**El rango de referencia del cociente K/L establecido en nuestro estudio es el siguiente:**

- < 0.5: proteinuria de cadenas ligeras libres monoclonales tipo lambda.
- 0.5-8: proteinuria de cadenas ligeras libres policlonales.
- > 8: proteinuria de cadenas ligeras libres monoclonales tipo kappa.



La *sensibilidad* para el diagnóstico de picos monoclonales, tanto tipo kappa como tipo lambda, fue del 100% para ambos, y la *especificidad* fue del 71% y el 83%, respectivamente. Por tanto, aplicando este cociente no existe probabilidad de que exista un falso negativo, en detrimento de que sí pueden existir falsos positivos.

La diferencia de los valores obtenidos con nuestro estudio respecto a los estudios mencionados puede ser debida a que ellos estudiaron orinas de pacientes a los que se les solicitaba la determinación de proteinuria de Bence Jones porque ya presentaban alguna evidencia de gammapatía monoclonal. Sin embargo, en nuestro estudio las peticiones no estaban seleccionadas previamente por la sospecha de gammapatía, lo que justifica que obtengamos un rango mayor para conseguir una misma sensibilidad, aunque disminuya la especificidad. También pueden existir otros factores, pues como ya se ha mencionado, en estos estudios se determinaron cadenas ligeras totales, y no libres, a la vez que la determinación de proteínas entre laboratorios puede ser muy variable, por lo que los resultados no pueden ser extrapolables totalmente entre laboratorios.

Una vez establecido el cociente K/L se realiza la inmunosustracción a todas la orinas cuyo resultado es patológico (menor de 0.5 y mayor de 8), lo que nos permite determinar si las cadenas ligeras libres excretadas por orina son monoclonales o no.

Con esto evitamos realizar inmunosustracción a todas las orinas con concentraciones de cadenas ligeras libres por encima del rango de normalidad, y sólo se le hará a las que además tengan un cociente K/L patológico, lo que resultará un menor coste para el laboratorio con los mismos resultados diagnósticos.

### **3.7. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS PROCEDIMIENTOS DE CONCENTRACIÓN DE ORINA:**

La concentración de las muestras de orina es importante para asegurar que la presencia de proteína de Bence Jones en baja concentración sea detectada. Normalmente, las muestras son concentradas 80 a 100 veces, aunque algunos autores sugieren concentrarla hasta 500 veces <sup>140</sup>.

Las recomendaciones de la mayoría de los autores para concentrar la orina cuando se quiere determinar la presencia de proteinuria de Bence Jones es que la membrana del sistema de concentración debe tener un valor cut-off por debajo de 10 kDa <sup>82</sup>; otros autores recomiendan que esté por debajo de 15 kDa <sup>140</sup>.

Cuando comenzó el estudio se utilizaba el sistema de concentración de orina VIVASPIN 20, cuya membrana retiene proteínas con un MWCO (Molecular Weight Cut-Off) por encima de 10000 Daltons, por lo que las cadenas ligeras libres (peso molecular alrededor de 25 kDa) quedan retenidas. Sin embargo, este sistema requiere un volumen de muestra grande (14-20 ml), del que en la mayoría de los casos no se dispone, si tenemos en cuenta de que partimos de una muestra aleatoria a la que se le solicitaba un estudio general de orina; y por supuesto, anula la posibilidad de repetición. Además, este sistema requiere un tiempo de procesamiento largo, pues sólo de centrifugación se requieren 30 minutos.

Por lo expuesto anteriormente, se buscó un sistema de concentración de orina que necesitara menor volumen de muestra y que empleara menos tiempo en su procesamiento. Esto lo cumplía el sistema Microcon 30, pues precisa un volumen de muestra muy inferior al anterior (0.5-2.5 ml), y el tiempo requerido de centrifugación es unas 3 veces menos (10 minutos).

El inconveniente “a priori” para aplicar este sistema Microcon 30 en la detección de proteinuria de Bence Jones es que el límite establecido de peso molecular nominal en Daltons es de 30000, con lo que, basándonos sólo en el peso molecular, todas las moléculas menores de 30000 Daltons se filtrarían y no podrían ser recuperadas. Sin embargo, observamos que al aplicar este sistema se siguen detectando

picos monoclonales de cadenas ligeras libres en orina al realizarles la inmunosustracción, lo que nos indica que las cadenas ligeras libres quedan retenidas.

Sabemos que las cadenas ligeras libres presentes en la orina, tanto policlonales como monoclonales, pueden aparecer como formas monoméricas, poliméricas y fragmentos con masa molar altamente variable. Asimismo, al igual que a nivel del glomérulo renal, el paso de las moléculas a través de una membrana depende, no sólo de su peso molecular, sino también de su forma, carga eléctrica, concentración, lo que determina el llamado coeficiente de filtración glomerular (ya explicado en el apartado **Proteinuria** del capítulo **Introducción** de este trabajo). El paso de las moléculas por la membrana del filtro Microcon está más relacionado con el tamaño y la forma de las mismas que con su peso molecular estrictamente. A su vez, hay otros factores que influyen en el paso de solutos por la membrana, que incluyen la concentración del soluto, la naturaleza hidrofóbica del mismo, la temperatura a la que se trabaja, el tiempo de contacto del soluto con la superficie de la membrana, la composición de la muestra y el pH. Por lo tanto, todas estas variables que influyen en el proceso de concentración de la muestra de orina puede justificar que un filtro Microcon 30 sea válido para retener las cadenas ligeras libres presentes en esa muestra.

Para asegurarnos de que el cambio de método de concentración de orina no tendría efecto en la recuperación de las moléculas a estudiar, se realizó un **estudio comparativo de los dos sistemas de concentración de orina**, y así, comprobar que podíamos emplear el sistema Microcon 30 sin la posibilidad de que se pudieran escapar sin diagnosticar algunas muestras de orina con presencia de proteínas de Bence Jones.

El resultado del estudio fue que la **medida de concordancia** de los métodos al clasificar a los pacientes era muy buena, de **0.826**; y la **prueba de McNemar** resulta **no significativa** ( $p = 1$ ). Todo esto significa que los 2 sistemas clasifican lo mismo, o dicho de otra manera, que se obtendrá el mismo resultado tras realizar la inmunosustracción, independientemente de que las orinas sean concentradas con un sistema u otro.

---

## **4. EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DEL PROTOCOLO:**

### **4.1. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LAS MUESTRAS DE ORINA:**

Cuando analizamos los parámetros urinarios en las muestras (proteínas totales, creatinina, albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina, IgG y cadenas ligeras libres kappa y lambda) observamos que existe **diferencia significativa** entre los valores de las muestras que presentaban pico monoclonal y las que no lo presentaban, siendo valores superiores en las primeras, excepto para el cociente IgG/creatinina, en el que no existía diferencia significativa.

Estas diferencias en las concentraciones de proteínas específicas nos indica que es más frecuente la existencia de daño renal en los pacientes con proteinuria de Bence Jones, que en los que no la presentan.

#### **4.2. DISTRIBUCIÓN POR SEXO Y EDAD:**

Hemos observado que no existe diferencia significativa entre los grupos con pico monoclonal en orina y sin pico en cuanto a la **distribución por sexo** de los pacientes. Tampoco existe diferencia significativa cuando comparamos el tipo de pico monoclonal. Esto coincide con los datos epidemiológicos publicados en los distintos estudios.

Respecto a la **distribución por edad**, observamos que existe diferencia significativa entre el grupo de pacientes con pico monoclonal en orina y sin él; la mayoría de los pacientes con proteinuria de Bence Jones tenían más de 60 años de edad. No existe diferencia significativa cuando comparamos la edad entre los distintos tipos de picos monoclonales.

**4.3. COMPONENTES MONOCLONALES EN SUERO:**

Cuando analizamos los resultados observamos que no existe diferencia significativa respecto a la concentración de los componentes M en suero entre los pacientes con pico monoclonal en orina y los que no lo tienen, por lo tanto, no nos sirve este parámetro bioquímico para diferenciar “a priori” a quién se le hace estudio de cadenas ligeras libres y a quién no.

De lo anterior se deduce que ante la aparición de cualquier componente monoclonal en suero es obligado el estudio de proteinuria para detectar la presencia de proteinuria de Bence Jones.

#### **4.4. CONCENTRACIONES MÍNIMAS DE COMPONENTES M EN ORINA:**

Hemos hecho una evaluación de **límite de detección de la técnica de inmunosustracción**. Para ello, seleccionamos los 9 pacientes diagnosticados de proteinuria de Bence Jones cuyas muestras presentaban la menor concentración de cadenas ligeras libres, tanto Kappa como Lambda:

- En el caso de picos monoclonales Kappa observamos que por encima de 70-100 mg de CLL kappa /g de creatinina parece que no habría dudas en la interpretación de los resultados de la técnica de inmunosustracción. Por debajo de esas concentraciones de CLL Kappa, 1/3 de los resultados son de difícil interpretación; sin embargo, por encima de esas concentraciones, el porcentaje de inmunosustracciones dudosas es prácticamente nulo. Los resultados dudosos no se informaron como picos monoclonales, aunque sí se pidió control cada 3-6 meses para valorar evolución.
  
- En el caso de picos monoclonales Lambda, el resultado de la inmunosustracción fue en todas las muestras un pico de suficiente tamaño como para no crear ninguna duda respecto a la interpretación diagnóstica, independientemente de la concentración de CLL lambda en orina, así como de la existencia o no de pico monoclonal en suero. Por tanto, observamos que una concentración de CLL lambda de 60 mg/g creatinina es suficiente para ser detectada como pico monoclonal en orina. El que no existan resultados dudosos podría deberse a la existencia de una mayor concentración de proteínas urinarias estadísticamente significativa, al compararla con la concentración de los picos monoclonales Kappa (efecto matriz). Asimismo, también puede contribuir la formación frecuente de dímeros covalentes en orina de las cadenas ligeras libres lambda. También se ha visto que se acompañan de componentes monoclonales en suero de mayor concentración.

#### **4.5. PETICIONES DE PROTEINURIA DE BENGE JONES POR EL CLÍNICO:**

Hemos hecho un estudio de las peticiones de PBJ hechas por el clínico durante los 3 años que ha durado el estudio, con lo que todas las muestras pedidas por el clínico están incluidas en las muestras totales del mismo.

Los clínicos hicieron 359 peticiones de determinación de PBJ, correspondientes a 289 pacientes. De estos, 31 (10.7 %) presentaron cadenas ligeras libres en orina por encima del rango de normalidad ( $> 10$  mg/L) junto con cociente K/L patológico.

A 10 muestras de orina con cociente K/L patológico no se les pudo realizar la inmunosustracción por no disponer de volumen suficiente, por lo que no se incluyeron en el estudio. Cuando analizamos la concentración de cadenas ligeras libres que presentaban, vimos que todas estaban por debajo de 131 mg/L. Comparamos estas concentraciones con las de los Picos Orina Sí del estudio y observamos que existía diferencia significativa, lo que no ocurría al compararlas con las de los Picos Orina No. Por tanto, se ve que posiblemente estas muestras no hubiesen presentado pico monoclonal en orina si se les hubiese realizado la inmunosustracción. Además, siguiendo la evolución analítica de los pacientes correspondientes a estas muestras, se vio que no volvieron a presentar una orina con cociente K/L patológico.

Al realizarles la inmunosustracción a las 21 muestras restantes con cociente K/L patológico, sólo 16 (5.5 % de las 359 peticiones) resultaron positivas para la presencia de PBJ. Todas estaban incluidas en el protocolo excepto 3, 1 por presentar una concentración de proteínas totales en orina menor de 300 mg/L, y el resto porque en la petición no pedían proteínas totales en orina y se les determinó las cadenas ligeras libres directamente, aunque cuando se analizaron las proteínas totales posteriormente se vio que sí se habrían incluido en el protocolo al presentar un resultado superior a 300 mg/L. Cuando llegó al laboratorio una nueva muestra de orina del primer paciente a los 6 meses, ésta ya se incluyó en el protocolo por presentar unas proteínas totales superiores a 300 mg/L.



En conclusión, en estos 3 años que ha durado el estudio, se han diagnosticado 7 pacientes de proteinuria de Bence Jones después de pedir el clínico la determinación directamente, aunque todos también se habrían diagnosticado en la misma muestra si el clínico no hubiera hecho la petición específica, excepto un paciente que se habría diagnosticado por nuestro protocolo 6 meses después.

Hemos observado que el clínico va dirigido, en cuanto a la petición de orina se refiere, por sus hallazgos en suero, por lo que raramente pide estudio de proteinuria de Bence Jones con un proteinograma en suero normal.

Con todo esto, vemos que aplicando el protocolo no se escaparían diagnósticos de PBJ aunque el clínico no lo sospeche, y por lo tanto, no pida su determinación; con ello, el paciente tendrá opción, antes de presentar manifestaciones clínicas, a que se le puedan aplicar las medidas terapéuticas oportunas para prevenir el posible daño de la PBJ, así como evaluar periódicamente la evolución para poder actuar precozmente ante los posibles cambios que puedan ocurrir.

**4.6. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PROTOCOLO:**

A partir de la implantación del **PROTOCOLO DE PROTEINURIA** en nuestro Hospital ha aumentado la media de diagnósticos de PBJ al año, pues antes del 2002 se diagnosticaban unos 3-6 casos al año (siempre como consecuencia de la petición del clínico), y desde el 2002 se diagnostican unos 14-15 casos al año.

Estos resultados significan que la prevalencia de PBJ es mayor que la que se sospecha clínicamente, por lo que un diagnóstico basado principalmente en la clínica se queda insuficiente, pues el daño de la PBJ se produce desde que aparece, aunque no produzca al principio ningún signo ni síntoma clínico excepto su presencia en orina.

#### 4.7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

Cuando se hizo el seguimiento clínico de los 55 pacientes con pico monoclonal en orina se observaron las siguientes características:

- 28 pacientes presentaron mieloma múltiple y otras enfermedades linfoproliferativas que precisaban tratamiento inmediato, de los que el 64% y 67%, respectivamente, fueron diagnosticados al ampliarse el estudio tras la aparición del pico monoclonal en orina por nuestro protocolo.
- 2 pacientes presentaron gammapatía monoclonal “smoldering”, patología que muchos clínicos también la llaman mieloma múltiple en estadio I, y en la que no existe un acuerdo unánime sobre su necesidad de tratamiento inmediato o no, ya que los pacientes no están sintomáticos. En un paciente se diagnosticó después de aplicar nuestro protocolo a su muestra de orina.
- El resto de los pacientes (25 pacientes) se diagnosticaron de gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), de los cuales el 96% fueron detectados por primera vez por nuestro protocolo. Estos no necesitaban tratamiento inmediato, pero sí un seguimiento analítico cada 3-6 meses al principio para ver su evolución, y si se mantiene estable el componente monoclonal y no se acompaña de otro signo ni síntoma clínico, espaciar el seguimiento a una vez al año, pero mantenido el resto de su vida, pues como sabemos, la evolución no se puede conocer “a priori”. Además, hay que tener en cuenta que por el hecho de presentar Proteinuria de Bence Jones el pronóstico empeora, por lo que la vigilancia debe ser más estrecha.

También se debe hacer en estos pacientes un seguimiento de la proteinuria para detectar precozmente la posibilidad de aparición de daño renal, y así poder actuar terapéuticamente antes de que éste sea irreversible.

Dentro de este grupo clasificado como MGUS hay un subgrupo de 5 pacientes que puede ser discutible encasillarlos con este diagnóstico, pues presentaban una excreción de cadenas ligeras libres superior a 1000 mg/g creatinina (criterio diagnóstico

mayor de MM). Las razones por las que los clasificamos en este grupo son las siguientes:

- Un paciente no se acompañaba de componente M en suero ni de otro signo ni síntoma relacionado con MM, por lo que éste también podría haber sido diagnosticado como “Proteinuria de Bence Jones idiopática”, ya que cumple todos sus criterios.
- Tres pacientes se acompañaban de disminución de las inmunoglobulinas policlonales, por lo que cumplían los criterios diagnósticos III + d, sin embargo no presentaban ninguna sintomatología de MM, por lo que no podían ser diagnosticados como tal, aunque sí eran controlados periódicamente, excepto el paciente que falleció.
- Un paciente sólo cumplía el criterio mayor III de MM (excreción de cadenas ligeras libres superior a 1000 mg/g creatinina), sin sintomatología, por lo que tampoco podía ser diagnosticado de MM. Este paciente también falleció en el transcurso del estudio.

Se hizo un estudio de cómo se distribuían las cadenas ligeras libres según el diagnóstico clínico, y se observó que entre los pacientes que excretaban cadenas ligeras libres kappa había diferencia significativa, en cuanto al valor del cociente K/L, si se trataba de MM (mediana K/L superior a 115) o de MGUS (mediana K/L inferior a 47) . Sin embargo, entre los pacientes que excretaban cadenas ligeras libres lambda, no había diferencia significativa, en cuanto al valor del cociente K/L, para una patología u otra, con lo cual, en estos casos el cociente K/L no sirve de ayuda para diferenciar las distintas formas de presentación de la gammapatía monoclonal.

#### **4.8. MARCADORES PROTEICOS:**

Se hizo un análisis del daño renal que presentaban los pacientes basándonos en la concentración de proteínas específicas en orina y de creatinina en suero. Se observaron las siguientes características:

- Los pacientes con diagnóstico de MM presentaban la mayoría una proteinuria mixta (glomerular y tubular), aunque más de la mitad no presentaban valores de creatinina sérica patológicos, lo que corrobora que las proteínas específicas urinarias se alteran más precozmente que los parámetros séricos habituales como la creatinina.
  
- Los pacientes con MGUS y excreción de PBJ  $> 1$  g/g creatinina presentaban unos niveles superiores de proteínas específicas urinarias, tanto albúmina como  $\alpha 1$ -microglobulina, que los pacientes con MGUS y excreción de PBJ  $< 1$  g/g creatinina; sin embargo la IgG urinaria estaba aumentada sólo ligeramente en los primeros y era casi inexistente en los segundos. Por tanto, vemos que a mayor excreción de PBJ hay mayor daño renal, que se manifiesta por el aumento de excreción de proteínas específicas, y antes de que se alteren los parámetros séricos de insuficiencia renal. Esto nos indica que es importante diagnosticar la PBJ desde sus comienzos, aunque sea una excreción baja, pues nos permitirá aplicar las medidas terapéuticas oportunas para evitar su efecto lesivo sobre el riñón.

## ***VII - CONCLUSIONES:***

---



1. Se ha establecido un protocolo analítico para las orinas, que se inicia con la cuantificación de proteínas totales a todas las orinas que llegan al laboratorio. Cuando dicha cuantificación sobrepasa los valores establecidos como anormales (basados en la bibliografía), se continúa con diferentes escalones hasta llegar a la cuantificación de cadenas ligeras libres y su determinación de monoclonalidad por inmunosustracción cuando son patológicas.

2. Se ha valorado la utilidad del punto de corte de 0.6 (basado en la bibliografía) del cociente

$$\frac{\text{Albúmina} + \alpha 1\text{-microglobulina} + \text{IGGO}}{\text{Proteínas totales}}$$

Dicho cociente se ha empleado para seleccionar aquellas orinas a las que se les ha de cuantificar cadenas ligeras libres (cociente inferior a 0.6).

Se concluye que es igual de válido la aplicación del punto de corte de 0.5, pero con la ventaja de que se realizarían un 24 % menos de determinaciones de cadenas ligeras libres, con el consiguiente ahorro para el laboratorio, sin detrimento de la capacidad diagnóstica.

3. Se ha establecido el rango de referencia normal (0.5-8) para el cociente entre cadenas ligeras libres kappa y lambda en orina, no siendo necesaria la realización de inmunosustracción cuando el valor del cociente kappa/lambda se encuentre dentro de ese rango, aunque la concentración de cadenas ligeras kappa o lambda sea superior al límite establecido como normal (10 mg/L).

4. Se han establecido los diferentes puntos de corte en el desarrollo del protocolo basándonos en los resultados de máxima sensibilidad (100%), en detrimento de la especificidad, para evitar la probabilidad de que se quedara algún enfermo sin diagnosticar, como corresponde a los métodos diagnósticos de screening.

5. Se ha realizado la comparación de dos métodos de concentración de orina, previos a la aplicación de la técnica de inmunosustracción, concluyendo que ambos métodos son igual de válidos en cuanto a capacidad diagnóstica, pero



resultando ventajoso el sistema MICROCON 30 en lo que respecta metodología y volumen de orina necesaria.

6. Se han comparado los resultados obtenidos al aplicar el protocolo propuesto con la prevalencia de cadenas ligeras libres monoclonales cuando es el clínico quien solicita la cuantificación. Se concluye que al aplicar el protocolo propuesto se diagnostican más pacientes con cadenas ligeras libres monoclonales en orina (3-6 casos al año antes del protocolo frente a 14-15 casos al año después del protocolo), sin tener que esperar a que haya una sospecha clínica evidente. Esto va a permitir la aplicación de medidas preventivas y/o terapéuticas específicas de la gammapatía monoclonal o de sus repercusiones en los distintos órganos, con el consiguiente beneficio en cuanto a calidad de vida del paciente que ello conlleva.
  
7. La inclusión en el protocolo de la cuantificación de proteínas específicas urinarias (albúmina,  $\alpha$ 1-microglobulina e inmunoglobulina G) permite valorar la situación renal de todos los pacientes con proteinuria patológica, detectando la presencia de nefropatía, aún en estadios iniciales, lo que va a permitir poder aplicar medidas terapéuticas que actúen favorablemente en la evolución de la nefropatía, con la consiguiente disminución de costes, tanto personales como económicos.

## *VIII – BIBLIOGRAFÍA*

---



1. J. García-Conde. J. San Miguel et al. *Hematología*. 2003. pp. 909-955.
2. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Proteínas. *Recomendaciones para el estudio de las gammopatías monoclonales en suero*. *Química Clínica*. 2000; 19(3):214-218.
3. M. Abe, T. Goto et al. *Differences in kappa to lambda (kappa:lambda) ratios of serum and urinary free light chains*. *Clinical and Experimental Immunology*, Volume 111(2).February 1998.457-462.
4. R. A. Kyle and S. Vincent Rajkumar. *Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review*. *Immunological Reviews* 2003. Vol 194: 112-139.
5. Sans-Sabrafen J. et al. *Hematología clínica*. 3ª edición.1994. pp. 450-479.
6. E. Beutler, B.S. Coller et al. *Williams. Hematología*. 2005; pp 1267-1291.
7. A. Fauci, E. Braunwald et al. *Harrison. Principios de Medicina Interna*. 14ª edición. 1998. Vol. I. pp. 796-797, 813-814.
8. A. Fauci, E. Braunwald et al. *Harrison. Principios de Medicina Interna*. 14ª edición. 1998. Vol. II. pp. 1743, 1782, 2008-2009.
9. J. A. Viedma. *Aspectos clínicos y de laboratorio de las proteínas de Bence Jones*. *Ed Cont Lab Clín* 2005; 8:27-32.
10. R. Beetham. *Detection of Bence-Jones protein in practice*. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 563-570.
11. J. Tencer, H. Thysell and A. Grubb. *Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, k- and λ-immunoreactivity, orosomuroid and α<sub>1</sub>-antitrypsin*. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 691-700.
12. *Urianálisis moderno. Guía para el diagnóstico de enfermedades del tracto urinario y desórdenes metabólicos*.1995: 37.
13. E. Beuther, M. A. Lichtman et al. *Plasma cell Myeloma. Willians Hematology*. Fifth edition. 1990. pp. 1109-1119.
14. J.M. Fernández-Rañada de la Gándara y A. Alegre Amor. *Terapia en Oncohematología*. 2004: 268-271, 291.
15. C. A. Burtis and E. R. Ashwood. *Proteins in other Body Fluids*. *Tietz Textbook of Clinical Chemisry*. Third Edition. Ed. Saunders. 1999:511-513, 1218.

16. R. Alexanian, D. Weber and F. Liu. *Differential Diagnosis of Monoclonal Gammopathies*. Arch Pathol Lab Med. Vol 123, February 1999: 108-113.
17. R. A. Kyle. *Sequence of Testing for Monoclonal Gammopathies*. Arch Pathol Lab Med. Vol. 123, February 1999: 114-118.
18. *Guía para el tratamiento del Mieloma Múltiple*. Grupo Andaluz de Neoplasias Linfoides. Borrador Febrero 2006.
19. PR. Greipp, J. San Miguel et al. *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol. 2005; 23 (15): 3412-3420.
20. Farreras, Rozman. *Medicina Interna*. Undécima Edición. 1988. Vol. II: 1576.
21. The International Myeloma Working Group. *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. British Journal of Haematology. 2003, 121: 749-757.
22. B. Durie, R Kyle et al. *Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation*. Review. The Hematology Journal 2003; 4:379-398.
23. R. D. Hadden, E. Nobile-Orazio et al. *European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of paraproteinemic demyelinating neuropathies . Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society*. Journal of the Peripheral Nervous System. 2006; 11: 9-19.
24. Jan G. Waldenström. *Benign Monoclonal Gammopathy*. Acta Med Scand 1984; 216:435-442.
25. C. Salgado, J. Bladé et al. *Mieloma múltiple tras gammopatía monoclonal de significado incierto*. SANGRE 1993; 38 (5): 371-374.
26. R. A. Kyle and P. R. Greipp. *“Idiopathic” Bence Jones Proteinuria*. The New England Journal of Medicine. 1982. 306(10):564-567.
27. V. Audard, G. Damaj et al. *Idiopathic Light-Chain Proteinuria: Case Report and Review of the Literature*. American Journal of Hematology 2004; 76: 293-294.
28. M. Fiegl, S. Montoto et al. *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*. Correspondence. N Engl J Med, Vol. 346, N° 26. June 27, 2002:2087.
29. J. Blade. *On the “Significance” of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*. Mayo Clinic Proceedings; Jul 2004; 79(7)855-856.

30. R. A. Kyle, T. M. Therneau et al. *Long-term Follow-up of 241 Patients With Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: The Original Mayo Clinic Series 25 Years Later*. Mayo Clinic Proceedings; Jul 2004; 79(7):859-866.
31. R. A. Kyle, T. M. Therneau et al. *A Long-term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*. The New England Journal of Medicine; February 21, 2002. Vol. 346, N° 8:564:569.
32. C. Cesana, C. Klersy et al. *Prognostic Factors for Malignant Transformation in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Multiple Myeloma*. Journal of Clinical Oncology. Vol 20, N° 6 (March 15), 2002: 1625-1634.
33. Dino Veneri, Haytham Agel et al. *Malignant evolution of monoclonal gammopathy of undetermined significance: analysis of 633 consecutive cases with a long term follow-up*. Haematologica 2004; 89: 876-878.
34. E. Pascali and A. Pezzoli. *The clinical spectrum of pure Bence Jones proteinuria. A study of 66 patients*. Cancer, 1988; 62(11):2408-2415.
35. H Gregersen, J. Salling Visen et al. *Mortality and causes of death in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance*. British Journal of Haematology. 2001. 112: 353-357.
36. A Smith, F. Wisloff and D. Samson. *Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005*. British Journal of Haematology, 2005; 132: 410-451.
37. X. Fuentes Arderiu et al. *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. 1998. Vol. II; pp: 1063, 1064.
38. Farreras, Rozman. *Medicina Interna*. Undécima Edición. 1988. Vol. I: 805.
39. K. Tryggvason and E. Pettersson. *Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure*. Journal of Internal Medicine 2003; 254: 216-224.
40. W. G. Guder, M. Ivandic and W. Hofmann. *Physiopathology of Proteinuria and Laboratory Diagnostic Strategy Based on Single Protein Analysis*. Clin Chem Lab Med 1998; 36(12);935-939.
41. A.G.W. Norden, M. Lapsley et al. *Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi síndrome*. Kidney International. Vol. 60; 2001: 1885-1892.
42. M. Ivandic, W. Hofmann and W.G. Guder. *The use of knowledge-based systems to improve medical knowledge about urine analysis*. Clinica Chimica Acta; 2000; 297: 251-260.

43. W. G. Guder and W. Hofmann. *Differentiation of Proteinuria and Haematuria by Single Protein Analysis in Urine*. Clin Biochem 1993; Vol 26: 277-282.
44. K. Zandi-Nejad, A.A. Eddy et al. *Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease?* Kidney International, Vol. 66, Supplement 92; 2004: S76-S89.
45. W.G. Guder and W Hofmann. *Markers for the diagnosis and monitoring of renal tubular lesions*. Clinical Nephrology. Vol. 38, N° 1; 1992: S3-S7.
46. G. D'Amico and C. Bazzi. *Pathophysiology of proteinuria*. Kidney International, Vol. 63; 2003: 809-825.
47. S. Matsuo, Y. Morita et al. *Proteinuria and Tubulointerstitial Injury: The Causative Factors for the Progression of Renal Diseases*. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2003, Vol. 139: 20-31.
48. E. I. Christensen and H. Birn. *Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule*. American Journal Physiology Renal. 2001. 280: F562-F573.
49. J. Bernard Henry. *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. 2005, Vol. I, pp. 167, 258, 374-381.
50. M. Maachi, S: Fellahi et al. *Patterns of Proteinuria: Urinary Sodium Dodecyl Sulfate Electrophoresis Versus Immunonephelometric Protein Marker Measurement Followed by Interpretation with the Knowledge-Based System MDI-LabLink*. Clinical Chemistry. 2004. 50/10:1834-1837.
51. T. Le Bricon. *Identification et dosage des protéines urinaires au laboratoire d'analyses. Revue générale*. Ann Biol Clin, Vol. 60, N° 5, septembre-octobre 2002: 525-540.
52. J. Tencer, O. Bakoush and O. Torffvit. *Diagnostic and prognostic significance of proteinuria selectivity index in glomerular diseases*. Clinica Chimica Acta; 2000; 297: 73-83.
53. G. Remuzzi, A. Schieppati and P. Ruggenenti. *Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes*. The New England Journal of Medicine; April 11, 2002, Vol. 346, N° 15: 1145-1151.
54. B. A. Perkins, L. H. Ficociello et al. *Regression of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes*. The New England Journal of Medicine; June 5, 2003, Vol. 348, N° 23: 2285-2293.
55. J.S. Cameron and G. Blandford. *The simple assessment of selectivity in heavy proteinuria*. The Lancet, July 30, 1966: 242-247.
56. E. Bergón, R Granados et al. *Classification of Renal Proteinuria: A Simple Algorithm*. Clin Chem Lab Med. 2002: 40 (11): 1143-1150.

57. E. Honkanen, T. Pettersson and A. Teppo. *Urinary  $\alpha_1$ - and  $\beta_2$ -microglobulin in light chain proteinuria*. Clinical Nephrology, Vol. 44, N° 1;1995: 22-27.
58. F. Dati. *Urine Proteins as Markers of Kidney Diseases*. Diagnostic Endocrinology and Metabolism. 1998. Vol. 16; 4: 103-113.
59. W. Hofmann, H. Edel and W.G.Guder. *A mathematical equation to differentiate overload proteinuria from tubulo-interstitial involvement in glomerular diseases*. Clinical Nephrology, Vol. 44, N° 1;1995: 28-31.
60. W.H. Siede and A. Regeniter. *Proteinuria. Diagnóstico e Interpretación Mediante Proteínas Marcadoras*. Del Meeting "Las Proteínas: desde el Laboratorio al Clínico". X Edición- Castrocaro, 24-26 Octubre, 2001.
61. A. Blumsohn, B.W. Morris et al. *Stability of  $\beta_2$ -microglobulin and retinol binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine*. Clinica Chimica Acta, 195 (1990): 133-138.
62. M. Ivandic, W. Hofmann and W.G. Guder. *Development and evaluation of a urine protein expert system*. Clinical Chemistry 42:8; 1996:1214-1222.
63. S. J. Chadban, E. M. Briganti et al. *Prevalence of Kidney Damage in Australian Adults: The AusDiab Kidney Study*. Journal of the American Society of Nephrology. 2003; 14: S131-S138.
64. *Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*. American Journal of Kidney Diseases, Vol. 39, N° 2, Suppl 1 (February), 2002: pp S40-S50, S94-S99.
65. J. Coresh, D. Byrd-Holt et al. *Chronic Kidney Disease Awareness, Prevalence, and Trends among U.S. Adults, 1999 to 2000*. Journal of the American Society of Nephrology. 2005; 16: 180-188.
66. R. Lehmann and E.D. Schleicher. *Molecular mechanism of diabetic nephropathy*. Clinica Chimica Acta 297; 2000: 135-144.
67. William J. Marshall. *Clinical Chemistry*.1995:65, 66.
68. L. Massaro and R. Scaringi. *Cadenas Ligeras Libres y Proteínas de Bence Jones*. Curso CEFAR "le Proteine: dal Laboratorio alla Clinica". 1999.
69. H. Birn, J. C. Fyfe et al. *Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption*. The Journal of Clinical Investigation. 2000. Vol. 105; 10: 1353-1361.
70. A. Corso, P. Zappasodi and M. Lazzarino. *Urinary proteins and renal dysfunction in patients with multiple myeloma*. Biomed Pharmacother 2002; 56: 139-43.



71. T. Marshall and K. M. Williams. *Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria*. Review. *Electroforesis* 1999; 20:1307-1324.
72. Masaomi Nangaku. *Mechanisms of Tubulointerstitial Injury in the Kidney: Final Common Pathways To End-stage Renal Failure*. *Internal Medicine*. Vol. 43, N°1, 2004: 9-17.
73. D. J. Newman, H. Thakkar and H. Gallagher. *Progressive renal disease: does the quality of the proteinuria matter or only the quantity?* *Clinica Chimica Acta*; 2000; 297: 43-45.
74. M. Gekle. *Renal Tubule Albumin Transport*. *Annu. Rev. Physiol.* 2005. 67: 573-594.
75. T. Kouri, G. Fogazzi et al. *European Urinalysis Guidelines*. *The Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*; Vol. 60; Supplement 231, 2000; pp 2, 16-20, 39, 58-60.
76. H. Hillege, V. Fidler et al. *Urinary Albumin Excretion Predicts Cardiovascular and Noncardiovascular Mortality in General Population*. *Circulation. Journal of the American Heart Association*. 2002. 1:1777-1782.
77. H.Y. Park, G.T. Schumock et al. *A Structured Review of the Relationship Between Microalbuminuria and Cardiovascular Events in Patients with Diabetes Mellitus and Hypertension*. *Pharmacotherapy* 2003;23(12): 1611-1616.
78. F.E. Mann, Qi-Long Yi and H.C. Gerstein. *Albuminuria as a predictor of cardiovascular and renal outcomes in people with known atherosclerotic cardiovascular disease*. *Kidney International*, Vol. 66. Supplement 92; 2004: S59-S62.
79. F. Boege. *Bence Jones-Proteine*. *J Lab Med*; 1999; 23 (9): 477-482.
80. A. Solomon, D.T. Weiss et al. *Nephrotoxic potencial of Bence Jones Proteins*. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 324, N° 26. 1991: 1845-1851.
81. M. Haubitz and D. Peest. *Myeloma – new approaches to combined nephrological – haematological management*. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Editorial Review. 2006; 21: 582-590.
82. M. Graziani, G. Merlini and C. Petrini. *Guidelines for the Analysis of Bence Jones Protein*. *Clin Chem Lab Med*; 2003; 41(3): 338-346.
83. Leslie S. T. Fang. *Light-chain nephropathy*. *Kidney International*. Vol. 27; 1985: 585-592.
84. L. Borque de Larrea. *Proteinuria*. *Química Farmacéutica Bayer*. 1994: 25-34.
85. L. A. Kaplan and A. J. Pesce. *Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation*. 1996; Cap. 26 (Proteínas urinarias totales).

86. A. Umbreit and G. Wiedemann. *Determination of urinary protein fractions. A comparison with different electrophoretic methods and quantitatively determined protein concentrations.* Clinica Chimica Acta, 2000; 297:163-172.
87. J. Wallach. *Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio.* 2003: 132.
88. Royal College of Physicians of London and The Renal Association. *Chronic kidney disease in adults: UK guidelines for identification, management and referral.* 2006. pp: 15, 40-46.
89. D. Kutter. *The urine test strip of the future.* Clinica Chimica Acta, 2000; 297: 297-304.
90. David F. Keren. *Procedures for the Evaluation of Monoclonal Immunoglobulins.* Arch Pathol Lab Med. Vol 123, February 1999:126-132.
91. X. Bossuyt. *Separación de proteínas séricas mediante electroforesis capilar de zona automatizada.* Clin Chem Lab Med 2003; 41 (6):762-772.
92. J. A. Viedma Contreras. *Detección e identificación de la proteinuria de Bence Jones.* Química Clínica 2003; 22 (5): 392-394.
93. John Bernard Henry, M.D. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 2001: 253.
94. X. Fuentes Arderiu et al. *Bioquímica Clínica y Patología Molecular.* 1998. Vol. I: 176-179, 321, 342.
95. PARAGON CZE 2000. Información Química. *Electroforesis de proteínas séricas. 2000.*
96. J. M. González de Buitrago and A. Rodríguez Sánchez. *Fundamentos de los Inmunoanálisis.* 2000; pp: 49-58, 63.
97. A. S. Levey, J. Coresh et al. *National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification.* Annals of Internal Medicine. 2003. Vol. 139; 2:137-147.
98. A. L. M. de Francisco y A. Otero. *Insuficiencia renal oculta: estudio EPIRCE.* Nefrología. 2005. Vol. 25 (4):66-71.
99. F. Simal, J. C: Martín Escudero et al. *Prevalencia de la enfermedad renal crónica leve y moderada en población general. Estudio Hortega.* Nefrología. 2004. Vol. 24 (4): 329-337.
100. A. Otero, P. Gayoso et al. *Epidemiología de la enfermedad renal crónica en España: representatividad de la muestra preliminar del estudio EPIRCE.* Abstract Congreso de la Sociedad Española de Nefrología 2006.

101. G. Remuzzi, A. Benigni and A. Remuzzi. *Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes*. The Journal of Clinical Investigation. 2006. Vol. 116; 2: 288-296.
102. D. de Zeeuw, G. Remuzzi et al. *Albuminuria, a Therapeutic Target for Cardiovascular Protection in Type 2 Diabetic Patients With Nephropathy*. Circulation 2004; 110:921-927.
103. F. Pérez, F. Llamas y A. Legido. *Insuficiencia renal crónica: revisión y tratamiento conservador*. Archivos de Medicina. 2005. Vol. 1. Nº 3. Artículo 17.
104. AS. Levey, T. Greene, J. Et al. *A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine*. J Am Soc Nephrol 2000; 11:155A.
105. C. Walton, H.J. Bodansky et al. *Tubular dysfunction and microalbuminuria in insulin dependent diabetes*. Archives of Disease in Childhood, 1988, 63:244-249.
106. R. S. Abraham, R.J. Clark et al. *Correlation of Serum Immunoglobulin Free Light Chain Quantification with Urinary Bence Jones Protein in Light Chain Myeloma*. Clinical Chemistry 48, Nº 4; 2002: 655-657.
107. A. Corso, P. Zappasodi et al. *Urinary proteins in multiple myeloma: correlation with clinical parameters and diagnostic implications*. Ann Hematol; 2003; 82: 487-491
- 108.I. Herzum, H. Renz and H. Günther Wahl. *Immunochemical Quantification of Free Light Chains in Urine*. Clinical Chemistry. 2005. 51; 6:1033-1035.
109. J. Blade. *Tratamiento integral del Mieloma Múltiple*. Haematologica (ed. esp). 2002. Vol. 87, supl.1:59-64.
110. T. Nakano, A, Nagata and H. Takahashi. *Ratio of urinary free immunoglobulin light chain  $k$  to  $\lambda$  in the diagnosis of Bence Jones proteinuria*. Clin Chem Lab Med 2004; 42 (4): 429-434.
- 111.E. Pascali and A. Pezzoli. *The Clinical Spectrum o Pure Bence Jones Proteinuria. A Study of 66 Patients*. Cancer, 1988. 62: 2408-2415.
- 112.F. Boege, B. Koehler and F. Liebermann. *Identification and Quantification of Bence-Jones Proteinuria by Automated Nephelometric Screening*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol. 28, 1990: 37-42.
- 113.L. Thatte and C.A. Vaamonde. *Drug-induced nephrotoxicity. The crucial role of risk factors*. Postgraduate Medicine. Vol. 100, Nº 6. 1996: 83-100.
- 114.C. S. McCarthy and J.A. Becker. *Multiple Myeloma and Contrast Media*. Radiology 1992; 183: 519-521.

- 115.M. R. Rudnick, J.S. Berns et al. *Contrast Media- Associated Nephrotoxicity*. Seminars in Nephrology, Vol. 17, N° 1; 1997: 15-26.
- 116.M. Jiménez, E. Preciado et al. *Determinación inmunonefelométrica de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas en orina*. An Clin 2003; 28(1): 7-14.
- 117.Grupo de Estudio Inter-Regional “Forli” sobre “Proteínas de Bence Jones y Cadenas Ligeras Libres”. *Recomendaciones para la Evaluación de la Proteinuria de Bence Jones*. Forli, Junio 2000.
- 118.E. Bergón Jiménez y M. Bergón Sendín. *Uso del cociente cadenas kappa/cadenas lambda en orina para el estudio de la proteína de Bence Jones*. Química Clínica 1999; 18 (5): 266-270.
- 119.L Rosenfeld. *Henry Bence Jones (1813-1873): The Best “Chemical Doctor” in London*. Clinical Chemistry 1987;33 (9):1687-1692.
- 120.N. Lueck and Y. Pal Agrawal *Lack of Utility of Free Light Chain-Specific Antibodies in the Urine Immunofixation Test*. Clinical Chemistry 2006. 52: 906-907.
- 121.M. Attaelmannan and S. S. Levinson. *Understanding and Identifying Monoclonal Gammopathies*. Clinical Chemistry. 2000. 46:8(B):1230-1238.
- 122.M. Salomo, P. Gimsing and L.B. Nielsen. *Simple Method for Quantification of Bence Jones Proteins*. Clinical Chemistry 48:12; 2002: 2202-2207.
- 123.E. Bergón Jiménez y M. Bergón Sendín. *Limitaciones de la electroforesis de proteínas en orina como procedimiento de cribado para la detección de la proteína de Bence Jones*. Química Clínica 2001; 20 (6): 437-439.
- 124.Stanley S. Levinson. *An algorithmic approach using k/λ ratios to improve the diagnostic accuracy of urine protein electrophoresis and to reduce the volume required for immunoelectrophoresis*. Clinica Chimica Acta 262 (1997): 121-130.
- 125.H. M. Thelen, Jan van Bezu et al. *Disclosure of Hidden Free Light Chains By Immun subtraction*. Clinical Chemistry 48, N° 11, 2002: 2044.
- 126.T. Nakano, A. Nagata and H. Takahashi. *Ratio of urinary free immunoglobulin light chain kappa to lambda in the diagnosis of Bence Jones proteinuria*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2004; 42 (4):429-434.
- 127.A. R. Bradwell, H .D. Carr-Smith et al. *Highly Sensitive, Automated Immunoassay for Immunoglobulin Free Light Chains in Serum and Urine*. Clinical Chemistry 47, N° 4, 2001:673-680.
- 128.J. A. Viedma, N. Garrigós and S. Morales. *Comparison of the Sensitivity of 2 Automated Immunoassays whit Immunofixation Electrophoresis for Detecting Urine Bence Jones Proteins*. Clinical Chemistry 2005. 51; 5:1505-1507.

- 129.E. Bergón Jiménez y M. Bergón Sendín. *Transferibilidad de resultados entre procedimientos electroforéticos para la valoración de un componente monoclonal*. Química Clínica. 1998; 17 (3):227-231.
- 130.D. F. Keren. *Capillary Zone Electrophoresis in the Evaluation of Serum Protein Abnormalities*. American Journal Clin Pathol. 1998; 110:248-252.
- 131.C. R. Jolliff, J. A. Plettner et al. *Evaluation of the Paragon CZE 2000 Capillary Electrophoresis System for detection of monoclonal light chains in urine*. Clinical Chemistry. 2000; Vol. 46 N° 6, Supplement:A182.
- 132.M. A Jenkins, T. Denis O'Leary and M. D. Guerin. *Identification and quantitation of human urine proteins by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B. 1994; 662: 108-112.
- 133.G. Kolios, E. Bairaktari et al. *Routine Differential Diagnosis of Proteinurias by Capillary Electrophoresis*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2001; 39(9): 784-788.
- 134.N. Lueck and Y. Pal Agrawal *Lack of Utility of Free Light Chain-Specific Antibodies in the Urine Immunofixation Test*. Clinical Chemistry 2006. 52: 906-907.
- 135.P. Ruggenti, F. Gaspari et al. *Cross sectional longitudinal study of spot morning urine protein:creatinine ratio, 24 hour urine protein excretion rate, glomerular filtration rate, and end stage renal failure in chronic renal disease in patients without diabetes*. BMJ. 1998; 316: 504-509.
- 136.C. P. Price, R.G. Newall and J. C. Boyd. *Use of Protein:Creatinine Ratio Measurements of Random Urine Samples for Prediction of Significant Proteinuria: A Systematic Review*. Clinical Chemistry. 2005; 51;9: 1577-1586.
- 137.A. Regeniter, W. H. Siede et al. *Interpreting complex urinary patterns with MDI LABLINK: a statistical evaluation*. Clinica Chimica Acta 297 (2000): 261-273.
- 138.D. C. Tapp and J. B. Copley. *Effect of red blood cell lysis on protein quantitation in hematuric states*. American Journal of Nephrology. 1988: 8(3): 190-193.
- 139.E. Bergón Jiménez, E. Miravalles González et al. *Utilidad del cociente entre las excreciones de proteínas específicas y la excreción de proteína para descartar una proteína de Bence Jones*. Química Clínica 2002; 21(6): 444-447.
140. P. Patrick Hess, W. Mastropaolo et al. *Interference of Polyclonal Free Light Chains with Identification of Bence Jones Proteins*. Clinical Chemistry. 1993. 39/8:1734-1738.

***ANEXO:***



**ABREVIATURAS:**

A1M: Alfa1-microglobulina

Alb: Albúmina

AL: Amiloidosis primaria

AUSDIAB: Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study

BCA: Ácido bicícnico

BZC: cloruro de bencetonio

C: Constante

Ca: Calcio

cel: Célula

CFG: Coeficiente de Filtración Glomerular

CG: Crioglobulina

CGM: Crioglobulinemia

CH: Región constante de las cadenas pesadas

CL: Región constante de las cadenas ligeras

CLL: cadenas ligeras libres

CLT: cadenas ligeras totales

c.o.: concentrado de orina

CZE: Electroforesis capilar en zona

EDCL: Enfermedad por depósito de cadenas ligeras

ELF: Enfermedad linfoproliferativa

ELISA: Análisis inmunosorbente con la enzima ligada

EPIRCE: Epidemiología de la Insuficiencia renal crónica en España

ERC: Enfermedad renal crónica

FIA: Fluoroanálisis

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

g: Aceleración estándar de la gravedad

h: Hora

Hb: Hemoglobina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IFE: inmunofijación

IFE/s: inmunosustracción



Ig: Inmunoglobulina  
IgG: Inmunoglobulina G  
IGGO: Inmunoglobulina G en orina  
IgA: Inmunoglobulina A  
IgM: Inmunoglobulina M  
IR: Insuficiencia renal  
IRMA: análisis inmunoradiométrico  
IS: Índice de selectividad  
kDa: Kilodaltons  
K/L: Cociente kappa/lambda  
LLC: Leucemia linfocítica crónica  
LNH: linfoma no Hodgkin  
M: Monoclonal  
MB: Membrana basal  
MBG: Membrana basal glomerular  
MGUS: Gammapatía monoclonal de significado incierto  
MM: Mieloma múltiple  
MW: Macroglobulinemia de Waldenström  
MWCO: Molecular Weight Cut-Off  
NA: no aplicable  
NHANES III: Third National Health and Nutrition Examination Survey  
NMWL: Nominal Molecular Weight Limit  
n.s.: no significativo  
PAS: Ácido periódico de Schiff  
PBJ: Proteinuria de Bence Jones  
pI: Punto isoeléctrico  
PM: Peso molecular  
POEMS: Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal gammopathy, and Skin changes  
PT: Proteínas totales  
RBP: Proteína ligada a retinol  
RIA: Radioinmunoanálisis  
RID: Inmunodifusión radial  
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida

SSA: ácido sulfosalicílico

SWOG: Southwest Oncology Study Group

TCA: ácido tricloroacético

V: Variable

VH: Región variable de las cadenas pesadas

VL: Región variable de las cadenas ligeras

VSG: Velocidad de sedimentación globular