

Detección e identificación de la proteinuria de Bence Jones

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité Científico
Comisión de Proteínas¹

Documento G . Fase 3 . Versión 5.
Preparado por José Antonio Viedma Contreras

Índice

- 0 Introducción
- 1 Objeto
- 2 Utilidad clínica de la determinación de la proteinuria de Bence Jones
- 3 Procedimientos para la detección e identificación de la proteinuria de Bence Jones
 - 3.1 Fase preanalítica
 - 3.2 Fase analítica
 - 3.2.1 Inmunofijación
 - 3.2.2 Electroforesis de alta resolución
 - 3.2.3 Electroforesis capilar
 - 3.2.4 Inmunoprecipitación de cadenas ligeras de inmunoglobulinas en fase líquida
 - 3.2.5 Estimación cuantitativa de la proteinuria de Bence Jones
 - 3.3 Fase postanalítica
- 4 Bibliografía

0 INTRODUCCIÓN

Las proteínas de Bence Jones son cadenas ligeras libres monoclonales (κ o λ) de inmunoglobulinas o sus fragmentos, producidas en exceso y secretadas por células B derivadas de un clon que prolifera (1,2).

Debido a su tamaño molecular relativamente pequeño (22 kDa) las cadenas ligeras libres filtran a través de los glomérulos y son reabsorbidas y catabolizadas por las células tubulares proximales. Cuando se supera la capacidad de reabsorción tubular se excretan en la orina (proteinuria pre-renal). Las proteínas de Bence Jones pueden estar presentes en la orina como moléculas intactas, formas incompletas o fragmentos y diferentes polímeros de masa molecular variable.

La excreción urinaria de proteínas de Bence Jones tiene un significado clínico importante, tanto diagnóstico como pronóstico, porque se asocia frecuentemente a neoplasias proliferativas de células B, especialmente mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, linfomas, amiloidosis AL o enfermedad por depósito de cadenas ligeras (2,3).

La proteína de Bence Jones puede ser demostrada en la orina en más del 80% de los pacientes con mieloma múltiple, y constituye en el 20% de los casos el único componente monoclonal. La concentración de la proteína de Bence Jones excretada depende principalmente de la masa tumoral y de la función renal (3,4).

El empleo de técnicas sensibles permite la detección de proteinuria de Bence Jones a bajas concentraciones en la gammapatía monoclonal de significado incierto y en la expansión clonal de células B secundaria a neoplasias, enfermedades autoinmunes, e infecciones.

La proteinuria de Bence Jones debe evaluarse siempre considerando la situación clínica individual de cada paciente y la presencia de anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, o lesiones osteolíticas (1,5-7).

1 OBJETO

El objeto del presente documento es recomendar procedimientos adecuados para detectar, identificar y estimar cuantitativamente la proteinuria de Bence Jones.

2 UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA DE BENCE JONES

La proteinuria de Bence Jones debe investigarse en los siguientes casos (1-11):

Diagnóstico y seguimiento de las gammopatías monoclonales

Sospecha clínica o de laboratorio de mieloma de cadenas ligeras (hipogammaglobulinemia en adultos detectada por la electroforesis del suero o por la cuantificación inmunológica de inmunoglobulina G)

Sospecha clínica de amiloidosis AL o enfermedad por depósito de cadenas ligeras

3 PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEINURIA DE BENCE JONES

3.1 Fase pre-analítica

Las proteínas de Bence Jones son susceptibles de degradación por proteasas bacterianas. El espécimen recomendado para la detección de la proteinuria de Bence Jones es una muestra de orina reciente, habitualmente la segunda orina de la mañana. Puede conservarse la muestra al menos una semana de 2 a 8 °C, añadiendo azida sódica (0,1 g/L) para prevenir crecimiento bacteriano.

La orina centrifugada debe ser concentrada convenientemente antes de su análisis (12). En el caso de disponer de métodos con elevada sensibilidad y buena resolución, no es necesario concentrarla (13-17).

3.2 Fase analítica

El método seleccionado debe permitir la verificación de las dos características de las proteínas de Bence Jones: cadenas ligeras libres y monoclonalidad.

¹Composición de la Comisión de Proteínas de la SEQC: E. Bergón Jiménez, L. Borque de Larrea, M. Cortés Rius, M^aA. Diéguez Junquera, M. García Montes, I. Llompart Alabern, C. Martínez-Brú, D. Pérez Surribas, P. Rosique Samper, J.A. Viedma Contreras.

3.2.1 Inmunofijación

La inmunofijación es el método de elección para la detección e identificación de las proteínas de Bence Jones. Se recomienda el empleo de métodos de inmunofijación con elevada sensibilidad y buena resolución que permitan la detección e identificación de la proteinuria de Bence Jones en concentraciones superiores a 10 mg/L (12-15).

- Los antisueros empleados en la inmunofijación deben tener una elevada afinidad y avidéz frente a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y frente a las cadenas ligeras totales (libres y ligadas).

- Los antisueros frente a cadenas ligeras libres (determinantes ocultos) resultan útiles para identificar proteínas de Bence Jones que migran de forma coincidente con inmunoglobulinas intactas.

- Cuando exista un fondo importante de cadenas policlonales o si en la electroforesis de alta resolución aparecen bandas no identificadas en la inmunofijación es conveniente utilizar al menos dos diluciones de la orina previamente concentrada (12,18).

Un problema asociado con el empleo de métodos sensibles de inmunofijación y la mejora de la tecnología de la electroforesis es la visualización en la orina del patrón en escalera de cadenas ligeras libres policlonales. 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. El patrón en escalera refleja diferencias en la carga (sustituciones de aminoácidos por mutaciones en el ADN) y el tamaño molecular de las cadenas ligeras (modificaciones post-transcripcionales), originando múltiples bandas en la inmunofijación. El patrón policlonal en escalera puede observarse en la proteinuria tubular de diversa etiología, y puede inducirse en individuos sanos mediante la infusión endovenosa de arginina que bloquea la reabsorción tubular. El patrón en escalera no tiene un significado clínico relevante pero puede dificultar la correcta interpretación de la proteinuria de Bence Jones (19,20).

3.2.2 Electroforesis de alta resolución

La electroforesis de alta resolución en gel de agarosa empleando colorantes sensibles y orina concentrada permite definir el tipo de proteinuria y la detección de componentes monoclonales en la orina en concentraciones superiores a 100 mg/L (1-6,12).

3.2.3 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar constituye un procedimiento potencial para el estudio de la proteinuria de Bence Jones: la separación de las proteínas depende esencialmente de la resultante neta del flujo electroosmótico hacia el cátodo y de la movilidad electroforética de las proteínas hacia el ánodo (tampón alcalino) cuando se aplica una diferencia de potencial de varios kV a lo largo de un capilar. 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 inmunosubstracción.

- 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 que absorben radiación en la región ultravioleta.

3.2.4 Inmunoprecipitación de cadenas ligeras de inmunoglobulinas en fase líquida

Aunque los métodos inmunoquímicos en fase líquida no permiten identificar la monoclonalidad de las cadenas ligeras libres, se ha propuesto el cociente kappa/lambda en orina sin concentrar como un método de cribado para la detección de proteínas de Bence Jones (21-23).

3.2.5 Estimación cuantitativa de la proteinuria de Bence Jones

No existe en la actualidad un método definitivo para la cuantificación de la proteinuria de Bence Jones (24,25).

Los procedimientos inmunoquímicos se desaconsejan por las siguientes razones:

- La naturaleza de las proteínas de Bence Jones (monoclonalidad) con diferentes estados de polimerización y en ocasiones fragmentos, diferente grado de reactividad de los antisueros frente a las diferentes proteínas de Bence Jones, y a la coexistencia de cadenas ligeras libres policlonales y proteínas de Bence Jones.

- Algunos antisueros con reactividad frente a las cadenas ligeras libres no reconocen los determinantes antigénicos de algunas proteínas de Bence Jones y pueden mostrar reactividad cruzada con las cadenas ligeras ligadas a las inmunoglobulinas.

- La coexistencia de cadenas ligeras libres policlonales y proteinuria de Bence Jones.

- El potencial problema de exceso de antígeno.

Los procedimientos electroforéticos basados en la evaluación densitométrica del componente monoclonal (5,24,25) son criticables porque:

- Los métodos usados actualmente para la cuantificación de la excreción urinaria de proteína no presentan una sensibilidad y linealidad igual para todas las proteínas presentes en la muestra, en particular proteínas de bajo peso molecular y proteínas de Bence Jones.

- Las diferentes proteínas presentan 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.

- En ocasiones no es posible delimitar el componente monoclonal en trazados que presentan un fondo intenso o múltiples bandas, y cuando comigran moléculas de inmunoglobulina intactas y proteínas de Bence Jones.

3.3 Fase postanalítica

El informe de la investigación de la proteinuria de Bence Jones debe incluir la descripción del tipo de proteinuria y la evaluación del patrón morfológico de las cadenas ligeras obtenido por inmunofijación. Aunque no existe un método ideal para la estimación cuantitativa de la proteinuria de Bence Jones, el procedimiento densitométrico es el más adecuado. Se recomienda emplear un método con sensibilidad similar para las diferentes proteínas presentes en la orina o calibrar el densitómetro frente a diferentes concentraciones de albúmina (13, 26).

4 BIBLIOGRAFÍA

1. Merlini G, Aguzzi F, Wicher J. Monoclonal gammopathies. JIFCC 1997; 9: 171-6.
2. Aguzzi F, Wicher JT, Johnson AM. Bence Jones protein. En Ritchie RF, Navolotskaia O Eds, 1st Edition Serum proteins in Clinical Medicine, Scarborough, Maine. Foundation for Blood Research & Beckman Instruments Inc, 1996; 1: 11.04.

3. Beetham R. Detection of Bence Jones protein in practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 563-70.
4. Marshall T, Williams KM. Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria. *Electrophoresis* 1999; 20: 1307-24.
5. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 106-7.
6. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. Serum and urine assays. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 114-8.
7. Levinson SS, Keren DF. Free light chains of immunoglobulins: Clinical Laboratory analysis. *Clin Chem* 1994; 40: 1869-78.
8. Pezzoli A, Pascali E. The clinical significance of pure Bence Jones proteinuria at low concentration. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 473-5.
9. Pascali E, Pezzoli A. The clinical spectrum of pure Bence Jones proteinuria. A study of 66 patients. *Cancer* 1988; 62: 2408-15.
10. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. Amyloidosis: Recognition, confirmation, prognosis, and therapy. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 490-4.
11. Buxbaum JN, Chuba JV, Hellman GC, Solomon A, Gallo GR. Monoclonal immunoglobulin deposition disease: Light chain and light and heavy chain deposition diseases and their relation to light chain amyloidosis. Clinical features, immunopathology, and molecular analysis. *Ann Intern Med* 1990; 112: 455-64.
12. Pascali E. Bence Jones proteins identified by immunofixation electrophoresis of concentrated urine. *Clin Chem* 1994; 40: 945-6.
13. Matsuda K, Hiratsuka N, Koyama T, Kurihara Y, Hotta O, Itoh Y, *et al.* Sensitive method for detection and semiquantification of Bence Jones protein by cellulose acetate membrane electrophoresis using colloidal silver staining. *Clin Chem* 2001; 47: 763-766.
14. Sheat JM, Lorier MA. A simple silver-staining technique for detecting Bence Jones proteins in unconcentrated urine. *Clin Chem* 1987; 33: 561-3.
15. Aguzzi F, Gasparro C, Bergami R, Merlini G. High sensitivity electrophoretic method for the detection of Bence Jones protein and for the study of proteinuria in unconcentrated urines. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 287-92.
16. Heys AD, Norden AGW, Fulcher LM, Flynn FV. Bence-Jones protein detection: A rapid immunoblotting technique for routine use on unconcentrated urine. *Ann Clin Biochem* 1986; 23: 571-6.
17. Norden AGW, Fulcher LM, Flynn FV. Immunoglobulin light chain immunoblots of urine proteins from patients with tubular and Bence-Jones proteinuria. *Clin Chim Acta* 1987; 166: 307-15.
18. Hess PP, Mastropaolo W, Thompson GD, Levinson SS. Interference of polyclonal free light chains with identification of Bence Jones proteins. *Clin Chem* 1993; 39: 1734-8.
19. Harrison HH. The «ladder light chain» or «pseudooligoclonal» pattern in urinary immunofixation electrophoresis (IFE) studies: a distinctive immunofixation pattern and an explanatory hypothesis relating it to free polyclonal light chains. *Clin Chem* 1991; 37: 1559-64.
20. MacNamara EM, Aguzzi F, Petrini C, Higginson J, Gasparro C, Bergami MR, *et al.* Restricted electrophoretic heterogeneity of immunoglobulin light chains in urine: A cause for confusion with Bence Jones protein. *Clin Chem* 1991; 37: 1570-4.
21. Levinson SS. An algorithmic approach using k/l ratios to improve the diagnostic accuracy of urine protein electrophoresis and to reduce the volume required for immunoelectrophoresis. *Clin Chim Acta* 1997; 262: 121-30.
22. Boege F. Measuring Bence Jones proteins with antibodies against bound immunoglobulin light-chains: how reliable are the results?. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 403-5.
23. Bergón E, Bergón M. Uso del cociente cadenas kappa/cadenas lambda en orina para el estudio de la proteína de Bence Jones. *Quím Clím* 1999; 18: 266-70.
24. Tillyer CR. The estimation of free light chains of immunoglobulins in biological fluids. *Int J Clin Lab Res* 1992; 22: 152-158.
25. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(3): 338-346.
26. Salomo M, Gimsing P, Nielsen LB. Simple method for quantification of Bence Jones proteins. *Clin Chem* 2002; 48: 2202-7.

Correspondencia:
SEQC
Comisión de Proteínas
c/ Padilla, 323 Despacho 68
08025 Barcelona