

Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo

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

Documento D, Fase 3, Versión 5

Preparado por Cecília Martínez Brú e Isabel Llompart Alabern

Índice

- 0 Introducción
- 1 Objeto
- 2 Definiciones
- 3 Estudio proteico del líquido cefalorraquídeo
- 4 Metodología
- 5 Relación entre las proteínas del líquido cefalorraquídeo y del suero
- 6 Espécimen
- 7 Propuesta de un algoritmo para el estudio proteico de las enfermedades desmielinizantes
- 8 Recomendaciones y conclusiones
- 9 Bibliografía

0 INTRODUCCIÓN

0.1 Procedencia del líquido cefalorraquídeo y de sus proteínas

El estudio proteico del líquido cefalorraquídeo (LCR) constituye una fuente importante de información en distintos cuadros neurológicos.

El volumen total de LCR en el adulto es de aproximadamente 150 mL, de los cuales 30 mL se encuentran en el interior de los ventrículos cerebrales y 120 mL circulan por el espacio subaracnoideo. Un 70% del volumen de LCR tiene su origen en los plexos coroideos ventriculares, por un mecanismo combinado de ultrafiltración del plasma y transporte activo. El 30% restante se origina en el revestimiento del epéndimo y en el espacio subaracnoideo. El LCR se reabsorbe principalmente en las granulaciones de Pacchioni en el seno sagital superior y en las reflexiones dures de los pares craneales y de los nervios espinales (1,2).

La composición proteica del LCR es compleja. Aproximadamente un 80% de las proteínas del LCR proceden del plasma, principalmente por mecanismos de difusión pasiva. También existen mecanismos de transporte activo. El paso de proteínas desde el plasma hacia el LCR depende de: 1) constantes físico-químicas (radio y masa molar, carga eléctrica), 2) concentración en el plasma y 3) estado funcional de la barrera hematoencefálica. El 20% restante de proteínas del LCR se origina por síntesis intratecal. Dado que las proteínas provienen principalmente del plasma por difusión pasiva, las

proteínas que predominan en LCR son las de baja masa molar (3).

El efecto final de la barrera hematoencefálica es el de mantener una concentración de proteínas en el LCR con una relación de 1/350 respecto a la del plasma (3).

0.2 Concentración proteica en el LCR

La concentración y la composición de las proteínas del LCR varían según su origen y la edad del individuo. Así, la concentración de proteínas más baja se encuentra en el LCR ventricular, siendo intermedia en la cisterna, y superior en la zona lumbar. Ello obedece a un progresivo equilibrio del LCR con el plasma a través de los capilares durante su recorrido hacia el canal espinal (3). Asimismo, el porcentaje de proteínas de baja masa molar respecto a las proteínas totales en el LCR es mayor en los ventrículos que en la zona lumbar (4). Durante la infancia, las concentraciones proteicas lumbar y cisternal son comparables, probablemente en razón de una mayor actividad física (que permite una circulación más rápida del LCR) y al menor volumen de LCR, de tal manera que al realizar la punción lumbar se extrae parte de líquido cisternal. Los prematuros y los neonatos presentan concentraciones elevadas de proteína en el LCR debido a la inmadurez de la barrera hematoencefálica. A los 6 meses, la concentración disminuye y se va igualando a la del adulto. Finalmente, por encima de los 60 años, la concentración vuelve a aumentar.

0.3 Fisiopatología y significado clínico del estudio proteico del LCR

Las alteraciones en la concentración de las proteínas en el LCR son debidas básicamente a: 1) aumento del paso de proteínas desde el plasma hacia el LCR, ya sea por alteración de la barrera hematoencefálica o por obstrucción a la libre circulación del LCR con barrera íntegra (llevando a un equilibrio progresivo entre el LCR estático (por debajo de la obstrucción) y el plasma) o bien a 2) aumento de la síntesis o de la liberación de proteínas *in situ* (3).

El estudio de las proteínas del LCR es útil en el diagnóstico y seguimiento de procesos neurológicos en las siguientes situaciones: 1) para evaluar el grado de afectación de la barrera hematoencefálica consecutivo a la inflamación, en la que el aumento de permeabilidad de esta barrera conlleva un incremento en la concentración de proteína en el LCR; 2) en la detección de procesos que impliquen una respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC); y 3) en procesos degenerativos-destructivos del SNC, en los cuales existe una liberación de proteínas específicas desde el mismo hacia el LCR. Los 3

¹Composición de la Comisión: 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 y J.A. Viedma Contreras.

Tabla I. Causas del aumento de la concentración de proteína en el líquido cefalorraquídeo (2)

| POR AUMENTO DEL PASO DE PROTEÍNAS DESDE EL PLASMA | |
|---|----------|
| <i>Hemorragia</i> | g/L |
| Hemorragia cerebral | 0,3-1,5 |
| <i>Alteración de la barrera hematoencefálica</i> | |
| Meningitis bacterianas | 0,8-5,0 |
| Meningitis víricas | 0,3-1,0 |
| <i>Obstrucción a la libre circulación del LCR</i> | |
| Tumor espinal | 1,0-20,0 |
| POR AUMENTO DE SÍNTESIS INTRATECAL | |
| Neurólisis | 0,5-1,5 |
| Esclerosis múltiple | 0,25-0,5 |
| POR COMBINACIÓN DE LAS DOS SITUACIONES ANTERIORES | |
| Meningitis tuberculosas | 0,5-3,0 |
| Síndrome de Guillain-Barré | 1,0-4,0 |

puntos anteriores pueden ocurrir simultáneamente en algunas enfermedades neurológicas (3).

0.4 Causas de aumento de la concentración de proteína en el LCR (4) (tabla 1)

Los aumentos de la concentración de proteína en el LCR son más frecuentes que sus disminuciones. Pueden deberse a:

- 1) punción lumbar traumática, con mezcla de sangre periférica provocando un aumento en la concentración de proteína a expensas de proteínas plasmáticas.
- 2) mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica (inflamaciones e infecciones, trastornos metabólicos y tóxicos).
- 3) obstrucción a la libre circulación del LCR (compresiones medulares por tumor, hernia o absceso).
- 4) mayor síntesis proteica en el SNC (aumento de la síntesis de inmunoglobulinas por la presencia en el SNC de infiltrados linfoplasmocíticos, por ejemplo en la esclerosis múltiple).
- 5) degeneración tisular (enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica).

0.5 Causas de disminución de la concentración de proteína en el LCR (4)

El descenso en la concentración de proteína se encuentra en los procesos que provocan dilución del líquido, habitualmente por aumento de su velocidad de recambio, como los que se citan:

- 1) fuga de LCR por un desgarro dural (traumatismo craneoencefálico, punción lumbar previa, rinorrea u otorrea de LCR).
- 2) retirada de grandes volúmenes de LCR (neumoencefalografías).
- 3) aumento de la presión intracraneal (puede provocar una mayor filtración de LCR a través de las granulaciones aracnoideas).
- 4) hipertiroidismo (mecanismo no aclarado).

1 OBJETO

El objeto de este documento es proporcionar una serie de recomendaciones para ayudar al diagnóstico y seguimiento de las distintas enfermedades neurológicas que cursan con alteraciones de la concentración y de la composición proteica en el LCR.

2. DEFINICIONES

barrera hematoencefálica: separación anatómica entre la circulación general y el espacio cefalorraquídeo formada por el endotelio capilar, la vaina glial perivascular y la membrana pial (4)

banda oligoclonal: cada una de las zonas homogéneas que aparecen en la zona γ de la electroforesis de las proteínas del LCR, producidas por síntesis intratecal de inmunoglobulinas

NOTA: tiene valor semiológico la presencia de al menos dos bandas diferenciadas en esta región, distintas a las proteínas β -traza de síntesis local (sin función fisiológica conocida), y a las proteínas γ -traza de la familia de la cistatina, de síntesis intratecal (5)

esclerosis múltiple: enfermedad de etiología desconocida caracterizada por lesiones en la sustancia blanca del SNC, cuyo rasgo más característico es la pérdida de la mielina que rodea los axones, con escasa alteración de los mismos (6)

3 ESTUDIO PROTEICO DEL LCR

3.1 Proteína

El aumento de la concentración de proteína es la alteración más frecuentemente observada en el LCR. Este aumento es inespecífico pero indicativo de alguna enfermedad meníngea o parenquimatosa. Los aumentos de la concentración de proteína en el LCR se deben con mayor frecuencia a meningitis bacterianas y más raramente a otros procesos inflamatorios-infecciosos, tumores, hemorragias y enfermedades degenerativas. En ocasiones, por efecto de una obstrucción, se produce un líquido de alta concentración proteica que puede coagular espontáneamente (síndrome de Froin)(4). El estudio de la concentración de proteína en el LCR reviste interés para establecer el diagnóstico diferencial entre las meningitis bacterianas y las no bacterianas, siendo ésta la principal aplicación de la medición urgente de la concentración de proteína en el LCR, en pacientes que acuden con sintomatología neurológica aguda (3, 4).

Los valores de referencia de la concentración de proteína en el LCR varían con la edad y con el procedimiento de medida empleado (Tabla 2).

3.2 Albúmina

Aunque un aumento en la concentración de proteína en el LCR ya puede indicar una alteración de la barrera hematoencefálica, la albúmina constituye un buen marcador del intercambio entre el LCR y el plasma debido a su baja masa molar y a su capacidad de difusión a través de esta barrera. Además, se puede cuantificar por métodos más específicos y con mejor calidad metrológica que los utilizados para la concentración de proteína (3). Los valores de referencia de la concentración de albúmina en el LCR oscilan entre 120 y 320 mg/L (4).

Puesto que la albúmina es de síntesis hepática, toda la albúmina presente en el LCR procede del plasma. Por lo tanto, la relación entre las concentraciones de albúmina en el LCR y en el plasma refleja la integridad de la barrera hematoencefálica, según se indica en el punto 5. En condiciones normales, este índice debe ser inferior a 9 (2).

Tabla II. Valores de referencia de la concentración de proteína en el LCR

| PROTEÍNA | g/L |
|------------------------------|-------------|
| <i>Según el origen*</i> | |
| Ventricular | 0,050-0,150 |
| Cisternal | 0,150-0,250 |
| Lumbar | 0,150-0,450 |
| <i>Según la edad**</i> | |
| 1-30 días | 0,200-1,500 |
| 30-90 días | 0,200-1,000 |
| 3-6 meses | 0,150-0,500 |
| 0,5-10 años | 0,100-0,300 |
| 10-40 años | 0,150-0,450 |
| 40-50 años | 0,200-0,500 |
| 50-60 años | 0,250-0,550 |
| > 60 años | 0,300-0,600 |
| <i>Según el método*</i> | |
| Modificación del Biuret (36) | 0,140-0,620 |
| Turbidimetría (TCA) | 0,150-0,300 |
| Lowry | 0,250-0,450 |

TCA: ácido tricloroacético

*(2)

** (4)

3.3 Inmunoglobulinas

En condiciones normales, las inmunoglobulinas del LCR son mayoritariamente de procedencia plasmática, siendo su síntesis local (intratecal) muy baja (3 mg/día). La concentración de IgG en el LCR es normalmente inferior a 40 mg/L (2) y la de las otras clases de inmunoglobulinas muy inferior.

Los aumentos de la concentración de inmunoglobulinas en el LCR pueden acontecer por: 1) aumento policlonal o monoclonal de inmunoglobulinas en el suero, con paso de las mismas hacia el LCR, aún estando la barrera hematoencefálica intacta; 2) alteración de la barrera hematoencefálica, con mayor paso de inmunoglobulinas desde el plasma; y 3) aumento de la síntesis local (infecciones o inflamaciones agudas o crónicas, enfermedades desmielinizantes y autoinmunes)(3).

Para establecer la procedencia de las inmunoglobulinas cuantificadas en el LCR, se puede recurrir a la razón de IgG y a diversos índices (Tibbling, Tourtellotte, Link, etc.) comentados en el apartado 5. Mediante ellos, se puede conocer si existe un aumento de la síntesis intratecal de las distintas inmunoglobulinas, aunque habitualmente se aplican solamente a la IgG. La elevación del índice de IgG refleja la presencia y la actividad de linfocitos B locales; este índice adquiere especial importancia en el estudio de las enfermedades desmielinizantes del SNC, en particular en el de la esclerosis múltiple, dónde estos linfocitos se encuentran infiltrando las lesiones de las vainas de mielina. La IgM es la de aparición más precoz en la respuesta inmune y constituye un indicador válido para el diagnóstico y seguimiento de procesos infecciosos e inflamatorios del SNC (3). La medición de la concentración de IgA en el LCR ofrece poco valor clínico en enfermedades neurológicas (7).

3.4 Prealbúmina

Es una proteína de baja masa molar, que se encuentra en el LCR por paso desde el plasma y también por síntesis en los plexos coroideos ventriculares, por lo que su concentración relativa (con relación a la proteína total) es mayor en el LCR que en el plasma u otros líquidos biológicos. Su concentración es la misma en las zonas ventricular y lumbar (13-26 mg/L), aunque si

se expresa como porcentaje respecto a la proteína total, el porcentaje es mayor en la zona ventricular (14-19%) que en la zona lumbar (6%)(7).

Durante mucho tiempo, la prealbúmina se ha utilizado para confirmar las pérdidas de LCR: como se ha indicado, una proporción elevada de prealbúmina respecto a la proteína total en el fluido analizado constituye un criterio a favor de que la muestra remitida para estudio está contaminada con LCR. Actualmente, la utilización de la prealbúmina está siendo desplazada por la de la transferrina- τ en el establecimiento de las pérdidas de LCR (3).

3.5 Transferrina desializada

La isoforma de transferrina mayoritaria tanto en el suero como en el LCR es la nativa, tetrasializada, con movilidad electroforética β_1 . La transferrina- τ es una forma de transferrina desializada presente en LCR ya sea por acción de una neuraminidasa del SNC (internalización mediante receptores para la transferrina nativa situados en las células endoteliales de los capilares cerebrales, con un paso de desialización y posterior liberación al espacio extracelular), ya sea por síntesis intratecal (se ha aislado mRNA que codifica la transferrina en células del epitelio coroideo)(3). Además de hallarse en el LCR, esta proteína también se ha hallado en la perilinfa y en los humores acuoso y vítreo. La concentración de transferrina-t representa de un 15 a un 20% del total de transferrina en LCR (8). Las dos formas de transferrina se separan muy bien en la electroforesis, apareciendo más anódicamente la nativa (β_1 transferrina) y más catódicamente la transferrina- τ (β_2 transferrina), por la pérdida de residuos de ácido siálico. Puesto que la transferrina- τ no se encuentra normalmente en el suero, la presencia de transferrina- τ en una secreción debe hacer pensar en una posible contaminación por LCR. Es posible encontrar formas atípicas de transferrina en el suero de pacientes con hepatopatías (principalmente alcohólicas). Sin embargo, estas formas presentan movilidad intermedia al tratarse de moléculas parcialmente sializadas (disialotransferrina). Para evitar interpretaciones electroforéticas erróneas, es recomendable procesar simultáneamente el LCR y el suero del paciente, junto con un material de control de LCR (9-11).

La concentración de transferrina- τ en el LCR puede estar elevada en ciertas enfermedades neurológicas, por liberación de hidrolasas lisosomales como consecuencia de la muerte progresiva de las neuronas (12,13).

3.6 Proteína básica de la mielina

Es una proteína de baja masa molar que proviene de la degradación de las vainas de mielina, primariamente en esclerosis múltiple, leucodistrofias y otras enfermedades desmielinizantes, y secundariamente en infecciones, intoxicaciones y lesiones vasculares. En todos estos casos, la proteína básica de la mielina es liberada al espacio extracelular, pasando posteriormente al LCR, donde su concentración puede ser medida (14,15).

Aunque la proteína básica de la mielina no es específica de esclerosis múltiple, su cuantificación está indicada para: 1) seguir la actividad de la enfermedad (aumento de la concentración durante los brotes o exacerbaciones); 2) ayudar en el diagnóstico de la esclerosis múltiple previamente a la aparición de las bandas oligoclonales; y 3) asistir en el diagnóstico de la esclerosis múltiple en aquel 5-10% de pacientes en los cuales las bandas oligoclonales no aparecen nunca (14).

3.7 Otras proteínas

3.7.1 Proteína β -traza: es una proteína cuya síntesis tiene lugar en los plexos coroideos (16). Ha sido identificada recientemente como una prostaglandina sintasa (EC 1.14.99.1)(17). Su cuantificación por un método inmunoquímico presenta interés clínico en el diagnóstico diferencial de rinorreas y otorreas, al igual que la transferrina- τ (18). Su concentración en el LCR está aumentada en la esclerosis múltiple, en las enfermedades vasculo-cerebrales y en los tumores (19).

3.7.2 Proteína C reactiva: la concentración de proteína C reactiva también se puede medir en el LCR. Su concentración en LCR puede contribuir al diagnóstico diferencial entre las meningitis bacterianas y las víricas (20). Sin embargo, puesto que toda la proteína C reactiva es de síntesis hepática, su concentración en el LCR es un reflejo de la del suero, por lo que bastará con determinarla en este último sistema biológico (2,4).

3.7.3 Cistatina: es una proteína inhibidora de proteasas, de baja masa molar, presente en el LCR y en otros fluidos corporales. También es conocida como proteína γ -traza por el hecho de migrar en la zona γ de la electroforesis, dibujando una banda que no debe confundirse con un patrón oligoclonal (3, 21).

3.7.4 β_2 -Microglobulina: la medición de la concentración de esta proteína en el LCR ha demostrado ser de interés en situaciones asociadas con la activación o proliferación de los linfocitos en el SNC (linfoma metastásico, diseminación leucémica al SNC, demencia asociada a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana). Los valores de referencia de la concentración de β_2 -microglobulina en el LCR oscilan entre 0,6 y 2,1 mg/L (2, 4).

Son muchos otros los péptidos y las proteínas descritos en el LCR. Entre ellos se pueden citar la astroproteína (sintetizada por los astrocitos fibrilares, cuya concentración en el LCR aumenta en ciertos tumores gliales), la fibronectina, la ferritina, la proteína precursora del amiloide- β (13) o algunos péptidos cuya presencia en el LCR se relaciona con algunas enfermedades neurodegenerativas.

4 METODOLOGÍA

Los métodos utilizados para el estudio de proteínas en el LCR incluyen: 1) métodos para medir la concentración total de proteína, 2) métodos de separación proteica y 3) métodos inmunoquímicos para medir la concentración de proteínas específicas mediante anticuerpos contra cada tipo de proteína.

4.1 Métodos para medir la concentración de proteína

La medición exacta y precisa de la concentración de proteína en el LCR se ve dificultada por: 1) baja concentración proteica en el LCR, 2) presencia de diferentes proteínas que pueden reaccionar de manera distinta con el reactivo y 3) escaso volumen de muestra disponible (22).

Los métodos utilizados para determinar la concentración de proteína total en el LCR son diversos (2), no existiendo un criterio único de normalización que permita la elección de uno u otro. Cada laboratorio debe sopesar las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos, y adoptar el que más se ajuste a sus requerimientos clínicos y a sus recursos instrumentales.

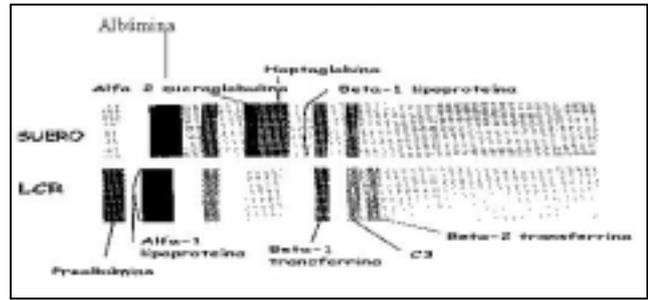


Figura 1. Comparación esquemática del proteinograma sérico y del de LCR concentrado.

Los métodos turbidimétricos con agentes precipitantes como el ácido sulfosalicílico son populares por ser rápidos, fáciles y por no requerir de instrumentos complicados. Su principal inconveniente es el de sobrevalorar la albúmina respecto a las globulinas. Los métodos espectrométricos con azul de Coomassie o rojo de pirogalol presentan inconvenientes similares; con el método de Lowry, el reactivo reacciona con sustancias nitrogenadas no proteicas. La espectrometría a 210-220 nm presenta varias ventajas, entre ellas una elevada sensibilidad y coeficientes de absorción similares para todas las proteínas. Sin embargo, es recomendable realizar un paso previo de filtración en gel con el fin de eliminar posibles interferentes. Otros métodos incluyen el de precipitación con ácido tricloroacético y rojo de Ponceau y posterior disolución con sosa, modificaciones del de biuret, etc. (4)

Los valores de referencia para la concentración de proteína en el LCR varían en función del procedimiento de medida utilizado (tabla 2)

4.2 Métodos de separación proteica

La finalidad de la separación de las proteínas del LCR es la detección de bandas oligoclonales. Los procedimientos más utilizados para su fraccionamiento son la electroforesis en acetato de celulosa o en gel de agarosa –seguida de inmunofijación– o en gel de poliacrilamida, y el isoelectroenfoco en gel de agarosa o en gel de poliacrilamida (2, 23-25). En los últimos años se están desarrollando métodos para estudiar las distintas fracciones de proteínas en el LCR mediante electroforesis capilar (26).

La separación de proteínas del LCR concentrado mediante electroforesis en gel de agarosa, el más utilizado de estos procedimientos, da lugar a las siguientes bandas (figura 1):

1.- *prealbúmina*: escasamente visible en el suero, se observa fácilmente en el LCR concentrado

2.- *albúmina*.

3.- α_1 : más difusa en el LCR que en el suero por desialización de la α_1 -antitripsina.

4.- α_2 : la α_2 -macroglobulina y la haptoglobina del suero no pasan al LCR, por lo que la región α_2 aparece débilmente teñida. Si ofrece un aspecto intenso y bien definido (parecido al que tiene esta banda en el suero), hay que pensar en alteración de la barrera hematoencefálica o en obtención del LCR por punción traumática.

5.- β : con 2 bandas: la más anódica, β_1 , corresponde a transferrina estructuralmente igual a la del suero, y la segunda, β_2 , corresponde a transferrina- τ desializada. La concentración del componente C3 del complemento en el LCR es baja.

6.- *gamma*: es la banda clínicamente más significativa, aunque en condiciones normales contiene poca proteína. En esta región, además de la mayoría de inmunoglobulinas, migra

Tabla III. Intervalos de referencia de la electroforesis de proteínas en el LCR.

| Fracción | % respecto a proteína |
|-----------------------|-----------------------|
| Prealbúmina | 2-7 |
| Albumina | 56-76 |
| α_1 -globulina | 2-7 |
| α_2 -globulina | 4-12 |
| β -globulina | 8-18 |
| γ -globulina | 3-12 |

también la cistatina o proteína γ -traza, que no debe confundirse con una banda oligoclonal.

Los valores de referencia del porcentaje de cada banda respecto al total de proteína se muestran en la tabla 3.

En la electroforesis de las proteínas del LCR pueden identificarse tres perfiles anormales (7): 1) patrón reflejo del suero, por mayor paso de una o varias proteínas anormalmente elevadas en el suero, estando la barrera hematoencefálica intacta (inflamación aguda, gammapatía monoclonal); 2) patrón similar al del suero, con paso de muy diversas proteínas como consecuencia de una alteración de la barrera hematoencefálica; y 3) patrón oligoclonal (las inmunoglobulinas sintetizadas por algunos clones de linfocitos B activados en el SNC tienen heterogeneidad restringida, dando lugar a las correspondientes bandas oligoclonales).

El isoelectroenfoque presenta mayor resolución y sensibilidad analítica que la electroforesis convencional, y permite trabajar con volúmenes de muestra menores y sin concentrar, aunque su interpretación puede ser más complicada. Al igual que en la electroforesis, la capacidad de detección de bandas oligoclonales del isoelectroenfoque depende del método de tinción empleado. Además, permite realizar una transferencia posterior sobre membrana de nitrocelulosa o sobre otro tipo de membrana para el posterior revelado inmunoenzimático de las bandas (27).

La electroforesis bidimensional se utiliza más con fines de investigación, interpretándose las proteínas o péptidos mediante mapas o bases de datos (28,29).

La mayoría de los estudios electroforéticos de las proteínas del LCR están dirigidos a la búsqueda de bandas oligoclonales. En la esclerosis múltiple, el patrón oligoclonal permanece inalterable e inmutable en el tiempo, mientras que la concentración de inmunoglobulinas puede variar con el tratamiento. Actualmente, la presencia de bandas oligoclonales en la electroforesis proteica del LCR es considerada de máxima utilidad para asistir al diagnóstico clínico de la esclerosis múltiple (30). La presencia de bandas oligoclonales en el LCR puede darse en ausencia de patrones oligoclonales en el suero. En este caso, puede tratarse de un proceso que provoca una respuesta inmune en el sistema nervioso central. Si además de hallarse en el LCR, las bandas oligoclonales aparecen de manera idéntica en el suero del paciente, se debe sospechar de la existencia de un proceso sistémico, con paso de inmunoglobulinas hacia el LCR. Finalmente, ante la aparición de bandas oligoclonales tanto en el LCR como en el suero, pero con bandas adicionales en el LCR, cabe pensar en un proceso sistémico con una respuesta inmune añadida a nivel del sistema nervioso central. Por lo tanto, estudiando en paralelo el LCR y el suero del paciente se puede evidenciar si el proceso en cuestión es específico del sistema nervioso central, si es sistémico, o bien si es sistémico con componente neurológico añadido (5).

Tabla IV. Enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, o que afectan a éste, asociadas a bandas oligoclonales (3)

| Enfermedad | Incidencia aproximada de bandas oligoclonales (%) |
|----------------------------|---|
| Esclerosis múltiple | 95 |
| PEES ¹ | 100 |
| Neurólúes | 95 |
| Neuro-SIDA | 80 |
| Neuro-lupus | 50 |
| Síndrome de Guillain-Barré | 60 |
| Adrenoleucodistrofia | 100 |
| Enfermedad de Lyme | 80 |

¹ Panencefalitis esclerosante subaguda

Hay que tener en cuenta que, en casos de alteración importante de la barrera hematoencefálica, las bandas oligoclonales pueden quedar eclipsadas o enmascaradas por el paso de inmunoglobulinas plasmáticas policlonales. Las bandas oligoclonales no son específicas de la esclerosis múltiple; existen diversas enfermedades que cursan con su aparición en el LCR (tabla 4).

4.3 Métodos inmunoquímicos

Los métodos inmunoquímicos permiten medir la concentración de distintas proteínas mediante la reacción con antisueros específicos para cada una. Los métodos inmunoquímicos más utilizados en la actualidad son la inmunonefelometría y la inmunoturbidimetría.

5 RELACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DEL LCR Y DEL SUERO

Existen varias fórmulas que, relacionando las concentraciones de diferentes proteínas en el LCR o las del LCR con las del suero, permiten evaluar el estado de la barrera hematoencefálica y la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. De ellas, las más utilizadas son: 1) el cociente de albúmina (31); 2) la razón de IgG (32); 3) el Índice de Link o de IgG (33); y 4) el cálculo de la síntesis intratecal diaria de IgG (fórmula de Tourtellotte) (34). Estos índices presentan su máxima utilidad en aquellos casos en que no queda demostrada la presencia de bandas oligoclonales en el LCR mediante estudios electroforéticos. Es aconsejable que las muestras de LCR y de suero se procesen en la misma serie analítica.

5.1 El cociente de albúmina relaciona las concentraciones de albúmina en el LCR (mg/L) y en el plasma (g/L). En adultos y en condiciones normales este cociente debe ser inferior a 9; valores entre 9 y 30 indican alteraciones moderadas de la barrera hematoencefálica; entre 30 y 100, alteraciones severas; y superiores a 100, indican pérdida de la integridad anatómica y funcional de esta barrera. En neonatos, los valores normales del cociente pueden ser superiores a los del adulto, debido a la inmadurez de la barrera hematoencefálica, tendiendo a igualarse a partir de los 6 meses.

$$\text{Cociente de Albúmina} = \frac{Alb_{LCR} \text{ (mg/L)}}{Alb_S \text{ (g/L)}}$$

5.2 La razón de IgG, descrita por Tourtellotte en 1971, representa el cociente entre las concentraciones de IgG y de albúmi-

na en el LCR. Se asume que un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica conduce a un aumento proporcional en las concentraciones en el LCR tanto de albúmina como de IgG. Por lo tanto, esta razón no debería modificarse ante alteraciones aisladas de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Contrariamente, se eleva si existe un aumento de síntesis intratecal de inmunoglobulinas. El valor de esta razón en adultos sanos es inferior a 0,25; valores por encima de 0,27 son indicativos de síntesis intratecal de IgG (hasta un 70% de pacientes con esclerosis múltiple presenta valores superiores a 0,27).

$$\text{Ratio de IgG} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}} (\text{mg/L})}{\text{Alb}_{\text{LCR}} (\text{mg/L})}$$

Existen sin embargo situaciones en que se dan simultáneamente alteraciones de permeabilidad de la barrera hematoencefálica y aumento de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Para discriminar correctamente si el aumento de concentraciones de IgG en el LCR es debido al primer proceso o al segundo, se utiliza el Índice de Link.

5.3 El índice de Link o de IgG establece una corrección para eliminar la contribución o el efecto del paso de las inmunoglobulinas plasmáticas hacia el sistema nervioso central en condiciones de funcionalismo normal de la barrera hematoencefálica, teniendo en cuenta a la vez el paso de proteínas por alteración de esta barrera. Constituye el indicador más utilizado de todos los índices establecidos mediante la medición de las concentraciones de las distintas proteínas en el LCR y en el plasma.

$$\text{Índice de IgG} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}} \cdot \text{Alb}_{\text{S}}}{\text{IgG}_{\text{S}} \cdot \text{Alb}_{\text{LCR}}}$$

El intervalo de referencia del índice de Link se sitúa entre 0,3 y 0,7; valores superiores a 0,7 indican aumento de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. En aproximadamente un 90% de pacientes con esclerosis múltiple, el índice de Link es superior a 0,7.

Es importante recordar que en la detección de síntesis intratecal de inmunoglobulinas, la medición de sus concentraciones proporciona una menor información que el estudio cualitativo de este tipo de proteínas (bandas oligoclonales). En todo caso, se recomienda expresar los resultados cuantitativos de la concentración de inmunoglobulinas referidos a la concentración de otras proteínas como la albúmina, y conjuntamente con la búsqueda de bandas oligoclonales.

5.4 Existen otras fórmulas que calculan la síntesis intratecal de IgG por día o por litro, mucho más complejas y no más útiles que el índice de Link. El índice de Tourtellotte evalúa la tasa de formación diaria de IgG en el sistema nervioso central:

$$\text{IgG} (\text{mg/día}) = 0,5 \left[\left[\text{IgG}_{\text{LCR}} - \frac{\text{IgG}_{\text{S}}}{369} \right] - \left[\text{Alb}_{\text{LCR}} - \frac{\text{Alb}_{\text{S}}}{230} \right] \cdot \left[\frac{0,43 \cdot \text{IgG}_{\text{S}}}{\text{Alb}_{\text{S}}} \right] \right]$$

Todas las concentraciones están expresadas en mg/L. El valor 0,5 indica la cantidad de LCR producido por día (500 mL o 0,5 L). El primer término entre corchetes representa la diferencia entre la concentración de IgG hallada en el LCR y la que

cabría esperar en condiciones normales de funcionamiento de la barrera hematoencefálica. El segundo término entre corchetes representa el mismo concepto para la albúmina; este término se corrige por un factor que corresponde a la relación existente entre la masa molar de la albúmina y la de la IgG, que es de 0,43, asumiendo que por cada mol de albúmina hay 1 mol de IgG que le acompaña a través de su paso por la barrera. Los valores 369 y 230 representan los cocientes entre las concentraciones de IgG en el suero y en el LCR, y las concentraciones de albúmina en el suero y en el LCR en individuos sanos, respectivamente. Resultados superiores a 3,3 mg/día indican que la tasa de formación intratecal de IgG está aumentada (2). Tales valores se hallan en la mayoría de casos de esclerosis múltiple (90%). Este índice no proporciona ningún valor adicional al índice de Link.

6 ESPÉCIMEN

La medición de la concentración de las proteínas (total o específicas) del LCR debe realizarse de manera inmediata después de la recepción de la muestra.

Si se emplea la electroforesis convencional para el estudio cualitativo, el LCR debe concentrarse entre 50 y 100 veces por métodos de ultrafiltración hasta obtener una concentración de proteína de 25-40 g/L. Para este propósito, el LCR puede conservarse hasta 3 días a 2-8 °C.

Es necesaria la obtención de muestras simultáneas de suero y de LCR si se va a investigar la presencia de bandas oligoclonales (35) y para calcular los distintos índices.

7 PROPUESTA DE UN ALGORITMO DE ESTUDIO PROTEICO DE LAS ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES

(ver figura 2).

8 RECOMENDACIONES Y CONCLUSIONES

8.1 Para establecer un diagnóstico diferencial entre enfermedades neurológicas, la medición de la concentración de proteína en el LCR es escasamente útil, a excepción de aquellas situaciones que conducen a inflamación meníngea o a alteraciones del libre flujo de LCR. Concretamente, y en referencia al diagnóstico diferencial de las meningitis bacterianas frente a las bacterianas, es importante recordar que (36):

- en las meningitis agudas bacterianas, la concentración de proteína en el LCR suele ser superior a 1,5 g/L.
- la concentración de proteína en el LCR puede estar dentro del intervalo de referencia hasta en un 10% de las meningitis agudas bacterianas.
- la concentración de proteína en el LCR puede no estar elevada al inicio de distintos tipos de meningitis.
- sólo un 1% de las meningitis víricas cursa con concentraciones de proteína en el LCR superiores a 1,7 g/L, frente a un 50% de los casos de meningitis agudas bacterianas.

8.2 La detección de bandas oligoclonales en el LCR por un método u otro de separación proteica es imprescindible para confirmar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas que se

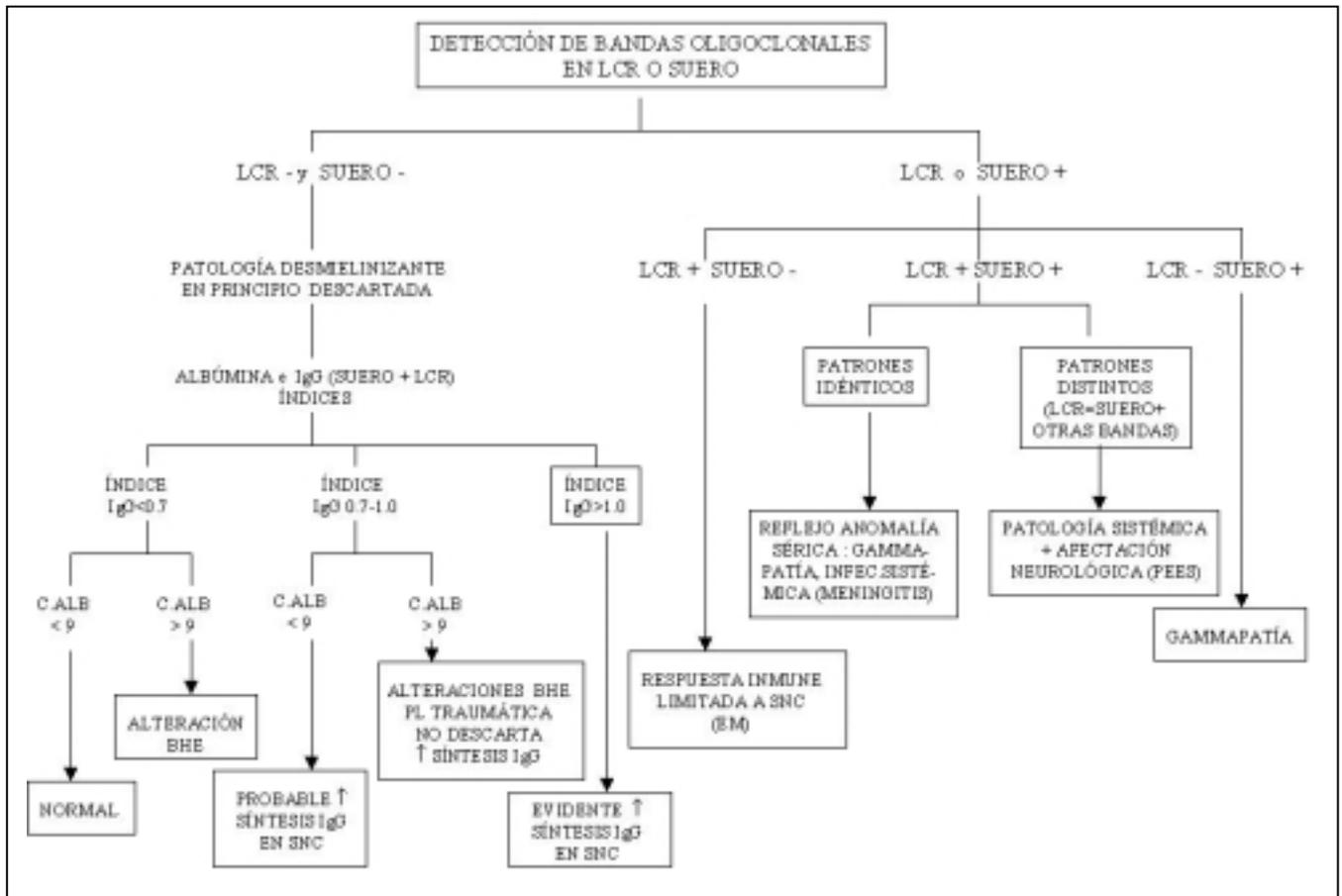


Figura 2. Estudio proteico LCR
 BHE: barrera hematoencefálica
 C.ALB: cociente de albúmina
 EM: esclerosis múltiple
 IgG: inmunoglobulina G
 LCR: líquido cefalorraquídeo
 PEES: panencefalitis esclerosante subaguda
 PL: punción lumbar
 SNC: sistema nervioso central
 ↑: incremento

produce en la esclerosis múltiple. La electroforesis convencional del LCR concentrado ofrece una capacidad de detección de bandas oligoclonales inferior a la de la electroforesis en gel de poliacrilamida, el isoelectroenfoque o la inmunofijación. La confirmación de la presencia de bandas oligoclonales y la identificación de las inmunoglobulinas que contienen se realiza de manera adecuada mediante inmunofijación o inmunotransferencia empleando anticuerpos específicos de las diferentes cadenas proteicas de las inmunoglobulinas.

8.3 Para confirmar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas, el estudio electroforético debe complementarse con los análisis cuantitativos de inmunoglobulinas, específicos y con buena calidad metrológica.

8.4 En la esclerosis múltiple, el patrón de bandas oligoclonales en el LCR es característico de cada paciente y permanece inalterable en el tiempo, mientras que la concentración de inmunoglobulinas en el LCR puede afectarse por efecto del tratamiento. En la esclerosis múltiple:

- un 95% de pacientes presenta bandas oligoclonales en el LCR.
- un 90% de pacientes presenta un Índice de Link o de IgG superior a 0,7.
- un 90% de pacientes presenta una tasa de síntesis diaria de IgG superior a 3,3 mg/día.

- un 75% de pacientes presenta una razón IgG/albúmina en el LCR superior a 0,27.
- un 90% de pacientes presenta concentraciones elevadas de proteína básica de la mielina en el LCR durante los brotes de la enfermedad, pero no en los períodos de remisión.
- una concentración de proteína en el LCR superior a 1 g/L hace poco probable el diagnóstico de esclerosis múltiple.

8.5 Para establecer la posible pérdida de LCR en rinorreas u otorreas, la demostración de la presencia de transferrina- τ por métodos de separación de proteínas (electroforesis e inmunofijación) constituye un procedimiento adecuado, estando altamente recomendado el procesamiento en paralelo del LCR y del suero del paciente.

8.6 Los procedimientos de electroforesis bidimensional, hasta ahora empleados en investigación bioquímica, permiten detectar e identificar una amplia gama de proteínas y péptidos en el LCR y asociarlos a diferentes procesos neurológicos. En los últimos años se están comunicando relaciones entre el hallazgo por estas técnicas de algunos péptidos en el LCR y diferentes cuadros neuropsiquiátricos, que permiten aclarar su etiología a la vez que proporcionan nuevos datos para su diagnóstico y seguimiento.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Beetham R. Investigation of cerebrospinal fluid. En: Marshall WJ, Bangert SK, Eds. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical aspects*. New York: Churchill and Livingstone, 1995: 557-68.
2. Silverman LM and Christenson RH. Proteins in cerebrospinal fluid. En: Burtis CA, Ashwood ER, Eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994: 723-34.
3. Thompson EJ and Keir G. Laboratory investigation of cerebrospinal fluid proteins. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 425-35.
4. Kjeldsberg CR y Krieg AF. Líquido cefalorraquídeo y otros líquidos corporales. En: Davidson I, Henry JB, eds. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. Barcelona: Salvat, 1988: 569-611.
5. Keren D. Approaches to pattern interpretation in cerebrospinal fluid and urine. En: Butterworth-Heinemann, Eds. *High resolution electrophoresis and immunofixation: techniques and interpretation*. Newton, 1994: 131-46.
6. Alfaro A. Anomalías del desarrollo del sistema nervioso central. En: Rozman C, dir. *Medicina Interna*. Barcelona: Doyma, 1988: 1442-3.
7. Nespolo A, y Aguzzi F. Le proteine del liquor e l'elettroforesi delle proteine liquorali. *Biochimica Clinica* 1989; 13: 159-64.
8. Nandapalan V., Watson ID, y Swift AC. Beta-2-transferrin and cerebrospinal fluid rhinorrhoea. *Clin Otolaryngol* 1996; 21: 259-64.
9. Roelandse Freek WC, Van der Zwart N, Didden JH, Van Loon J and Souverijn J. Detection of CSF leakage by isoelectric focusing on polyacrylamide gel, direct immunofixation of transferrins and silver staining. *Clin Chem* 1998; 44: 351-3.
10. Middelweerd MJ, De Vries N, Calliauw J and Van Kamp GJ. A new biochemical assay in the diagnostic management of nasal cerebrospinal fluid leakage. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995; 252: 336-9.
11. Zaret DL, Morrison N, Gulbranson R and Keren D. Immunofixation to quantify β -2 transferrin in cerebrospinal fluid to detect leakage of cerebrospinal fluid from skull injury. *Clin Chem* 1992; 38: 1909-12.
12. Franciotta D, Di Enrica P, Tinelli C and Melzi d'Eril G. Protein tau in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer Disease. *Clin Chem* 1998; 44: 357-8.
13. Knight JA. Advances in the analysis of cerebrospinal fluid. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27(2): 93-104.
14. Mc Bride LJ. Cerebrospinal fluid analysis. En: *Textbook of Urinalysis and Body Fluids*. Philadelphia: Lippincott, Eds., 1998: 195-218.
15. Whitaker JN. Indicators of disease activity in MS: studies of myelin basic protein-like materials. *Ann NY Acad Sci*. 1985; 436: 140-50.
16. Dorta-Contreras AJ, Reiber H, Agüero-Valdés E, Interían-Morales MT, Mechualm-Cohen A, Noris-García E. Proteína beta traza en líquido cefalorraquídeo y suero en meningoencefalitis. *Rev Neurol* 1998; 26 (151): 386-8.
17. Hoffmann A, Conradt HS, Gropss G, Nimtz M, Lottspeich F and Wurster U. Purification and chemical characterization of β -trace protein from human cerebrospinal fluid: its identification as prostaglandin D synthase. *J Neurochem* 1993; 61 (2): 451-6.
18. Felgenhauer K, Schadlich HJ and Nekic M. b-trace protein as marker for cerebrospinal fluid fistula. *Klin Wochenschr* 1987; 65 (16): 764-8.
19. Tumani H, Nau R, Felgenhauer K. β -trace protein in cerebrospinal fluid: a blood-CSF barrier-related evaluation in neurological diseases. *Ann Neurol* 1998; 44 (6): 882-9.
20. Stearman M and Southgate HJ. The use of cytokine and C-reactive protein measurements in cerebrospinal fluid during acute infective meningitis. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 255-61.
21. Davidsson P, Ekman R and Blennow K. A new procedure for detecting brain-specific proteins in cerebrospinal fluid. *J Neural Transm* 1997; 104: 711-20.
22. Karlsson B and Alling C. A comparative study of three approaches to the routine quantitative determination of spinal fluid total proteins. *Clin Chim Acta* 1980; 105: 65-73.
23. Jackson G. Cerebrospinal fluid proteins fractionation. En: Pesce AJ, Kaplan LA, Eds. *Methods in Clinical Chemistry*. St. Louis: Mosby, 1987: 656-60.
24. Barnard K, Herold R, Siemes H and Siegert M. Quantification of cerebrospinal fluid proteins in children by high-resolution agarose gel electrophoresis. *J Child Neurol* 1998; 13: 51-8.
25. Mashige F, Shimuzu T, Ijima S and Okhubo A. Analysis for cerebrospinal fluid proteins by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Chem* 1992; 38 (10): 2008-12.
26. Sanders E, Katzmann JA, Clark R, Oda RP, Shihabi Z and Landers J. Development of capillary electrophoresis as an alternative to high resolution agarose electrophoresis for the diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1998; 37(1): 37-45.
27. Keir G, Luxton RW and Thompson EJ. Isoelectric Focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 436-43.
28. Wiederkehr F. Analysis of cerebrospinal fluid proteins by electrophoresis. *Journal of Chromatography* 1991; 569: 281-96.
29. Yun M, Wu W, Hood L and Harrington M. Human cerebrospinal fluid protein database: edition 1992. *Electrophoresis* 1992; 13: 1002-13.
30. Harrington MG, Merrill CR. Cerebrospinal fluid protein analysis in diseases of the nervous system. *Journal of Chromatography* 1988; 429: 345-58.
31. Scheip G, Felgenhauer K. Serum-CSF protein gradient, the blood CSF barrier and the local immune response. *J Neurol* 1978; 281: 77-96.
32. Tourtellotte WW, Tavolato B, Parker JA et al. Cerebrospinal fluid electroimmunodiffusion. An easy, rapid, sensitive, reliable and valid method for the simultaneous determination of immunoglobulin-G and albumin. *Arch Neurol* 1971; 25: 345-50.
33. Link H and Tibbling G. Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders. II. Relation of the concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977; 37: 391-6.
34. Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO, Murthy KN, Levy J, Syndulko K, Potvin JH. Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology* 1980; 30: 240-4.
35. Patient preparation and specimen handling, 1991. Committee on patient preparation and specimen handling. College of American Pathologists.
36. Lott JA, Warren P. Estimation of reference intervals for total protein in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1989; 35: 1766-70.

Correspondencia:
SEQC
Comisión de Proteínas
c/ Padilla, 323-325
08025 Barcelona