

	Diretrizes	Dir.:
		SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL

<b>PRODUTO: Diretrizes para a Avaliação Laboratorial de Pacientes com Gamopatias Monoclonais – Pesquisa de Paraproteínas (Proteína M)</b>			
<b>TAREFA: Avaliar Laboratorialmente Pacientes com Gamopatias Monoclonais</b>			
<b>UNIDADE EXECUTORA</b> SCBIO	<b>DATA DE EMISSÃO</b> 2003	<b>REVISÃO N.º:</b> 00	<b>DATA DA REVISÃO</b>

## 1. Mnemônico(s)

PRPA (Pesquisa de Paraproteínas)

## 2. Sinonímia

Eletroforese de alta resolução do soro + Eletroforese de alta resolução da urina + Imunofixação de proteínas do Soro (se indicado) + Imunofixação de Proteínas da Urina (se indicado) + Dosagem de Imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) se indicado.

Nota: Esse protocolo substitui os exames “pesquisa de proteínas de Bence Jones” e Imunoeletroforese.

## 3. Introdução

### 3.1. O Protocolo do SVPCL - IPSEMG

Estas recomendações são fruto da elaboração de informações derivadas de diretrizes para a prática clínica de painéis de especialistas para a avaliação clínica e laboratorial de pacientes suspeitos de terem uma condição clínica que origine proteína monoclonal no soro e/ou urina (paraproteína). Estas recomendações descrevem as condições clínicas nas quais uma proteína monoclonal deve ser pesquisada, a seqüência ótima de testes para diagnóstico e acompanhamento destes pacientes, e os mais efetivos procedimentos laboratoriais. O Serviço de Patologia Clínica do HGIP (IPSEMG), em fase de implantação das metodologias Eletroforese de Alta Resolução e Imunofixação de Proteínas criou o perfil chamado “Pesquisa de Paraproteínas”. De posse dessa requisição, o laboratório procede à Eletroforese de Alta Resolução em soro e urina. Caso sejam detectadas bandas suspeitas de proteína monoclonal, realiza-se a imunofixação (IgG-IgM-IgA-kappa-lambda) e a dosagem das Imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) por nefelometria. O intercâmbio de informações entre o laboratório e o médico é muito recomendável, tanto antes da indicação quanto para o seguimento dos casos.

<b>A P R O V A Ç Ã O</b>
<b>ASS. E CARIMBO:</b>

3.2. Bases fisiopatológicas

As moléculas das imunoglobulinas são formadas por duas cadeias pesadas idênticas (H) e duas cadeias leves idênticas (L), conforme diagrama abaixo:

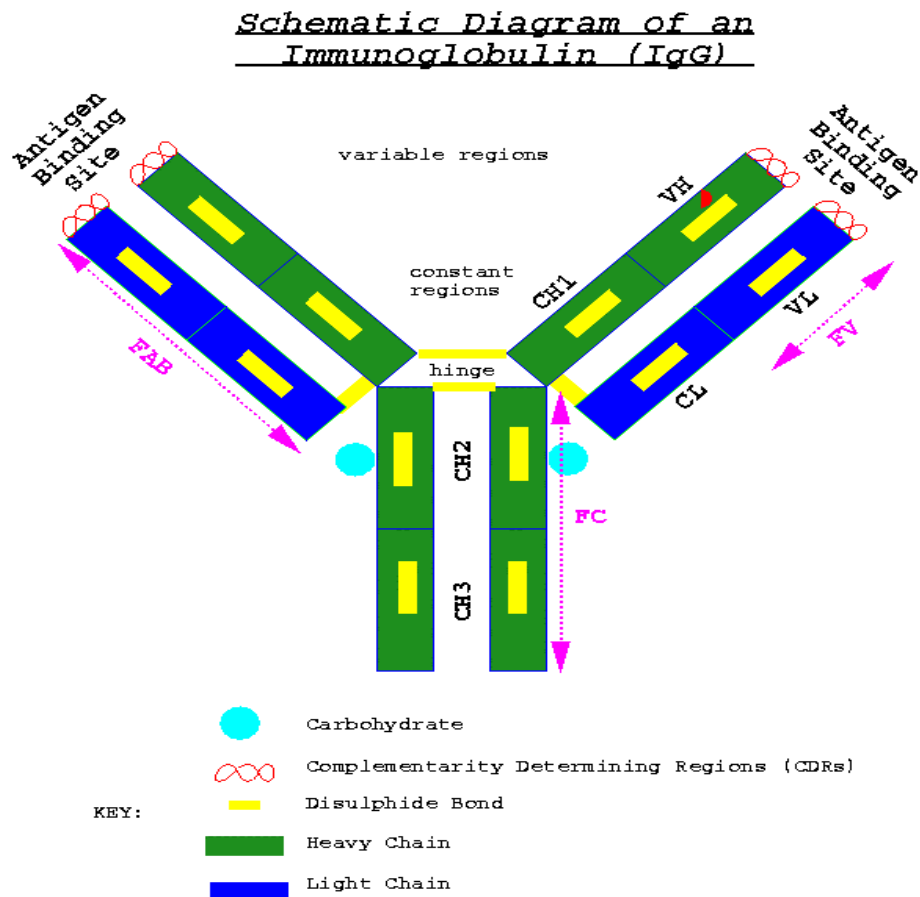


Diagrama esquemático de uma imunoglobulina Tipo IgG

APROVAÇÃO

ASS. E CARIMBO:

	Diretrizes	Dir.:
		SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL

As cadeias H podem apresentar 5 especificidades e as cadeias leves, duas. Ver Tabela 1.

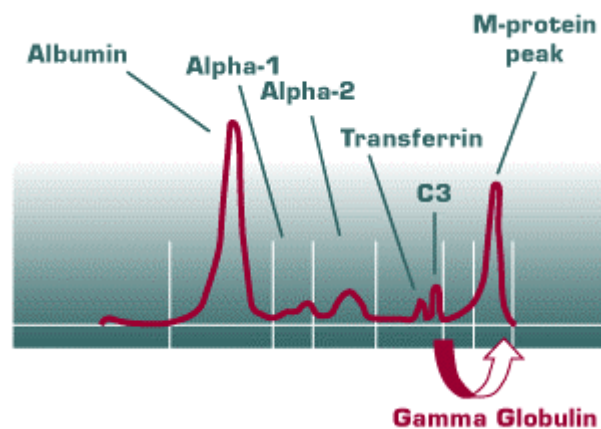
**Tabela 1 – Cadeias das Imunoglobulinas**

Cadeias Pesadas (H)		Cadeias Leves (L)	
μ	IgM	κ	Kappa
γ	IgG	λ	Lambda
α	IgA		
δ	IgD		
ε	IgE		

As cadeias leves são produzidas independentemente e em excesso para sua incorporação às imunoglobulinas, na proporção  $\kappa : \lambda = 2 : 1$ .

Um único clone de célula plasmática produz uma única imunoglobulina. Contudo, a Proteína M (paraproteína), pode consistir de:

- Polímero de Imunoglobulinas;
- Monômero de imunoglobulina;
- Fragmentos de imunoglobulinas (geralmente cadeia leve = Proteína de Bence Jones);
- Raramente: cadeias pesadas ou meia molécula.



**Figura1: Corrida eletroforética mostrando um pico monoclonal**

## 4. Princípios dos testes

### 4.1. Eletroforese de Alta Resolução

Modificação do processo tradicional de eletroforese que utiliza um tampão de força iônica relativamente mais intensa ( $I=0,075$ , pH 8,6) em um mistura com lactato de cálcio em gel de agarose 8g/L e com redução da temperatura do sistema para 10 a 14 graus C. Em

A P R O V A Ç Ã O

ASS. E CARIMBO:

	<b>Diretrizes</b>	<b>Dir.:</b>
		<b>SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL</b>

para pessoas normais obtém-se 13 bandas, e uma ou mais de 8 bandas são possíveis em condições patológicas.

#### 4.2. Imunofixação

A Eletroforese com Imunofixação (IFE) é um procedimento em dois estágios que utiliza eletroforese de alta resolução no primeiro estágio e imunoprecipitação no segundo. As proteínas são primeiro separadas por eletroforese. No segundo estágio, o antígeno e anticorpo solúveis são colocados em contato para reagir. Os anticorpos que podem ser utilizados são para: IgG, IgA, IgM, Cadeia leve Kappa e Cadeia leve Lambda. Os complexos antígeno-anticorpo resultantes se tornam insolúveis (desde que o anticorpo esteja em leve excesso ou próximo à equivalência) e se precipitam. As proteínas que não reagiram são removidas por lavagem e o complexo Ag-Ac pode ser corado, sendo as bandas da eletroforese comparadas às obtidas por imunofixação. A maioria das proteínas monoclonais migra na região catódica (gama), mas, devido à sua anormalidade, podem migrar em qualquer região das globulinas à eletroforese. As bandas de proteínas monoclonais ao padrão da imunofixação ocuparão a mesma posição de migração e terão a mesma forma observada no eletroforetograma de referência. A proteína anormal será identificada pelo anti-soro correspondente usado. Uma banda correspondente à Proteína C-reativa pode ser detectada em pacientes com resposta inflamatória aguda, sob a forma de uma banda estreita ao final da extremidade catódica.

#### 4.3. Nefelometria

A nefelometria é um sistema de detecção de energia luminosa desviada ou refletida para um detector que não está em linha direta com a luz transmitida. É usada para quantificar complexos antígeno-anticorpo que se formam entre um componente protéico do soro e o anticorpo específico reagente.

#### 4.4. Proteinúria de 24 horas

Dosagem quantitativa das proteínas totais em urina de períodos (geralmente 24 horas). Os métodos mais usuais são os baseados em ligação a corantes devido à praticidade. Geralmente, não são lineares e não têm a mesma sensibilidade para todas as proteínas, subestimando as cadeias leves das imunoglobulinas.

#### 4.5. Crioglobulinemia

A crioglobulina é uma proteína sérica que se precipita em temperaturas abaixo da temperatura corporal (37 graus C). A maioria das crioglobulinas é um complexo de imunoglobulinas policlonais, mas quase 50% são monoclonais, em geral IgM. Para a verificação da presença das crioglobulinas por precipitação, é essencial a fase pré-

A P R O V A Ç Ã O

ASS. E CARIMBO:

	<b>Diretrizes</b>	<b>Dir.:</b>
		<b>SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL</b>

analítica, para que a temperatura da amostra não se reduza para menos de 37 graus C em nenhum momento.

## 5. Aplicações clínicas da Pesquisa de Paraproteínas

As condições clínicas associadas a uma proteína monoclonal (paraproteína ou proteína-M) em soro ou urina podem ser agrupados separadamente como: plasmacíticas, linfocíticas, proteína infiltrativa ou miscelânea. O estudo das proteínas plasmáticas e urinárias é fundamental para o diagnóstico das neoplasias de células plasmáticas.

A apresentação clínica é pleomórfica, mas geralmente inclui:

- Dores ósseas, especialmente no dorso, como sintoma de destruição óssea. Pode haver perda de estatura, dor lombar inexplicada e persistente, osteoporose em homens e mulheres pré-menopausa e sintomas compatíveis com compressão de raiz nervosa;
- Infecções recorrentes e anemia por depressão imunitária e/ou da função medular. Anemia normocítica normocrômica arregenerativa e homogênea, neutropenia e/ou trombocitopenia;
- Aumento persistente da velocidade de hemossedimentação ou da viscosidade plasmática. Síndrome de hiperviscosidade. Alterações de fundo de olho;
- Lesão renal causada pela excreção da proteína de Bence Jones, hiperviscosidade e hipercalemia.

### Tabela 2 – Critérios para Diagnóstico de Pacientes com Mieloma Múltiplo

#### Critérios para diagnóstico de Mieloma Múltiplo

##### Critérios Maiores:

- 5.5.1. Plasmacitomas à biópsia tissular
- 5.5.2. Plasmacitose ao mielograma (>30% de células plasmáticas)
- 5.5.3. Pico monoclonal de imunoglobulinas à eletroforese  
IgG>3,5 g/dl ou IgA>2,0 g/dl; excreção de cadeias leves Kappa ou Lambda >1,0 g/dia à eletroforese de proteínas na urina de 24 h.

##### Critérios Menores:

- 5.5.3.1.1.1.1. Plasmacitose ao mielograma (10 a 30% de células plasmáticas)
- 5.5.3.1.1.1.2. Pico monoclonal de imunoglobulinas presente, mas de menor magnitude que os descritos acima.
- 5.5.3.1.1.1.3. Lesões osteolíticas
- 5.5.3.1.1.1.4. IgM normal < 50 mg/dl, IgA normal < 100 mg/dl, IgG normal < 600 mg/dl

#### A P R O V A Ç Ã O

ASS. E CARIMBO:

**Conjunto de critérios (Durie e Salmon)**

- Quaisquer dois critérios maiores
- Critério maior 1 mais critério menor b, c ou d
- Critério maior 3 mais critério menor a ou c
- Critério menor a, b e c ou a, b e d.

**Mieloma indolente (mesmo que mieloma exceto)**

Lesões ósseas ausentes ou limitadas  
Componente M – (a) IgG < 7 g/dL; (b) IgA < 100 mg/dL  
Sem sintomas ou sinais associados

**Tabela 3 - Características Laboratoriais de Apresentação do Mieloma Múltiplo**

30% Hipercalcemia  
88% Proteinúria  
49% Proteinúria de Bence Jones  
76% Pico monoclonal à eletroforese de proteínas séricas  
9% Hipogamaglobulinemia  
15% Normais ou com pequenas alterações à eletroforese de proteínas séricas  
75% Pico monoclonal à eletroforese de proteínas urinárias  
83% Cadeia pesada monoclonal à imunoeletroforese de proteínas séricas  
8% Cadeia leve monoclonal à imunoeletroforese de proteínas séricas  
0,3% Não secretórios  
7% Amiloidose

**Tabela 4 - Avaliação de Rotina, Pré-Tratamento**

Hemograma completo e contagem de plaquetas  
Proteinúria de 24 horas  
Eletroforese de alta definição de proteínas séricas (+ Imunofixação se indicado)  
Eletroforese de alta definição de proteínas urinárias (+ Imunofixação se indicado)  
Tipagem antigênica de imunoglobulinas monoclonais em soro e urina por imunofixação (ou imunoeletroforese)  
Beta2-Microglobulina sérica (se função renal preservada)  
Mielograma e Biópsia de Medula  
Creatinina, Cálcio Total e iônico, Eletrólitos, Ácido Úrico, Função Hepática  
Rx Tórax, Rx Esqueleto, Eletrocardiograma  
Exame de Fundo de Olho (para avaliar viscosidade)

**A P R O V A Ç Ã O****ASS. E CARIMBO:**

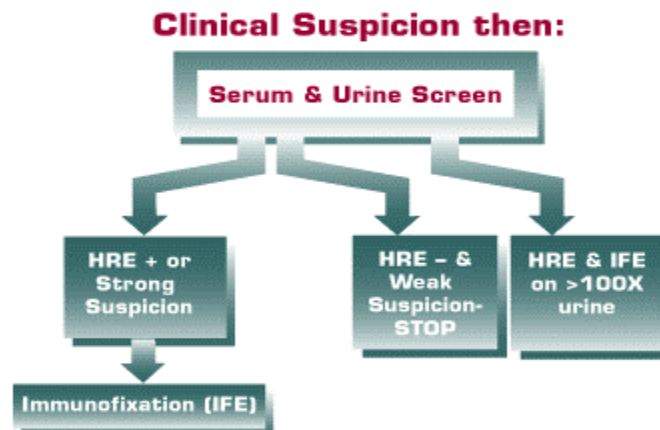


Figura 2 - Fluxograma sugerido para a Pesquisa de Paraproteína

## 6. Pesquisa e quantificação de M-proteínas (Pesquisa de Paraproteínas)

### 6.1. Eletroforese de alta resolução de soro e urina

Indicada para todos os pacientes suspeitos de discrasia de céls. plasmáticas. O gel deve ser examinado diretamente pelo interpretador. Este procedimento é útil, mais comumente, a desordens clínicas que sugerem mieloma múltiplo, macroglobulemia de Waldenstrom ou amiloidose, mas também incluem condições menos freqüentes como: plasmacitoma solitário, Síndrome *POEMS*, D. de Cadeia Pesada e doenças de deposição de imunoglobulinas. A densitometria para quantificação está indicada em todos os casos com presença de M-proteínas.

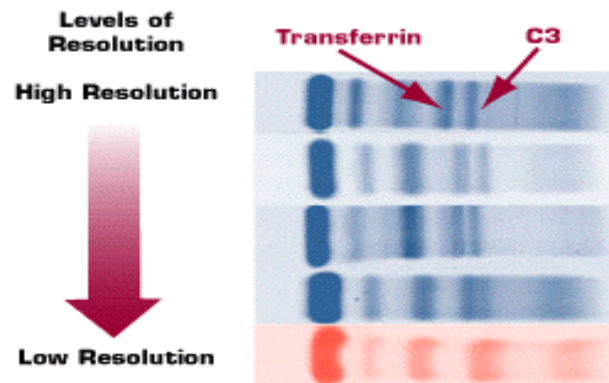


Figura 3: Variação da resolução à eletroforese

APROVAÇÃO

ASS. E CARIMBO:

	<b>Diretrizes</b>	<b>Dir.:</b>
		<b>SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL</b>

### 6.1.1. Repetição da eletroforese de alta resolução de soro e urina

As alterações nos níveis de M-proteínas previamente identificadas em soro e urina por repetição da eletroforese de alta resolução está indicada, a intervalos regulares, a cada 1 a 2 meses em pacientes com Mieloma Múltiplo, Macroglobulinemia de Waldenstrom ou amiloidose e a cada ano para pacientes com gamopatia monoclonal de significado indeterminado

### 6.2. Eletroforese de baixa resolução

Uso desaconselhado.

## 7. Definição do tipo de M-Proteína

### 7.1. Imunofixação

Indicada para definir o tipo de proteína anormal. Mesmo com a eletroforese de alta resolução negativa, a imunofixação com anti-soros anti cadeias leves Kappa e Lambda pode ser útil para a detecção de pequenas quantidades de M-proteína em casos onde se suspeita de discrasia de células plasmáticas. A imunofixação não está indicada em casos óbvios de gamopatia policlonal à eletroforese de alta resolução. Quando há elevação policlonal assimétrica, a imunofixação pode ser útil após contato entre o laboratório e o médico assistente.

#### 7.1.1. Repetição da Imunofixação

A imunofixação não deve ser repetida a menos que haja alteração na migração eletroforética, haja um pico adicional ou para confirmação de remissão completa após o tratamento.

### 7.2. Imunoeletroforese

Uso desaconselhado.

## 8. Quantificação de Imunoglobulinas

### 8.1. Nefelometria

A presença de M-proteína deve ser seguida por sua quantificação densitométrica, a não ser em casos em que a M-proteína, em baixa concentração, está obscurecida por outras proteínas. Nestes casos, a quantificação das imunoglobulinas por nefelometria pode ser mais exata. Para todos os pacientes com discrasia de células plasmáticas, a dosagem direta das imunoglobulinas por nefelometria está indicada, ao diagnóstico, para definição do nível das imunoglobulinas não envolvidas. A nefelometria não deve

### A P R O V A Ç Ã O

**ASS. E CARIMBO:**

	<b>Diretrizes</b>	<b>Dir.:</b>
		<b>SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL</b>

ser usada como único método para a triagem de pacientes quanto à presença de M-proteínas.

### **8.2. Imunodifusão radial**

Uso desaconselhado.

## **9. Pesquisa de cadeias leves livres na urina**

### **9.1. Proteinúria de 24 horas + Eletroforese de alta resolução com medida densitométrica de pico de cadeia leve em urina concentrada 100x + Imunofixação**

Todos os pacientes com Mieloma Múltiplo, Macroglobulinemia de Waldenstrom, Amiloidose e desordens relacionadas devem ser avaliados quanto à presença, tipo e excreção diária de cadeias leves monoclonais livres.

### **9.2. Proteinúria à tira reagente, ao ácido sulfossalicílico e à precipitação pelo calor (Bence Jones)**

Uso desaconselhado

## **10. Estudo da viscosidade do sangue**

### **10.1. Determinação da viscosidade do sangue + eletroforese de proteínas séricas**

A síndrome da hiperviscosidade requer a troca de plasma de emergência com indicação baseada em dados clínicos. Estes exames devem ser feitos antes da primeira plasmaferese para ser feita a correlação entre os níveis de M-proteína e os sintomas, úteis para a indicação das próximas plasmafereses.

### **10.2. Exame de fundo de olho**

Na ausência de metodologia específica para a determinação da viscosidade, o exame de fundo de olho pode fornecer elementos úteis.

## **11. Pesquisa de crioglobulinas**

### **11.1. Crioglobulinemia**

Deve ser realizada em todos os pacientes com M-proteína e complicações específicas devidas à sensibilidade ao frio, especialmente aqueles com imunoglobulinemia monoclonal tipo IgM. Caso a precipitação sugira crioglobulinas, elas devem ser quantificadas, solubilizadas e caracterizadas imunoquimicamente.

## **A P R O V A Ç Ã O**

**ASS. E CARIMBO:**

	<b>Diretrizes</b>	<b>Dir.:</b>
		<b>SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL</b>

A triagem para crioglobulinemia é desencorajada para pacientes com sintomas vagos e inespecíficos.

**Nota:** Em resumo, as técnicas atualmente recomendadas para a avaliação das M-proteínas consistem na eletroforese de alta resolução ( em gel ou capilar), imunofixação e imuno-seleção (para documentar casos de doença de cadeia pesada). A imuno-subtração é uma nova e promissora técnica para a caracterização de M-proteínas, ainda em estudos.

## 12. Fase pré-analítica

### 12.1. Preparo do paciente

O paciente deve ter soro e urina coletados após agendamento no laboratório, por dois motivos:

- 1- A urina e o soro para eletroforese de alta resolução e imunofixação devem ser imediatamente processados.
- 2- O soro deve ser coletado, coagulado e centrifugado a 37 graus C para que não haja perda de crioglobulinas (proteínas monoclonais em potencial).

### 12.2. Material/Amostra para Eletroforese de alta resolução e Imunofixação

Soro ou urina recentes são a amostra de escolha.

Fatores interferentes: A evaporação de amostras não tampadas pode causar evaporação e resultados inexatos. O plasma não deve ser usado devido à adesão de fibrinogênio à matriz de gel, causando o aparecimento de uma banda em todos os padrões através do gel.

- Armazenamento e estabilidade: Amostras recentes de urina e soro são ideais. Caso seja necessário armazenamento, as amostras podem ser armazenadas com tampa hermética a 2 a 6 graus C por até 72 horas.

## 13. Fase analítica

Ver os documentos relativos aos seguintes procedimentos:

Eletroforese de Alta Resolução	Doc XXX
Imunofixação	Doc YYY
Nefelometria para IgG, IgA e IgM	Doc ZZZ
Proteinúria de 24 horas	DOC QQQ
Crioglobulinemia	DOC WWWW

### A P R O V A Ç Ã O

**ASS. E CARIMBO:**

	<b>Diretrizes</b>	<b>Dir.:</b>
		<b>SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL</b>

## 14. Fase pós-analítica

### 14.1. Valores de referência

Ausência de banda monoclonal à eletroforese de alta resolução de soro e de urina.

#### B. Modelo de laudo

Pesquisa de Paraproteínas positiva: Número e tipo de bandas encontradas em soro e/ou urina mais a quantificação das imunoglobulinas por nefelometria.

#### C. Valores críticos

Recomenda-se que todos os casos submetidos a pesquisa de paraproteínas sejam discutidos com o médico assistente e seus resultados sejam documentados até o ponto de correlação com o diagnóstico clínico para validação.

### 14.2. Notas interpretativas (notas a serem colocadas no laudo quando apropriado)

“Pacientes que apresentarem precipitação de cadeias Kappa ou Lambda e não apresentarem precipitação de IgG, IgA ou IgM podem ter cadeias leves livres ou proteína monoclonal tipo IgD ou IgE, e devem ser testados novamente à imunofixação com estes dois anti-soros.”

### 14.3. Interpretação

Componentes-M típicos e/ou proteínas de Bence Jones são demonstráveis em virtualmente todos os pacientes com Mieloma Múltiplo. Raramente, o componente M (monoclonal) consiste de imunoglobulinas incompletas e/ou metade de moléculas. A distribuição das várias classes de Ig entre as proteínas de mieloma é grosseiramente proporcional à concentração das suas contrapartes no soro ou, mais exatamente, ao ritmo de produção de cada classe de Ig em indivíduos normais. Em 11 a 25% dos casos, não são vistos picos monoclonais proeminentes no soro, pois as cadeias leves são mais difíceis de demonstrar na circulação do que as cadeias pesadas. Mielomas por IgE e IgM são extremamente raros.

A excreção de cadeias leves na urina é influenciada por vários fatores, incluindo o grau de síntese em excesso de cadeias leves e a depuração renal de cadeias leves, a última variando entre 10 e 50% da depuração de creatinina, dependendo do tamanho da proteína. A quantidade total excretada pode variar de alguns poucos miligramas a tanto quanto 40 g/24 horas. A detecção de cadeias leves depende da técnica empregada, sendo menor com a Pesquisa de Proteínas de Bence Jones (45% dos pacientes).

Proteínas monoclonais não são detectadas nem em soro nem urina em cerca de 1% dos pacientes, nos quais os achados celulares, citológicos e ultraestruturais são similares aos do mieloma habitual.

## A P R O V A Ç Ã O

**ASS. E CARIMBO:**

	Diretrizes	Dir.:
		SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL

Células plasmáticas tumorais produtoras de duas ou mais proteínas monoclonais são encontradas em 0,5% a 2,5% dos pacientes.

<b>Tabela 5 - Frequência dos Tipos de Proteínas Monoclonais Produzidas por Tumores de Células Plasmáticas</b>	
IgG kappa ou lambda	52%
IgA Kappa ou lambda	21%
IgD Kappa ou lambda	2%
IgE Kappa ou lambda	< 0,01%
IgM (waldenstrom)	12%
Cadeia leve apenas (kappa ou lambda)	11%
Cadeia pesada apenas (alfa, gama ou mu)	<1%
2 ou mais	0,5%
Não detectada	1%

## 15. Notas adicionais

Proteínas que podem ser confundidas com Proteína –M
Fibrinogênio
Transferrina Variante
C3 Variante
Beta-1 lipoproteína
Latrogênica, ex.. Urografina na eletroforese capilar por zona

## 16. Anexo 1 -Incidência das gamopatias mais comuns (EUA)

Condição	No. Casos/Ano	Sobrevida Média-Anos
Mieloma múltiplo	13.000	3
Macroglobulinemia de Waldenstrom	3.000	5
Proteínas infiltrativas ou doenças de deposição- Amiloidose	2.500	1
D. Cadeia pesada	Rara	Dados incompletos
Gamopatia monoclonal de significado indeterminado	> 1.000.000	Próxima do normal
Plasmacitoma solitário (ósseo ou extramedular)	Raro	Próxima do normal

A P R O V A Ç Ã O
ASS. E CARIMBO:

	Diretrizes	Dir.:
		SIGLAS: DISA/SUHOSP/ DVSCDT/SVPCL

## 17. Referências

1. DEVITA, JR., V.T. e outros. Câncer Principles and Practice of Oncology. 5a. Ed, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.
2. LEE, R.G. e outros. Wintrobe's Clinical Hematology. 9ª. Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
3. HOLLAND, J.F. e outros. Cancer Medicine. 4ª. Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1997.
4. KEREN, D.F. e outros. Guidelines for Clinical and Laboratory Evaluation of Patients With Monoclonal Gammopathies. Arch Pathol Lab Med, 1999; 123:106-107.
5. BURTIS, CA & ASHWOOD, ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2ª Ed., Philadelphia, WB Saunders, 1994.
6. IPSEMG – Protocolo da Hematologia No.1: Mieloma Múltiplo – Plasmacitoma CID-C 90-0. Elaborado por Marcos de Bastos e Maria Regina Dias de Bastos. 27/06/2002

Atividade	Responsável	Rubrica	Data
Redigido por	Luisane M F Vieira –CRMMG 18625		Mar 2003
Aprovação da UGQ			
Aprovação da Dir. Téc.			
Revisto por			
Aprovação da UGQ			
Aprovação da Dir. Téc.			
Revisto por			
Aprovação da UGQ			
Aprovação da Dir. Téc.			
Retirado por			

### A P R O V A Ç Ã O

**ASS. E CARIMBO:**