

La electroforesis capilar hoy: una herramienta para el estudio de perfiles proteicos con utilidad clínica

Desde la revolucionaria innovación que permitía la separación de las proteínas séricas en un medio líquido, desarrollada por Tiselius, la electroforesis solo ha emprendido un camino de creciente evolución (del papel, acetato de celulosa gelatinizado [ACG] / gel de agarosa [AG] / gel de agarosa en capa fina / gel de agarosa de capa fina de alta resolución [AGAR] a la electroforesis capilar de zona [ECZ]). Dichos desarrollos han permitido separar cinco (albúmina, alfa-1, alfa-2, beta y gamma) o seis fracciones (beta-1 [transferrina] y beta-2 [complemento 3]), que se asemejan a una distribución de curva gaussiana en las curvas densitográficas, con la mayor asimetría observada en la zona gamma, por su especial composición, dada la naturaleza heterogénea de las inmunoglobulinas policlonales.¹⁻³

El desafío de la interpretación de los perfiles proteicos séricos y su valor en la asociación con patologías siempre estuvo ligado al desarrollo metodológico con capacidad para distinguir distintos perfiles con precisión, focalizando la atención en abandonar la subjetividad en la visualización y en disminuir el tiempo demandante por ser técnicas intrínsecamente artesanales. Desde esta perspectiva, la ECZ ocupa un lugar predominante.

Como describe la Dra. Raquel Osatinsky, la mayor ventaja en la separación de las proteínas séricas mediante ECZ es la posibilidad de observarlas de manera muy similar a la tradicional obtenida en soportes sólidos. En estos equipos, la lectura de las proteínas es directa y la medida a 200 nm de los enlaces peptídicos expresa el contenido de cada fracción visualizada. Se construye así una curva virtual que deberá ser validada por el operador. Se acortan los tiempos de corrida al eliminar las etapas de coloración, decoloración y densitometría, permitiendo al profesional mayor tiempo para el análisis del perfil proteico.⁴

A diferencia de las metodologías de uso tradicional (ACG/AG, etc.), en la ECZ es el flujo electroosmótico el que produce la migración de un líquido (solución amortiguadora) respecto de una superficie cargada (pared del capilar), al aplicar un campo eléctrico, y, por lo tanto, el que permite la separación de distintas partículas. Los capilares de sílice recubiertos con polímeros para otorgarles flexibilidad facilitan la aplicación de campos eléctricos con un gran voltaje, con una alta eficiencia en la disipación de calor. La ionización de los grupos silenoles genera una capa negativa de iones, seguida por una segunda capa móvil compuesta de cationes en exceso, que es la que establece el flujo neto de migración hacia el polo negativo.

Esta técnica ha demostrado su utilidad en el área de química clínica tanto para la separación de las proteínas del suero como de péptidos (insulina), hemoglobinas normales y patológicas, y de pequeñas moléculas ionizadas como nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos, vitaminas y drogas iónicas; la misma ha sido descrita en todas sus aplicaciones, fundamentos y

características metodológicas por Castagnino.^{5,6} Además, cabe mencionar que es una técnica muy versátil, que permite utilizar mecanismos de separación diferentes y complementarios simplemente cambiando la composición del líquido dentro del capilar.⁷

El mayor reto que debió afrontar esta metodología fue, sin lugar a dudas, incorporar nuevos algoritmos para producir una interpretación rápida y estandarizada del análisis matemático de los datos obtenidos mediante EC de todo el electroferograma con el fin de definir distintos perfiles como, por ejemplo, el de inflamación, que permitieran la interpretación clínica de una manera objetiva.⁸

En cuanto a la automatización de los procedimientos empleados en la ECZ, también es de destacar que ha mejorado la reproducibilidad de la medida con respecto a los procedimientos manuales, lo que ha permitido alcanzar los objetivos de calidad en algunas de las fracciones. Los datos de imprecisión aportados por diferentes estudios realizados con distintos equipos de electroforesis capilar y de electroforesis en gel de agarosa muestran que la imprecisión es menor en los primeros.⁹

En cuanto al resto de las validaciones necesarias al momento de utilizar ECZ para realizar proteinogramas electroforéticos, es importante resaltar algunos aspectos referidos a la conmutabilidad con los datos obtenidos mediante los soportes sólidos. Por ejemplo, con ECZ se reportaron valores más altos para la fracción alfa-1, mientras que resultaron más bajos para las fracciones de albúmina (en mujeres), globulina 2 y globulina. En cuanto a la zona gamma ECZ, presentó mayores valores que AG (<0,05).¹⁰

Hay que destacar que tanto la electroforesis en gel como la capilar funcionan de manera muy similar para estimar la concentración de fracciones de proteínas séricas y también, para identificar y cuantificar componentes monoclonales (picos M). La ECZ, especialmente, necesita menos participación técnica y no depende de los procesos de coloración y decoloración. Si los resultados se requirieran de manera urgente, podrían estar a disposición del médico¹¹ ni bien se produjeran la migración (entre ocho y nueve minutos) y validación de los mismos.

La detección y cuantificación de picos M, producto de la aparición de inmunoglobulinas monoclonales, representan la máxima utilidad de la separación de las proteínas séricas abocadas al estudio de gammapatías monoclonales (GM), sin embargo, numerosos patrones electroforéticos son sumamente importantes, ya sea en patología hepática, en estados de pérdida proteica selectiva o no, ya, en perfiles proteicos sin particularidades, un dato no menor para cualquier evaluación clínica.¹²

En ECZ se obtienen resoluciones más altas, con datos de curva más detallados, lo que aumenta la sensibilidad para la

visualización de los picos M, sin embargo, esto mismo hace que exista la posibilidad de una disminución en la especificidad dada por la presencia de perfiles anormales, producto de interferencias, que requieren una identificación inmunológica posterior que complica la interpretación de muestras patológicas.¹³

En ese sentido, el análisis de picos en ECZ, resultado del uso de radio contrastes y antibióticos, así como los cambios de movilidades advertidos en proteínas como el fibrinógeno-una proteína observada en la zona Beta-2, que en soporte sólido migra en la región gamma rápida; o en la enfermedad por IgG4, que en ECZ altera la visualización de la zona gamma, sumados a la nueva estrategia terapéutica que utiliza la terapia con anticuerpos monoclonales del mismo tipo que la inmunoglobulina producida por el clon maligno que se pretende cuantificar, han resultado un desafío adicional a la hora de analizar y validar muestras de pacientes con diagnóstico de GM.¹⁴

Sin lugar a dudas, cuando se sospecha un pico M en un proteinograma, el procedimiento adecuado es determinar que la anomalía es una proteína M. Si bien en las últimas recomendaciones solo se mencionaba como adecuada su identificación mediante inmunofijación (IFX), también se ha incluido la inmuno sustracción (ISUB) o cualquier otro método con la sensibilidad adecuada.¹⁵

Aunque siempre se caracterizó la IFX como la técnica de mayor sensibilidad, según estudios publicados, la ISUB permite detectar cadenas livianas libres monoclonales y/o inmunoglobulinas intactas a concentraciones de 0,3 g/dL o incluso más débiles (0,22 g/dL).^{16,17}

Sin embargo, los cambios de movilidad observados en ECZ con respecto a los observados en soportes sólidos implican la necesidad de asegurar la identidad de cada pico con la misma movilidad, imposible de realizar, en algunos casos, mediante los métodos que fijan con anticuerpos luego de la separación convencional.

La ISUB se presenta entonces como la solución para conocer la identidad de los picos M visualizados en ECZ, ya que acopla una incubación del suero del paciente con Sepharosa unida a anticuerpos mono-específicos anti IgG, IgA, IgM y anticadenas livianas kappa y lambda. Luego de un breve período de incubación, se produce la floculación de los complejos y el sobrenadante es sometido a una separación por el mismo equipo, con un control de movilidad F de la reacción antígeno-anticuerpo en las condiciones de ECZ que utilizamos para realizar el proteinograma. La comparación de cada una de las cinco curvas inmunosustraidas con la curva control del paciente permitirá visualizar la desaparición del pico en la misma movilidad, confirmando así su identidad.¹⁸

Es sabido que se recomienda realizar los seguimientos de pacientes con GM con la misma metodología, en el mismo laboratorio.^{19,20} La cuantificación del pico M presenta desafíos adicionales y cualquier metodología que se utilice para hacerla depende de la decisión de marcarlo, así como también, de la forma en que dicho pico se calcula. En ECZ, existen herramientas

que permiten hacer la cuantificación de manera tangencial y/o a línea de base. En ese sentido, un reciente estudio multicéntrico internacional evaluó el límite de cuantificación (LC) de pico en bajas concentraciones mediante el agregado de los anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento de mieloma múltiple (MM) (con ambas formas de medición). Los resultados indicaron que la EC permite cuantificar 2,0 g/L a línea de base (1,0 tangencial), en presencia de hipogammaglobulinemia (h-gamma), 5,0 g/L (5,0 tangencial) en normo gammaglobulinemia (n-gamma) y >10 g/L (2,0 tangencial) en hipergammaglobulinemia (H-gamma), en zonas de movilidad electroforéticas lentas, mientras que, para la zona de movilidad media, las concentraciones del LC fueron 3,0 g/L (6,0 g/L tangencial) en h-gamma, 8,0 g/L (>10 en tangencial) en n-gamma y, >10 g/L (8,0 en tangencial) en H-gamma. El LC se definió como la concentración de proteína M más baja dentro del rango de recuperación aceptable (80 % - 120 %) y con un CV ≤20 %. Los laboratorios informaban >10 cuando no era posible obtener el LC.

La conclusión más desafiante, tal como la observaron los autores, fue que la sensibilidad en la detección puede depender de quien evalúa las curvas y no, de las metodologías, ya que algunos laboratorios son más conservadores en lo que denominan *proteína M*. Por otro lado, no todos los métodos se ejecutaron y leyeron en el mismo laboratorio y con el mismo lector; por esto, sabiendo de las limitaciones en aquello que marcamos (o, no), podríamos volvernos más conservadores en cuanto a lo que se está cuantificando e informando.²¹

Es importante resaltar que tanto la ECZ como el resto de las metodologías utilizadas en la actualidad indicaron correctamente un aumento o disminución de la proteína M en >99 % de las muestras. Sin embargo, la precisión intralaboratorio se vio más afectada en los casos en los que el fondo policlonal se encontraba incrementado para todas las metodologías empleadas en la cuantificación de pico M [CV intralaboratorio promedio 5,0 % (95% CI 4.7–5.4)], si bien todos pudieron ser detectados en concentraciones ≥1 g/L mediante el proteinograma electroforético.²² De todo lo anteriormente dicho puede asumirse que, aun en ECZ, la necesidad de una inspección minuciosa y la obligación de reconocer manualmente los cambios observados con respecto a los trazados electroforéticos sin particularidades siguen demandando mucho tiempo, a la vez que son difíciles y dependientes del observador.

En conclusión, la experiencia en las observaciones de los perfiles redundan en una mejor utilización de las herramientas que permiten la emisión de los comentarios en informes asociados a distintas patologías y, en especial, en la decisión de marcar picos y cuantificarlos.

La Dra. Raquel Osatinsky ha sido testigo y activa protagonista de la evolución de la electroforesis aplicada al análisis de proteínas plasmáticas. Su aporte desde el laboratorio, la clínica, la investigación y la enseñanza es invaluable e inmenso, y por ello, nuestro humilde homenaje.

Referencias Bibliográficas

1. Tiselius A. Electrophoresis of serum globulin: electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem J* 1937;31(9):1464-77.
2. Riches PG, Kohn J. Improved resolution of cellulose acetate membrane electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 1987;24(Pt 1):77-79.
3. Jeppsson JO, Laurell CB, Franzen B. Agarose gel electrophoresis. *Clin Chem*. 1979; 25 (4): 629-38.
4. Osatinsky R. ¿Qué es la electroforesis capilar?. *Bioquímica y Patología Clínica* 2007;60-65
5. Castagnino J M. Electroforesis capilar. *Bioquímica* 2000;25(1):13-32.
6. Castagnino J M. Electroforesis capilar: Nuevos aportes y su importancia nanotecnológica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 2009; 43 (2): 175-176.
7. Shallan A, Guijt R, Breadmore M. Capillary Electrophoresis: Basic Principles. In: Siegel JA, Saukko PJ, editors. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 2nd ed. United States of America: Academic Press 2013; 549-59.
8. Jonsson M, Carlson J. Computer-supported interpretation of protein profiles after capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2002;48(7):1084-93.
9. Joliff CR, Blessum CR. Comparison of serum protein electrophoresis by agarose gel and capillary zone electrophoresis in a clinical setting. *Electrophoresis* 1997;18:1781-4.
10. Bossuyt X, Schiettekatte G, Bogaerts A, Blanckaert N. Serum protein electrophoresis by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system. *Clin Chem* 1998;44:749-59.
11. Howard BM, Kuh A, Rezavi L, Caturegli P. A Comparison of gel (Hydragel 30) and capillary (Capillarys III Tera) electrophoresis for the characterization of human serum proteins. *Pract Lab Med*. 2021;25:e00233.
12. Keren DF, Humphrey RL. Clinical indications and applications of serum and urine protein electrophoresis. In: Hamilton R, Schmitz J, editors. *Manual of molecular and clinical laboratory immunology*. 8th ed. United States of America: Wiley Online Library; 2016:74-88.
13. Regeniter A, Siede WH. Peaks and tails: Evaluation of irregularities in capillary serum protein electrophoresis. *Clinical biochemistry* 2018;51:48-55.
14. McCudden CR, Jacobs JF, Keren D, Caillon H, Dejoie T, Andersen K. Recognition and management of common, rare, and novel serum protein electrophoresis and immunofixation interferences. *Clinical biochemistry* 2018;51:72-79.
15. Keren D, Bocsi G, Billman B, Etzell J, Faix J, Kumar S, et al. Laboratory Detection and Initial Diagnosis of Monoclonal Gammopathies: Guideline From the College of American Pathologists in Collaboration With the American Association for Clinical Chemistry and the American Society for Clinical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2021;1-16.
16. Katzmann JA, Clark R, Sanders E, Landers JP, Kyle RA. Prospective study of serum protein capillary zone electrophoresis and immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. *Am J Clin Pathol* 1998;110(4):503-9.
17. Litwin CM, Anderson SK, Philipps G, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR. Comparison of capillary zone and immunosubtraction with agarose gel and immunofixation electrophoresis for detecting and identifying monoclonal gammopathies. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(3):411-17.
18. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, Blanckaert N. Detection and classification of paraproteins by capillary immunofixation/subtraction. *Clin Chem* 1998;44:760-64.
19. Tate J, Caldwell G, Daly J, Gillis D, Jenkins M, Jovanovich S, et al. Working Party on Standardised Reporting of Protein Electrophoresis. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012;49(Pt 3):242-56.
20. Tate JR, Keren DF, Mollee P. A global call to arms for clinical laboratories - Harmonised quantification and reporting of monoclonal proteins. *Clin Biochem* 2018;51:4-9.
21. Turner KA, Frinack JL, Ettore M W, Tate J R, Graziani M S, Jacobs J F et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part I: factors impacting limit of quantitation of serum protein electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(4):533-46.
22. Jacobs JFM, Turner KA, Graziani MS, Frinack JL, Ettore MW, Tate JR, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part II: limit of detection and follow-up of patients with small M-proteins. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(4):547-59.