

Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Ciências da Saúde - FS
Graduação em Farmácia

**COMPARAÇÃO DA DOSAGEM DE ALBUMINA POR DUAS METODOLOGIAS:
ELETROFORESE DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E ESPECTROFOTOMETRIA**

MATHEUS MARTINS BITES LOBO

Brasília, DF
2016

Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Ciências da Saúde - FS
Graduação em Farmácia

**COMPARAÇÃO DA DOSAGEM DE ALBUMINA POR DUAS METODOLOGIAS:
ELETROFORESE DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E ESPECTROFOTOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para o curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito obrigatório para aprovação no Curso de graduação de Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
Co-orientador: José Eduardo Bueno

Brasília, DF
2016

MATHEUS MARTINS BITES LOBO

**COMPARAÇÃO DA DOSAGEM DE ALBUMINA POR DUAS METODOLOGIAS:
ELETROFORESE DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E ESPECTROFOTOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para o curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito obrigatório para aprovação no Curso de graduação de Farmácia

Aprovada em ____ de _____ de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Prof. Dr. Maurício Homem de Mello

AGRADECIMENTOS

Ao meu pequeno pisciano, que é o motivo de toda coragem e de todos os esforços.

Às minhas piscianas por serem o meu porto seguro durante todos os momentos em que os ombros já não aguentavam mais.

À minha orientadora pela paciência e disponibilidade, mesmo em meio a todas as atividades e adversidades acadêmicas, profissionais e pessoais.

Ao meu coorientador pela confiança e companheirismo depositados em um estagiário sem nenhuma experiência.

E finalmente, a todos os doutores, mestres, professores e profissionais que, durante esta graduação, sempre incentivaram e estimularam a curiosidade e a busca pela verdade, repassando todo o conhecimento e experiências adquiridos durante vários anos de estudos em diversas áreas desta tão maravilhosa profissão.

Meu mais sincero muito obrigado.

RESUMO

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação desregulada de plasmócitos e a produção de proteínas monoclonais causando danos em diversos órgãos. A eletroforese de proteína sérica (EPS) é um exame que detecta a presença e quantidade das proteínas monoclonais além de outros parâmetros como a albumina. O sistema de estadiamento internacional (ISS) leva principalmente dois parâmetros para o estadiamento do MM: Albumina e beta-2-microglobulina. Neste estudo foram comparados os resultados e desempenho analítico da albumina dosada pelas metodologias laboratoriais espectrofotometria e por EPS. Foram analisados 656 resultados de pacientes que realizaram exames em ambas as metodologias. Ao comparar a espectrofotometria com a EPS observamos que os resultados possuem baixo grau de dispersão, pouca variação e são homogêneos em relação à média (Desvio padrão de 0,38 e 0,39 e coeficiente de variação 9,0 % e 8,6 % respectivamente). Ao analisar os valores da albumina dosada pela EPS em relação do valor de referência da bula (55,8 a 66,1 %) temos que 85,7 % (384) possuem resultados normais tanto para albumina quando para a fração gama, quando a albumina está diminuída 54,9 % (106) estão com a fração gama elevada e quando a albumina está elevada 87,5 % (15) estão com a fração gama diminuída. A albumina dosada por EPS é compatível com a dosada pela espectrofotometria, isto confirma a utilização da EPS para monitoramento e acompanhamento do MM concentrando diversas informações em um único exame, desta forma, diminuindo os custo do tratamento e melhorando a qualidade de vida do paciente.

Palavras-chaves: Mieloma Múltiplo, Eletroforese de Proteínas Séricas, Espectrofotometria, Albumina

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a hematological neoplasm characterized by dysregulated proliferation of plasma cells and the production of monoclonal proteins causing damage to various organs. Serum protein electrophoresis (SPEP) test detects the presence and quantity of monoclonal proteins in the blood and other parameters such as albumin. The international staging system (ISS) mainly carries two parameters for MM staging: albumin and beta-2-microglobulin. In this study, the albumin results were compared by spectrophotometry and SPEP. Within the study, 656 results were obtained from patients with both methodologies laboratory spectrophotometry and SPEP. When comparing spectrophotometry with SPEP, it was observed that results had low dispersion, low variation and were homogeneous in relation to the average (Standard deviation of 0.38 and 0.39 and coefficient of variation 9.0% and 8.6% respectively). When analyzing the values of albumin dosed by SPEP relative to the reference value of the package insert (55.8 to 66.1%), 85.7% (384) obtained normal results for both albumin and for gamma fraction when albumin is low 54.9% (106) with the high gamma fraction and when albumin is elevated 87.5% (15) with gamma fraction decrease. SPEP albumin is compatible with albumin dosing, which confirms the use of SPEP to monitor and follow the MM by concentrating various information in a single test, reducing the cost of treatment and improving the quality of life of the patient.

Key-words: Multiple myeloma, Serum Protein Electrophoresis, spectrophotometry, Albumin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição por sexo do grupo de resultados de amostras séricas de albumina . 19

Tabela 2 - Distribuição por idade em grupos de resultados de amostras séricas de albumina
..... 19

Tabela 3 - Análise estatística empregando desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação
(CV %) para os dois métodos analíticos empregados 20

Tabela 4 – Avaliação da albumina e da fração gama obtida pelo método de eletroforese ... 21

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|------|---------------------------------------------------------|
| AACB | <i>Australasian Association of Clinical Biochemists</i> |
| ALB | Albumina |
| AS | Albumina Sérica |
| B2M | Beta-2-Microglobulina sérica |
| BCG | Solução de verde de bromocresol |
| CRAB | Calcium, Renal failure, Anemia e Bone lesions. |
| CV | Coefficiente de variação |
| DHL | Desidrogenase láctica |
| ddp | Diferencial de potencial elétrico |
| DP | Desvio Padrão |
| EPS | Eletroforese de Proteínas Séricas |
| EPSC | Eletroforese de Proteína Sérica por Capilaridade |
| GMSI | Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado |
| IMWG | <i>International Myeloma Working Group</i> |
| ISS | Sistema de Estadiamento Internacional |
| MM | Mieloma Múltiplo |
| MML | Mieloma Múltiplo Latente |
| MO | Medula Óssea |
| SDS | Sistema Durie-Salmon |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1. Mieloma Múltiplo | 10 |
| 1.2. Diagnóstico Laboratorial | 12 |
| 1.2.1. Eletroforese | 12 |
| 1.2.2. Métodos Espectrofotométricos | 14 |
| 2. OBJETIVO | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODO | 17 |
| 3.1. Resultados de amostras séricas | 17 |
| 3.2. Técnicas Laboratoriais Empregadas | 17 |
| 3.2.1. Eletroforese | 17 |
| 3.2.2. Espectrofotometria | 17 |
| 3.3. Avaliação analítica e estatística | 18 |
| 4. RESULTADOS | 19 |
| 4.1. Grupo de amostras séricas com resultados incluídos no estudo | 19 |
| 4.2. Avaliação estatística empregando desvio-padrão e coeficiente de variação | 19 |
| 4.3. Avaliação da albumina | 21 |
| 4. DISCUSSÃO | 23 |
| 5. CONCLUSÃO | 25 |
| 6. REFERÊNCIAS | 26 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação monoclonal de plasmócitos malignos na medula óssea (MO) junto com o surgimento de proteínas monoclonais séricas que alteram o microambiente da MO levando a danos em diferentes órgãos (ZAGO et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Essas proteínas monoclonais, chamadas de proteínas M, componente monoclonal ou imunoglobulinas clonais, são as causadoras das diversas patologias associadas ao MM, principalmente pela deposição em diversos tecidos. Essa desordem monoclonal leva ao surgimento de hipercalcemia, falência renal, anemia e lesões ósseas (RAJKUMAR, 2015).

O MM é a segunda neoplasia hematológica de maior prevalência nos EUA (ZAGO et al., 2013; KEREN, 2003; CADTH, 2015). Corresponde a cerca de 1-2 % das neoplasias e 10 – 15 % das neoplasias hematológicas. Ocorre normalmente em pacientes acima dos 50 anos, e o diagnóstico ocorre geralmente em pacientes acima dos 70 anos. Sua incidência é estimada em 4 casos a cada 100 mil pessoas/ano (ZAGO et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). É discretamente mais comum em homens que em mulheres (ZAGO et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015) e também mais incidente em negros que em brancos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O diagnóstico do MM é feito pela identificação de alguma dessas disfunções: hipercalcemia, lesão renal, anemia e destruição óssea, que são chamadas de CRAB do inglês C de *Calcium (elevated)*, R de *Renal failure*, A de *Anemia*, e B de *Bone lesions*. A presença de qualquer uma delas já é um indicativo de MM (ZAGO et al., 2013; RAJKUMAR, 2015; DHAKAL et al., 2016).

A disfunção mais comum é a lesão óssea presente em 80 a 90 % dos pacientes (ZAGO et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; SILVA et al., 2009). Essa lesão ocorre principalmente nas vértebras (65 %), arcos costais (45 %), crânio e ombro (40 %) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Juntamente com o CRAB é observada a presença de 10 % ou mais de plasmócitos clonais na MO ou biópsia com presença de plasmocitoma (RAJKUMAR, 2015; DHAKAL et al., 2016), a presença da proteína M e a relação das cadeias leves livres Kappa e lambda (ZAGO et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015;

RAJKUMAR, 2015; DHAKAL et al, 2016). Porém, o MM é geralmente precedido de uma fase assintomática onde ocorre somente a presença da proteína M. Esta fase não apresenta nenhum quadro clínico da neoplasia e é dividida em Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI) e Mieloma Múltiplo Latente (MML) podendo preceder em vários anos o MM (ZAGO et al., 2013; FARIA& SILVA 2007; DHAKAL et al, 2016).

Pacientes com MML possuem um alto risco de evoluir para o MM (10-20 % ao ano) ao comparar com pacientes com GMSI (1 % ao ano) (FARIA & SILVA 2007). A GMSI é caracterizada pela presença de < 3 mg/dL de proteínas M e menos de 10 % de plasmócitos clonais na MO enquanto o MML apresenta > 3 mg/dL de proteínas M, entre 10 – 60 % de plasmócitos clonais na MO e, em ambos os casos não podem apresentar nenhuma lesão tecidual (CRAB) (RAJKUMAR, 2015; FARIA & SILVA 2007).

Após o diagnóstico do MM é necessário fazer o estadiamento, isto é, categorizar em qual nível está o MM afim de um melhor prognóstico (BATAILLE et al., 2013). Atualmente são utilizados dois métodos: o estadiamento pelo Sistema Durie-Salmon (SDS) ou pelo Sistema de Estadiamento Internacional (ISS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O SDS é um sistema que leva em consideração o volume tumoral do MM combinando-o com outros fatores como hemoglobina, cálcio sérico livre, a concentração da proteína M, lesão óssea e creatinina sérica. Porém, o SDS vem caindo em desuso por ter uma difícil interpretação e correlação ruim com a sobrevida global e o tempo livre da doença (SILVA et al., 2009).

O ISS por sua vez, utiliza a dosagem de Beta-2-Microglobulina sérica (B2M) e a dosagem de Albumina Sérica (AS) para separar os pacientes em 3 níveis: estágio 1 possui valores de B2M < 3,5 mg/dL e AS > 3,5 g/dL, o estágio 2, entre valores do estágio 1 e 3, e o estágio 3 valores de B2M > 5,5 mg/dL (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015, SILVA et al., 2009).

Recentemente o ISS sofreu uma revisão pela *International Myeloma Working Group* (IMWG), na qual foram incorporados alguns parâmetros para melhorar o prognóstico devido a relação idade do paciente e B2M/AS. O B2M é uma proteína cujo aumento está relacionada com a idade dos pacientes (BATAILLE et al., 2013). O ISS revisado ainda possui 3 níveis: estágio 1 que possui valores de B2M < 3,5 mg/dL e AS > 3,5 g/dL, sem alterações citogenéticas e desidrogenase láctica (DHL) em níveis normais; o estágio 2, situado entre valores do estágio 1 e 3; e o estágio 3 com valores de B2M > 5,5 mg/dL, e alterações citogenéticas [t(4:14), t(14,16) ou del(17p)] ou aumento de DHL (RAJKUMAR, 2015)

Com o avanço das técnicas citogenéticas, foi observado que translocações e deleções específicas tem valor prognóstico no MM (ZAGO et al., 2013; RAJKUMAR, 2015). As seguintes alterações citogenéticas t(4:16), t(14:16) ou del(17p) constitui um alto risco de evolução da doença, enquanto trissomias indicam um risco intermediário (RAJKUMAR, 2015, DHAKAL et al., 2016). Cada alteração indica um subtipo do MM com características e tratamentos específicos. Translocações t(4:16) tem menor lesão óssea e bom tratamento utilizando *Bortezomib*, enquanto translocações t(14:16) tem uma alta relação cadeia leve livre causando uma falência renal aguda (RAJKUMAR, 2015). Porém, devido ao alto custo de exames citogenéticos, estes exames ainda não são utilizados em rotina (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI 2013;).

1.2. Diagnóstico Laboratorial

Para a identificação e monitoramento do MM são utilizados diversos exames complementares no intuito de avaliar a extensão dos sintomas do MM e a presença da proteína M (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; CADTH, 2015), tais como: Hemograma completo e esfregaço de sangue periférico, com possível identificação de empilhamento de hemácias (*rouleaux*), para avaliação da anemia; radiologia de esqueleto (rastreamento ósseo); cálcio sérico total e cálcio iônico, para avaliação das lesões ósseas; dosagem da AS total; ureia e creatinina, para avaliação das funções renais; Eletroforese de Proteínas Séricas (EPS), para dosagem das proteínas M; Imunofixação, para identificação da proteína M; Eletroforese de Proteínas Urinárias, para dosagem de proteínas M excretadas; dosagem Sérica das Imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) e de suas cadeias leves (Kappa e Lambda); dosagem da DHL e dosagem de B2M.

Dentre os exames, a EPS é um dos exames mais importantes no acompanhamento do MM pois é o único exame que possibilita a quantificação da proteína M (ZAGO et al., 2013; KEREN, 2003). A relação albumina/globulinas é um bom indicativo das disfunções causadas pela proteína M. Como as proteínas M são globulinas, seu aumento causa uma diminuição na AS, podendo ser observada na EPS (KEREN, 2003; SILVA et al., 2008; BOTTINI, 2007).

1.2.1. Eletroforese

Atualmente, os dois métodos de EPS mais utilizados são a eletroforese de proteína sérica por capilaridade (EPSC) e a eletroforese em gel de agarose (Imunofixação) (KEREN,

2003; SILVA et al., 2008; BOTTINI, 2007). A EPSC oferece as vantagens de baixo consumo de amostras, alta resolução, baixo tempo analítico e baixo custo, comparada às técnicas clássicas, como em gel de agarose (SPUDEIT, et al., 2012).

A eletroforese é uma técnica de separação utilizada para diversas substâncias devido à versatilidade do método. Esta separação ocorre pela aplicação de um diferencial de potencial elétrico (ddp) em um meio que proporcione resistência às substâncias que compõem a solução que será separada. Estas substâncias irão migrar para o polo elétrico oposto ao da sua carga, isto é, as moléculas mais negativas tendem a migrar para o cátodo do potencial de ação e as substâncias mais positivas para o ânodo. A velocidade com que ocorre essa migração é diferente para cada substância devido ao volume e polaridade de cada uma delas. A eletroforese depende de alguns fatores como a força do campo elétrico criado pelo ddp, pela resistência que o meio oferece e pela carga elétrica, tamanho e estrutura dos componentes da solução (KEREN, 2003).

Devido à grande sensibilidade da EPSC, ela consegue separar as proteínas em 6 bandas. Estas bandas são a aglomeração de proteínas que possuem semelhança de carga, volume e estrutura, tendendo a migrar juntas durante a aplicação do potencial elétrico. São divididas em: Albumina, Alfa 1, Alfa 2, Beta (beta 1 e beta 2 na EPSC) e Gama. A banda Alfa 1 é composta principalmente pelas proteínas Alfa Lipoproteína, Alfa 1 Antitripsina, Alfafetoproteína e a Alfa 1 Glicoproteína Ácida; a banda Alfa 2 pela Alfa 2 Macroglobulina, Haptoglobina e Ceruloplasmina; a banda Beta 1 principalmente pela Transferrina; a Beta 2 pelas proteínas do sistema complemento, Complemento 3 (C3), Complemento 4 (C4) e Fibrinogênio; e a banda Gama pela Proteína C reativa (PCR) e as imunoglobulinas (KEREN, 2003; SILVA, LOPES & FARIA 2008, ATTAELMANNAN & LEVISON, 2000).

A EPSC proporciona uma sensibilidade maior do que a imunofixação (BOTTINI, 2007). O uso dos capilares permite a separação da banda Beta, em Beta 1 e Beta 2 proporcionando uma maior exatidão em identificar o componente monoclonal. A metodologia permite também a quantificação da banda. Na EPSC ocorre a geração de um gráfico baseado na densidade ótica observada no capilar, isto é, dependendo da intensidade com que a luz consegue transpassar o meio, gera-se um gráfico. Quanto menor essa luz, maior a quantidade de proteínas naquele local. Assim podemos gerar um gráfico que demonstra a quantificação das porções das proteínas séricas em porcentagem (KEREN, 2003; SPUDEIT, DOLZAN & MICKE, 2012).

Os valores de referência das bandas na EPSC são: Albumina (55,8 – 66,1 %); Alfa 1 (2,9 – 4,9 %); Alfa 2 (7,1 – 11,8 %); Beta 1 (4,7 -7,2 %); Beta 2 (3,2 – 6,5 %); Gamaglobulinas (11,1 – 18,8 %). Com a dosagem das proteínas totais da amostra, podemos correlacionar com as frações obtendo um valor absoluto (g/dL) (SEBIA, 2006).

Quando há um componente monoclonal na amostra, aparece no gráfico um pico referente às imunoglobulinas monoclonais, principalmente na fração gama. Este pico monoclonal (pico M) é mensurado, permitindo o acompanhamento da doença de forma a indicar se o tratamento está tendo uma Resposta Parcial, quando ocorre uma redução maior ou igual a 50 % do pico monoclonal; Resposta Parcial Muito Boa, quando essa redução é maior que 90 %; Resposta Completa, quando há redução de 100 %; ou doença progressiva, quando há o aumento ou diminuição de 25 % (IMF, 2016). A Associação de Bioquímicos Clínicos da Australásia (*Australasian Association of Clinical Biochemists – AACB*) indica que os limites de detecção do pico M em uma EPSC é de aproximadamente 0,025 g/dL (TATE et al., 2002).

1.2.2. Métodos Espectrofotométricos

A Albumina é a proteína de maior quantidade no soro, sendo responsável por pouco mais da metade das proteínas do soro, e seu valor de referência é de 3,2 – 4,8 g/dL (SIEMENS, 2008). Possui carga negativa e tamanho pequeno (69 kDa). É produzida no fígado e possui diversas funções no organismo como proteína transportadora. É a grande responsável pelo efeito osmótico das proteínas plasmáticas e, por transportar diversos compostos endógenos e exógenos como bilirrubina, hormônios, íons, lipídios, medicamentos, entre outros, sua diminuição está relacionada com alterações proteicas, hepatites e lesões renais (KEREN, 2003).

A dosagem da albumina pelo método espectrofotométrico foi realizada no equipamento Advia 2400® (Siemens, Erlangen, Germany) (SIEMENS, 2012). Na técnica de espectrofotometria é colocado um reagente que irá produzir uma reação química, alterando a coloração da solução (esta alteração normalmente está associada diretamente com a concentração do analito na solução). No caso da albumina, ocorre uma reação da amostra com o reagente, verde de bromocresol (SIEMENS, 2008), produzindo uma coloração esverdeada identificável por espectrofotometria em uma medição empregando comprimento de onda de 596 – 694 nm, proporcional à quantidade de albumina presente no soro. O Advia 2400®

também é empregado para a dosagem das proteínas totais através de uma reação com o Biureto (CONTROLLAB, 2013). Esta reação produz uma coloração violeta proporcional à quantidade de proteína presente no soro.

2. OBJETIVO

Comparar o desempenho analítico de duas metodologias Eletroforese e Espectrofotometria na dosagem de albumina sérica, que é um exame secundário importante para o prognóstico do mieloma múltiplo.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Resultados de amostras séricas

Os resultados séricos das amostras em ambas as metodologias empregadas no estudo, foram coletados por sistema informatizado de um laboratório de grande porte do Distrito Federal e região, no período de setembro a dezembro de 2015. Foram segregados resultados das amostras séricas que possuíam no mesmo pedido de exames: a) Eletroforese de proteína séricas e b) Albumina.

O laboratório concedeu acesso ao seu banco de dados e aceitou a dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) concordando com a realização da pesquisa.

3.2. Técnicas Laboratoriais Empregadas

O exame de EPS foi realizado em um equipamento de eletroforese por capilaridade – Capillarys 2 (Sebia, Lisses, França), e o de proteína total e de dosagem de albumina foram realizados no equipamento de bioquímica Advia 2400® (Siemens, Erlangen, Germany).

3.2.1. Eletroforese

A Eletroforese de Proteínas Séricas por Capilaridade (EPSC) utiliza o princípio da eletroforese capilar em solução livre. As moléculas carregadas são separadas pela sua mobilidade eletroforética, num tampão alcalino com um pH específico. A separação também ocorre em função do pH do eletrólito e do fluxo eletro-osmótico. As proteínas são detectadas pela seguinte ordem: gama-globulinas, beta-2-globulinas, beta-1-globulinas, alfa-2-globulinas, alfa-1-globulinas e albumina (SEBIA, 2006)

3.2.2. Espectrofotometria

O método Albumina (ALB) baseia-se no trabalho de Doumas, Watson e Biggs e utiliza uma solução de verde de bromocresol (BCG) como corante de ligação. A albumina do soro reage quantitativamente com a solução verde de bromocresol (BCG) formando um complexo

albumina – BCG em pH 4.2. Este complexo é medido como uma reação de ponto final empregando comprimento de onda de 596/694 nm (SIEMENS, 2008).

3.3. Avaliação analítica e estatística

Foram calculados as médias, desvios padrões e coeficientes de variação para a albumina dosada para as duas metodologias empregadas no estudo, espectrofotometria e EPS. Em seguida as amostras foram divididas em subgrupos de acordo com as alterações de albumina e os dados analisados.

4. RESULTADOS

4.1. Grupo de amostras séricas com resultados incluídos no estudo

Foram incluídos um total de 656 resultados de amostras séricas com dosagem de albumina realizada pelas duas metodologias, que se enquadravam nas solicitações médicas empregadas como critério de inclusão no estudo. Inicialmente os resultados foram categorizados por sexo (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição por sexo do grupo de resultados de amostras séricas de albumina

| Sexo | Nº de resultados |
|------------------|-------------------------|
| Masculino | 259 |
| Feminino | 397 |
| Total | 656 |

Em seguida, o número total de resultados foi categorizado por idade em quatro grupos distintos, como descrito na tabela 2. A idade média obtida foi de 48,1 anos \pm 17,8.

Tabela 2 - Distribuição por idade em grupos de resultados de amostras séricas de albumina

| Grupos etários | Nº de resultados |
|-----------------------|-------------------------|
| < 18 anos | 25 (4 %) |
| 19-50 anos | 348 (53 %) |
| 51-65 anos | 162 (25 %) |
| > 65 anos | 121 (18 %) |
| Total | 656 |

4.2. Avaliação estatística

A dosagem sérica da albumina pelo método espectrofotométrico, liberou resultados expressos em g/dL, com valor de referência de 3,2 a 4,8 g/dL, pelo método de eletroforese os resultados foram expressos em porcentagem (concentração relativa) e o valor de referência

atribuído pelo fabricante foi de 55,8 a 66,1 %. Como o método de eletroforese, além do percentual de albumina, libera o percentual das proteínas totais, além de todas as frações alfa-globulina (1 e 2), beta-globulina (1 e 2) e gama-globulina isoladamente, é possível converter essa concentração relativa em g/dL usando porcentagem simples.

Em uma etapa inicial, convertemos a dosagem de albumina pelas duas metodologias em g/dL para avaliarmos média, desvio-padrão e coeficiente de variação de todos os resultados das amostras sorológicas incluídas no estudo (Tabela 3).

Ao analisarmos os resultados após a transformação de unidades entre os dois métodos, empregamos o desvio-padrão, uma vez que estão na mesma unidade de medida, neste caso, g/dL. Os resultados obtidos refletem o grau de dispersão ou variação da albumina em relação à média (valor esperado), mostrando a homogeneidade entre os dados, neste caso com desvios-padrões de 0,38 e 0,39 para os métodos espectrofotométrico e eletroforese, respectivamente.

Para nos certificarmos que essa transformação de unidades não interfere no valor bruto obtido, neste caso em %, realizamos o cálculo do coeficiente de variação em (CV %), que analisa a dispersão ou variação da albumina em relação à média (valor esperado), quando empregamos unidades de medida diferentes, neste caso método espectrofotométrico em g/dL e eletroforese em %. Nossos dados para os dois métodos analisados revelaram os seguintes CV (%) 9,0 % para o método espectrofotométrico e 8,6 % para eletroforese.

De maneira geral a análise de CV (%) considera que: $CV (\%) \leq 15 \%$ representa baixa dispersão dos dados em relação à média, ou seja, os dados são homogêneos; valores entre 15 e 30 % representam dispersão média e $\geq 30\%$ alta dispersão, ou seja, dados heterogêneos. Analisando nossos dados podemos afirmar que os dados são homogêneos, próximos um do outro, embora o método de eletroforese apresente uma pequena vantagem em relação ao espectrofotométrico quando empregamos este coeficiente estatístico

Tabela 3 - Análise estatística empregando desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV %) para os dois métodos analíticos empregados

| Metodologia | Espectrofotometria (g/dL) | | | Eletroforese (g/dL) | | | Eletroforese (%) | | |
|---------------------------------------|------------------------------|------|--------|------------------------|------|--------|---------------------|------|--------|
| | Média | DP | CV (%) | Média | DP | CV (%) | Média | DP | CV (%) |
| Total resultados (n = 656) | 4,2 | 0,38 | 9,0 | 4,0 | 0,39 | - | 57,5 | 4,93 | 8,6 |

4.3. Avaliação da albumina

Considerando que os dados obtidos de desvio-padrão são mais homogêneos que os de CV %, transformamos todos os valores de % obtidos na metodologia de eletroforese em g/dL, e todas as demais análises foram realizadas com estes valores, embora os resultados em g/dL tenham sido mantidos na tabela 4.

Para estratificarmos os dados obtidos pela metodologia de eletroforese, levamos em consideração o valor de referência do fabricante, que considera resultados de albumina entre 55,8 - 66,1 % como normais. E em mais dois grupos, albumina $\leq 55,6$ % considerada baixa em relação ao valor de referência normal, e $\geq 66,3$ % elevada em relação ao valor de referência do fabricante (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da albumina e da fração gama obtida pelo método de eletroforese

| Grupos Albumina | N | EPSC (%) | | EPSC (g/dL) | | Grupos Fração Gama | N | Fração Gama (%) | | Fração Gama (g/dL) | |
|--------------------------------------------------|------------|----------|-----|-------------|-----|--------------------|-----|-----------------|-----|--------------------|-----|
| | | Média | DP | Média | DP | | | Média | DP | Média | DP |
| Albumina normal 55,8-66,1 % | 448 | 59,5 | 2,5 | 4,2 | 0,3 | Média total | 448 | 15,3 | 2,6 | 1,1 | 0,2 |
| | | | | | | Normal | 384 | 15,3 | 1,8 | 1,1 | 0,2 |
| | | | | | | Baixa | 28 | 9,3 | 1,5 | 0,6 | 0,1 |
| | | | | | | Elevada | 36 | 19,9 | 0,9 | 1,4 | 0,1 |
| Albumina baixa $\leq 55,6$ % | 193 | 51,9 | 4,0 | 3,7 | 0,4 | Média total | 193 | 19,7 | 5,0 | 1,4 | 0,5 |
| | | | | | | Normal | 82 | 16,5 | 1,7 | 1,2 | 0,2 |
| | | | | | | Baixa | 5 | 5,9 | 1,7 | 0,3 | 0,1 |
| | | | | | | Elevada | 106 | 22,8 | 4,2 | 1,7 | 0,5 |
| Albumina elevada $\geq 66,3$ % | 15 | 69,1 | 2,1 | 4,4 | 0,2 | Média total | 15 | 7,94 | 3,4 | 0,5 | 0,2 |
| | | | | | | Normal | 2 | 12,4 | 0,7 | 0,9 | 0,1 |
| | | | | | | Baixa | 13 | 6,9 | 2,9 | 0,4 | 0,2 |
| | | | | | | Elevada | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 656 | | | | | 656 | | | | | |

Os resultados obtidos na dosagem de albumina sugeriram que quando o valor de albumina encontrado está dentro da faixa de referência, 85,7 % (384) das amostras

apresentaram a fração gama também dentro deste intervalo, mas 8% (36) apresentaram resultados da fração gama elevada.

Na situação onde a albumina estava baixa em relação ao valor de referência 54,9 % (106) das amostras apresentaram valores elevados na fração gama, e 42,5 % (82) das amostras apresentaram valores normais de fração gama.

E finalmente, na condição onde a albumina encontrava-se elevada em relação ao valor de referência 86,6 % (13) das amostras apresentaram a fração gama baixa.

4. DISCUSSÃO

Na análise dos dados observamos um maior número de resultados de pacientes do sexo feminino do que do sexo masculino (Tabela 1). Esse resultado embora pareça contrapor a prevalência do MM que é mais comum em homens que mulheres (ZAGO et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), é relativa porque em nossas amostragem de resultados foram incluídos mais mulheres que homem, o que interfere diretamente nos dados estatísticos, e pode não refletir a prevalência da doença a nível nacional e mundial. Para além desta justificativa, é sabido que as mulheres tem um cuidado maior com sua saúde e realizam mais exames de rotinas e *check-ups*, explicando, possivelmente, o maior número de exames realizado por este grupos.

A média da idade dos resultados foi de 48,1 anos, com as duas faixas etárias mais prevalentes entre 19-50 anos (348 – 53 %) e 51-65 anos (162 (25 %) (Tabela 2), que coincidem com a idade descrita na literatura como sendo aquela onde são observados no primeiros sinais do MM, segundo o Ministério da Saúde, 43,1 % dos pacientes investigados para MM apresentam idade > 51 anos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Apenas 4 % (25) dos resultados dos pacientes incluídos em nossa pesquisa apresentaram idade abaixo dos 18 anos (Tabela 2). O MM é muito raro em pacientes menores de 25 anos (ZAGO et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015) o que sugere que este exame foi solicitado para pesquisa de outra patologia que não o MM, pois a eletroforese, apesar de ser um exame indicado para quantificação do pico M, pode também ser usado para verificar o comportamento das proteínas do soro.

A comparação entre as duas metodologias demonstra uma ótima correlação entre os métodos. Ao avaliar o desvio-padrão, a diferença entre os dois métodos é pequena, mesmo ocorrendo a conversão dos resultados da EPSC para g/dL (Tabela 3). O CV obtido demonstra que o resultado bruto é condizente também com o encontrado entre as metodologias possuindo uma pequena vantagem sobre o método espectrofotométrico. Este resultado corrobora com a hipótese de utilizar a EPS como um exame para obter a concentração da albumina e a concentração do pico M usado para monitor o MM. Este resultado pode ser interessante para pacientes com GMSI ou MML, pois com um único exame será possível obter dois resultados importantes para o acompanhamento da gamopatia.

Ao observar a albumina dosada pela EPS (Tabela 4) observamos que entre os pacientes com albumina dentro dos valores de referência, temos que 85,7 % possuem a fração gama em

valores normais. Apesar do valor de albumina estar normal, neste grupo temos um total de 15,3 % com valores alterados em gama. Cerca de 8 % possuem a fração gama elevada sendo um indicativo de alteração nas imunoglobulinas, mas devido à ausência do gráfico gerado pela EPS na análise dos dados, não é possível identificar se esse aumento é devido a um pico M ou a uma hipergamaglobulinemia, causada por uma infecção, reação inflamatória ou imune (SILVA, 2008).

Nos resultados que tinham os valores de albumina abaixo do valor de referência, 54,9 % possuem a fração gama elevada, este grupo demonstra o modelo clássico de pacientes com pico M (SILVA, 2008), já que o aumento das proteínas monoclonais geralmente, eleva o valor da fração gama refletindo na diminuição da albumina. Apesar de 42,5 % destes resultados possuírem os valores da fração gama dentro dos valores de referência de bula não exclui a possibilidade de uma gamopatia já que as imunoglobulinas do tipo IgA e IgM podem migrar junto com as proteínas da fração beta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; SILVA, 2008; KEREN, 2006) e apesar de não alterar a fração gama, essa alteração pode ser observada na diminuição da albumina. Além disto diversas patologias podem diminuir a albumina também, como doenças hepáticas, doenças renais e desnutrição (KEREN, 2006).

O aumento da albumina geralmente está associado a causas de desidratação ou plasmaferese, porém nestes casos ocorre um aumento nas outras frações proteicas (KEREN, 2006). Em 86,6 % dos resultados de albumina acima do valor de referência obterão valores abaixo do valor de referência para a fração gama, indicando uma possível hipogamaglobulina.

Após o diagnóstico de gamopatia e a identificação da presença da proteína M, sempre haverá necessidade de um acompanhamento, resultando em frequentes exames. A correlação entre as duas metodologias fortaleceria o ISS, concentrando diversas informações em um único exame. Como a EPS já nos fornece, através do cálculo de porcentagem da banda albumina pela proteína total, a concentração de albumina e a concentração do Pico M, podemos dispensar a dosagem de albumina por espectrofotometria e focar na EPS, mantendo as informações necessárias com um menor número de exames, diminuindo o custo do tratamento sem perder a qualidade no acompanhamento da doença.

5. CONCLUSÃO

A EPSC é um método extremamente útil na identificação e acompanhamento de alterações proteicas, principalmente quando se quer observar o perfil proteico do paciente. É um método relativamente simples de interpretação quando se compreende a metodologia e a traduz na forma de liberação dos resultados em laudo laboratorial simples.

A correlação analítica entre as duas metodologias empregadas no estudo apresentaram baixo grau de dispersão ou variação da albumina em relação à média (valor esperado), mostrando a homogeneidade entre os dados, e confirmando que as duas metodologias podem ser usadas de forma equivalente, e que o uso da EPS sem dúvida reduziria gastos laboratoriais, promovendo economia de tempo e menor custo financeiro para o paciente ou seu convênio.

Para pacientes que tiveram a gamopatia confirmada, principalmente pelo método da imunofixação, o uso da EPS para acompanhamento é extremamente útil indicando a concentração do pico M e a concentração da albumina, fazendo o monitoramento das proteínas M com um único exame diminuindo os custos do tratamento, aumentando a qualidade de vida dos pacientes e tornando um pouco menos árduo o tratamento do MM.

6. REFERÊNCIAS

ATTAELMANNAN, M.; LEVINSON, S. S.; Understanding and Identifying Monoclonal Gammopathies. *Clinical Chemistry*, EUA, v. 8, n. 46, p.1230-1238, ago. 2000

BATAILLE, R.; ANNWEILER, C.; BEAUCHET, O. Multiple Myeloma International Staging System: “Staging” or Simply “Aging” System?. *Clinical Lymphoma Myeloma And Leukemia*, [s.l.], v. 13, n. 6, p.635-637, dez. 2013.

BOTTINI, P. V. Testes laboratoriais para avaliação do componente monoclonal. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo, v. 1, n. 29, p.23-26, mar. 2007

CADTH. Protein Testing in Patients with Multiple Myeloma: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines. Canada. 2015.

CONTROLLAB. Controle Interno Bioquímica. Disponível em: <http://www.controllab.com.br/pdf/bula_bq_ahh3p_bhh3n_2013_01.pdf>. Acesso em: 28 maio 2016.

DHAKAL, B; GIRNIUS, S; HARI, P. Recent advances in understanding multiple myeloma. *F1000research*, [s.l.], v. 5, p.2053-2063, 23 ago. 2016.

FARIA, R. M. D.; SILVA, R.O. P. Gamopatias monoclonais – critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, Minas Gerais, 2007.

IMF. Entendendo a eletroforese de proteína. Disponível em: <<http://www.mielomabrasil.org/estadiamento-do-mieloma.php>>. Acesso em: 28 maio 2016.

KEREN, D. F. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. Inglaterra: Hodder Arnold, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 708, de 6 de agosto de 2015. Aprova as diretrizes diagnósticas e terapêuticas do Mieloma Múltiplo. Brasil

RAJKUMAR, V. S. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *American Journal Of Hematology*, [s.l.], v. 91, n. 1, p.90-100, 23 dez. 2015.

SEBIA. Capillarys Protein. França: Sebia, 2006

SIEMENS. Albumin ADVIA 2400. Nova York: Siemens, 2008.

SIEMENS. ADVIA 2400 Technical Specifications. Disponível em: <http://www.ppa-co.com/wp-content/uploads/2012/10/ADVIA_2400.pdf>. Acesso em: 28 maio 2016

SILVA, R. O. P.; LOPES, A.F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Revista Médica de Minas Gerais, Belo Horizonte, v. 2, n. 18, p.116-122, jun. 2008

SILVA, R. O. P. et al. Mieloma múltiplo: características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e estudo prognóstico. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., [s.l.], v. 31, n. 2, p.63-68, abr. 2009

SPUDEIT, D.A.; DOLZAN, M.D.; MICKE, G.A. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. Scientia Chromatographica, [s.l.], v. 4, n. 4, p.287-297, 2012.

TATE, J. et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. Annals Of Clinical Biochemistry, [s.l.], v. 49, n. 3, p.242-256, mar. 2012.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Tratado de Hematologia: Distúrbios dos Plasmócitos e Doenças Correlatas. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013.