

Programa ScanProt para electroforesis de proteínas en el diagnóstico de enfermedades crónicas no transmisibles

Sandra Fernández Torres¹, Eddy Bover Fuentes², Cira C. León Ramentol³, Lidyce Quezada Leyva⁴, Ubaldo Torres Romo⁵

1. Licenciada en Laboratorio Clínico. Profesor Asistente. Investigador Agregado. Centro de Inmunología y Productos Biológicos. Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey (UCM-C). Carretera Central Oeste Km 4^{1/2}, Camagüey, Cuba. E-mail: sft@iscmc.cmw.sld.cu
2. Licenciado en Química. Investigador Agregado. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Cuba. E-mail: eddy.bover@cigb.edu.cu
3. Máster en Enfermedades Infecciosas. Especialista de 2do Grado en Laboratorio Clínico. Profesor Auxiliar. Investigador Agregado. UCM-C. Carretera Central Oeste Km 4^{1/2}, Camagüey, Cuba. E-mail: cira@iscmc.cmw.sld.cu
4. Máster en Diagnóstico Veterinario. Médico Veterinaria Zootecnia. Profesor Instructor. Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI). UCM-C. Carretera Central Oeste Km 4^{1/2}, Camagüey, Cuba. E-mail: lidyce@iscmc.cmw.sld.cu.
5. Licenciado en Bioquímica. Profesor Auxiliar. CENIPBI. UCM-C, Cuba. Carretera Central Oeste Km 4^{1/2}, Camagüey, Cuba. E-mail: neida@infomed.cmw.sld.cu.

Resumen

Introducción: El aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles como el síndrome nefrótico, cirrosis hepática y mieloma múltiple, requieren dentro de sus estudios una confirmación diagnóstica basada en una electroforesis de proteína sérica, la cual se interpreta a través de un densitómetro. **Objetivo:** Demostrar la utilidad del programa ScanProt para electroforesis de proteínas en la confirmación diagnóstica de enfermedades crónicas no transmisibles en la provincia de Camagüey. **Material y métodos:** Se

realizó un estudio descriptivo transversal, en la provincia Camagüey, entre abril de 2016 y enero de 2017. Se trabajó con pacientes con mieloma múltiple, procedentes del servicio de Hematología de los Hospitales Amalia Simoni y Manuel Ascunce Domenech, así como con aquellos diagnosticados con síndrome nefrótico y cirrosis hepática, provenientes de los servicios de nefrología y gastroenterología de este último centro hospitalario. **Resultados:** Las salidas que aporta el programa utilizado reflejan los parámetros químicos relacionados con las corridas electroforéticas de las enfermedades descritas anteriormente. Estos parámetros son: proteínas totales, albúmina, Alfa 1 globulinas, Alfa 2 globulinas, Beta globulinas y Gammaglobulinas, las cuales tuvieron su representación gráfica expresada en cinco fracciones, en cada una de las cuales se ubican diferentes proteínas, marcando los patrones de las enfermedades en estudio. **Conclusiones:** Existió correspondencia entre los patrones obtenidos por densitometría descritos en la literatura y los alcanzados con el programa ScanProt en las patologías analizadas. La aplicación del programa contribuyó a la confirmación diagnóstica y evolutiva del estado de salud de los pacientes en los cuales se empleó.

Palabras clave: electroforesis de proteínas; densitometría; mieloma múltiple; síndrome nefrótico.

Introducción

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida, son las biomoléculas más versátiles y diversas, imprescindibles para el crecimiento del organismo y realizan funciones diferentes.¹

En años recientes se ha incrementado el interés en la exploración del proteinograma, particularmente para el establecimiento de mapas que ayuden en el descubrimiento de biomarcadores auxiliares en el diagnóstico de diversos padecimientos, entre los que se encuentran las enfermedades renales,^{1,2} inflamatorias agudas y crónicas, cáncer, cirrosis hepática, y enfermedades autoinmunes como el mieloma múltiple.³

La electroforesis basada en la química analítica proporciona un mapa detallado de las sustancias que forman una muestra bioquímica a través del proteinograma para la detección de proteínas, representando cada sustancia por picos, donde la amplitud de cada uno está relacionada con la concentración de cada sustancia en la muestra.⁴

La electroforesis constituye parte importante del procedimiento rutinario del análisis de los ácidos nucleicos y proteínas. Así como el microscopio permite visualizar microorganismos y estructuras similares, la electroforesis ayuda a observar los ácidos nucleicos y proteínas al final del procedimiento.⁵

El suero contiene una variedad de proteínas diferentes que serán separadas mediante electroforesis en cinco o seis fracciones (según el método usado por el laboratorio). Estas fracciones (también conocidas como “zonas” o “regiones”) se denominan Albúmina, Alfa 1, Alfa 2, Beta (que puede separarse en Beta 1 y Beta 2), y, Gamma.

La albúmina, producida en el hígado, se corresponde con una única banda y representa aproximadamente el 60% de las proteínas séricas. Con el término “globulinas”, se alude al resto de proteínas diferentes de la albúmina. A excepción de las inmunoglobulinas y de algunas proteínas del complemento, la mayor parte de proteínas son también de síntesis hepática. Las inmunoglobulinas normales presentes en el suero son diversas y presentan leves diferencias en su estructura y carga eléctrica.

La electroforesis es una técnica que presenta mejoras sustanciales principalmente por los pequeños volúmenes de sustancias necesarias para el estudio y rapidez con que se obtienen los resultados del análisis. Una de las ventajas sobre otros métodos de separación es que requiere una instrumentación relativamente simple: fuente de alto voltaje, cubeta que contiene solución amortiguadora y tiras de acetato de celulosa (“Cellogel”).⁵ Los volúmenes de muestra a analizar son extraordinariamente pequeños, y la duración del tiempo suele ser de 30 minutos.

Es importante la cuantificación de cada una de estas fracciones para la confirmación de diferentes patologías, por lo cual se decidió utilizar el programa ScanProt que permite realizar el electroforegrama una vez que se introduce la imagen de la corrida electroforética en el mismo, y con ello contribuir a realizar el diagnóstico de certeza de diferentes enfermedades.^{6,7}

Los datos obtenidos a través de la corrida son cuantificados por densitometría, técnica por la que se puede determinar la densidad de una sustancia. El procedimiento más habitual se basa en la proporción de luz que deja pasar y retiene una determinada masa.

Los densitómetros son espectrofotómetros especializados que se utilizan para cuantificar la cantidad de proteínas que se encuentra en una determinada banda. Para este caso en particular existen algunos programas de computación que pueden realizar la tarea, como por ejemplo Scion Image. Son equipos de altas tecnologías y de difícil adquisición.

Es un software para el procesamiento de imágenes de papel de acetato de celulosa, geles en agarosa o poliacrilamida. Procesa imágenes de cromatogramas, permitiendo determinar el grado de pureza, la concentración y peso molecular de proteínas, sirve además para comparar perfiles cromatográficos o densitogramas diferentes. Fue validado por su creador con densitómetro convencional. El ScanProt tiene utilidad práctica en laboratorios de investigación científica y laboratorios clínicos.

La ventana principal consta de un Menú desplegable y sus respectivos botones de acceso rápido en la barra de herramientas para las diferentes funciones y operaciones. Cada elemento del menú se activa o desactiva automáticamente en función de las opciones disponibles. Un dato importante para el manejo del software es la introducción del valor de las proteínas totales obtenida por el método de Biuret.

Es importante la cuantificación de cada una de estas fracciones para la confirmación de diferentes patologías, la cual usualmente se realiza en el densitómetro, equipo que no se posee en la provincia, por lo cual se decidió

utilizar de manera alternativa el programa ScanProt que permite realizar el electroforegrama una vez que se introduce la imagen de la corrida electroforética en el mismo y con ello contribuir a realizar el diagnóstico de certeza de diferentes enfermedades,^{6,7} todo lo cual motivó la realización de esta investigación, con el objetivo de demostrar la utilidad del programa ScanProt para electroforesis de proteínas en la confirmación diagnóstica de enfermedades crónicas no transmisibles en la provincia de Camagüey.

Material y método

Se realizó un estudio descriptivo transversal, entre abril de 2016 y febrero de 2017, en el Laboratorio 3 de las Ciencias Básicas Biomédicas del CENIPBI, en la UCM-C

Se trabajó con pacientes con mieloma múltiple, procedentes del servicio de Hematología de los Hospitales Amalia Simoni y Manuel Ascunce Domenech, así como con aquellos diagnosticados con síndrome nefrótico y cirrosis hepática, provenientes de los servicios de nefrología y gastroenterología de este último centro hospitalario.

Los pacientes provenían de la consulta externa y de las salas en que se encontraban hospitalizados. La población objeto de estudio quedó constituida por 90 pacientes divididos en tres grupos de 30 cada uno.

Técnicas y procedimientos

Recogida de la información: Los datos de interés fueron recogidos de la solicitud de ensayo realizada por el médico de asistencia, en la cual, además de reflejar la impresión diagnóstica y los datos clínicos se registraron también los valores de las proteínas totales del paciente; determinación que fue realizada en los laboratorios de los lugares de origen, con la misma muestra que se envió a nuestro laboratorio.

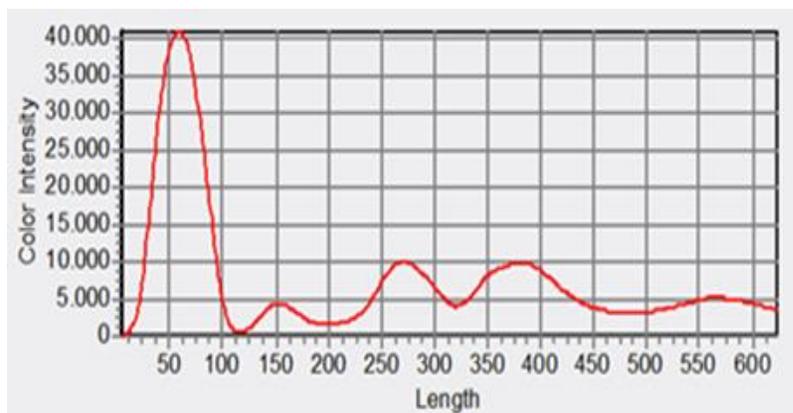
Como variables de interés se utilizaron los antecedentes patológicos personales, los valores de proteínas totales y el electroforegrama descrito en el software, el cual fue comparado cualitativamente con los patrones estandarizados en cada

patología por densitometría.

Luego de realizar todos los pasos descritos en el manual del software se procedió a la comparación de los patrones obtenidos con los descritos tradicionalmente al realizar la electroforesis por la densitometría convencional. Los resultados se presentaron en forma de gráficos.

Resultados y discusión

Gráfico 1. Proteinograma normal de una corrida electroforética interpretada por el ScanProt.



Fuente: Programa ScanProt.

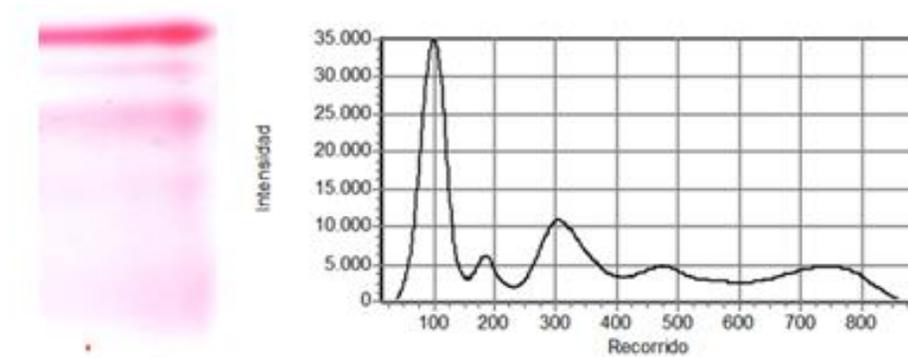
La primera muestra procesada fue de un paciente supuestamente sano que tenía una concentración de proteínas totales de 77,9 g/L, las cuales estaban dentro del rango de normalidad ya que este es de 60 a 80 g/L. Tras la corrida electroforética se obtuvo un patrón normal visible con el software ScanProt, el cual se comparó con el descrito por densitometría y se comportó de manera similar, por lo que se tomó como patrón de referencia al realizar cada corrida.

Es de vital importancia la introducción del valor de las proteínas totales para el cálculo posterior de cada una de las fracciones por el software. A partir de ello se obtiene una representación gráfica de las fracciones tal como refieren numerosos autores entre los que podemos citar a Tiselius padre de las electroforesis, que obtuvo el Premio Nobel por lograr la separación de las fracciones proteicas.¹

Desde el punto de vista práctico la utilización de este software permite la interpretación de la electroforesis solo de forma cualitativa al analizar cada fracción y observar el patrón electroforético, para determinar su correspondencia o no con patrones previamente conocidos, teniendo en cuenta la impresión diagnóstica.

A diferencia de las electroforesis realizadas en el densitómetro no permite cuantificar el cálculo exacto de la concentración de cada fracción. Con este valor de proteínas totales que se introduce genera un cálculo según la intensidad del color desarrollado y ofrece una cifra aproximada. El valor real está en la corrida que describe.

Gráfico 2. Proteinograma del síndrome nefrótico realizado en el ScanProt.



Fuente: Programa ScanProt.

De los 30 pacientes con diagnóstico de síndrome nefrótico del estudio, 27, que representaron el 90%, tuvieron una correlación patología-patrón electroforético descrita en la literatura revisadas. Solo 3 de ellos para un 10% no describieron el patrón. Estos se encontraban bajo tratamiento médico teniendo un control metabólico normal.

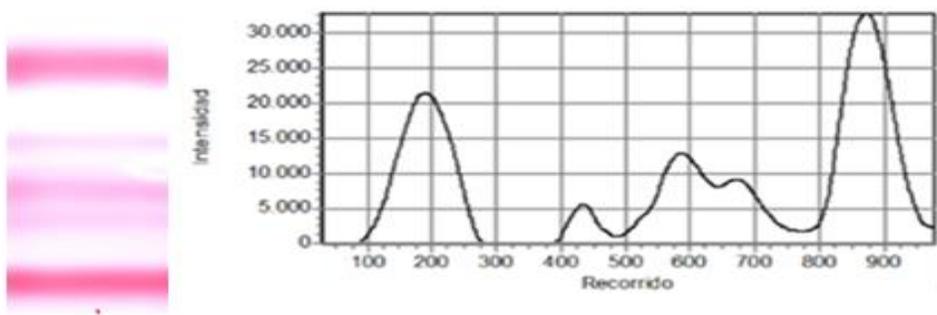
Las posibilidades de padecer una enfermedad renal aumentan a medida que la persona envejece. Es difícil establecer si esta relación se da por la edad, por sí misma o por la asociación epidemiológica con otros factores de riesgo como la hipertensión arterial, la hiperglucemia y las enfermedades autoinmunes. Lo cierto es, que los riñones, como órganos vitales, debido a las numerosas funciones bioquímicas y endocrinas no escapan de estas transformaciones.⁸

La pérdida de grandes cantidades de albúmina por el riñón, es una característica del síndrome nefrótico. Este puede ser causado por diabetes, enfermedad del tejido conectivo, enfermedad glomerular y circulatoria. Se caracteriza por una marcada disminución de la albúmina y un aumento de Alfa 2 globulinas, así como por una disminución de las Alfa 1, beta, gammaglobulina como consecuencia de las pérdidas renales de las proteínas de menor peso molecular y el aumento compensatorio de las de mayor peso molecular a fin de mantener el poder oncótico del plasma.⁹

La Sociedad Americana del Cáncer estimó que para el 2016 se diagnosticarían 30,330 nuevos casos de mieloma y que 12,650 personas morirían a causa de ello en los Estados Unidos¹⁰. Esta es una enfermedad hematológica que raramente es diagnosticada en personas menores a 45 años.¹¹

La comparación visual o cualitativa en el grupo de 30 pacientes con diagnósticos de mieloma múltiple fue variada. Se encontraron picos monoclonal y policlonal, además de patrones betagamma los cuales se describen a continuación.

Gráfico 3. Proteinograma monoclonal realizado en el ScanProt.



Fuente: Programa ScanProt.

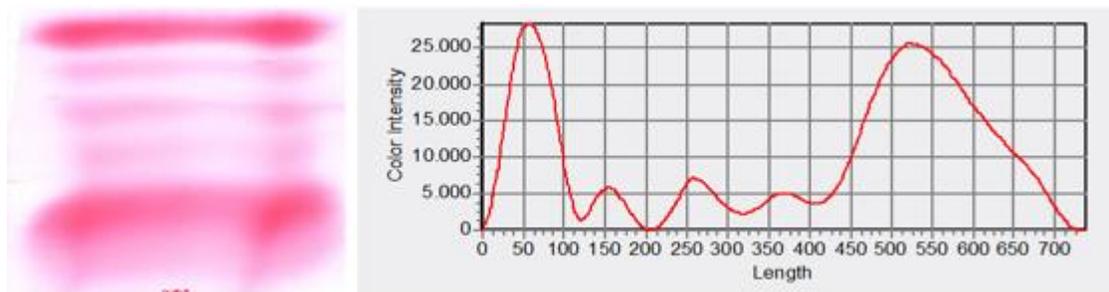
En este grupo de pacientes, solo 17 para un 56,66% describieron un patrón monoclonal característico del mieloma múltiple con un pico proteico muy pronunciado con base estrecha, esto se corresponde con lo planteado por Cruz¹², quien describe que si la proliferación ocurre de forma aislada en un grupo celular que produce una clase y tipo de inmunoglobulina, la afectación es monoclonal (un clon), y su expresión en el patrón electroforético se caracteriza

por un pico proteico muy pronunciado, con base estrecha, en la zona de las alfa globulinas, beta globulinas o gammaglobulinas.¹²⁻¹⁴

En nuestro estudio el pico fue descrito solamente en la región gamma. Cuando existe un cáncer de células plasmáticas, sólo se produce un tipo de anticuerpo por estas células cancerosas, conocido como proteína monoclonal (proteína M). Esta proteína anómala puede visualizarse como una banda característica en el patrón electroforético.

A pesar de que los patrones pueden ser benignos, especialmente cuando son pequeños, describen, especialmente al mieloma múltiple, amiloidosis primaria, macroglobulinemia de Waldenström y linfomas malignos ocasionales.^{15,16}

Grafico 4. Proteinograma policlonal interpretado por el ScanProt.



Fuente: Programa ScanProt.

Al analizar los gráficos obtenidos tras la corrida electroforética de los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple, un 37 % marcaron una zona ancha difusa en el área de las gammaglobulinas. Este aumento corresponde al de las tres inmunoglobulinas.

Esto coincide con lo descrito por los autores revisados, ya que se plantea que las células productoras de inmunoglobulinas (células plasmáticas y linfocitos) tienen una función muy especializada. Cada una de ellas, agrupadas en clones, produce la misma clase y tipo de inmunoglobulina. La proliferación de estas células, conocidas como inmunocitos, puede ocurrir en varios grupos de ellas, lo que da lugar a varias clases y tipos de inmunoglobulinas. En este caso, se dice que la afectación es policlonal (varios clones) y su expresión en el patrón electroforético se caracteriza por un pico proteico no pronunciado, con una base

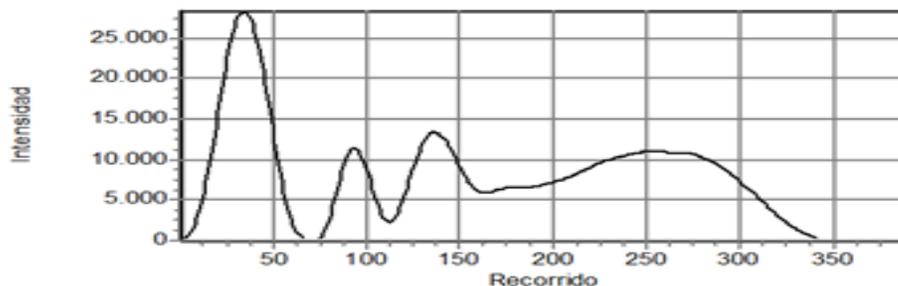
ancha.¹³

La gammapatía policlonal es la anomalía más común en el proteinograma. Es común en un proceso inmunológico crónico, tal como aquel encontrado en las enfermedades del hígado (cirrosis, hepatitis crónica activa), del colágeno (lupus, artritis reumatoidea), infecciosas (osteomielitis, bronquiectasis, leishmaniasis visceral, lepra), estados inflamatorios (sarcoidosis), neoplasmas (algunos estadios de la enfermedad de Hodgkin), y leucemia mielomonocítica crónica.

Muchas pequeñas bandas (oligoclonales) son observadas en pacientes con hepatitis, enfermedades del complejo inmune, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y linfadenopatía angioinmunoblástica.^{9, 12, 17}

En la investigación se encontraron cuatro pacientes, entre los 30 con diagnóstico de mieloma múltiple para un 13 %. Los patrones de estos no marcaron su pico policlonal, ni monoclonal característico, lo cual pudiera estar en correspondencia con la estabilidad de su patología por respuesta adecuada al tratamiento médico. Los patrones descritos por el ScanProt fueron consecuentes con el diagnóstico de dichas patologías, según criterio de su médico de asistencia.

Gráfico 5. Proteinograma de cirrosis hepática interpretado por ScanProt



Fuente: Programa ScanProt.

El hígado lleva a cabo varias funciones bioquímicas, de síntesis y de excreción, por lo cual no hay una prueba que tenga la capacidad de detectar el estado de su función total.¹⁶

Varios estudios^{18,19} han demostrado que debido a que el hígado es el lugar de síntesis de albúmina y globulinas, las enfermedades que lo afectan modifican en consecuencia el trazado electroforético, lo que hace que los niveles de albúmina desciendan en aquellos casos de avanzado daño hepatocelular, como ocurre en la hepatitis viral aguda, con aumentos de IgG e IgM y enfermedades crónicas del hígado, incluyendo cirrosis con marcado aumento de la inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) y la inmunoglobulina M (IgM), disminución de albúmina y transferrina.

El daño biliar produce aumento de los niveles de C4 y betalipoproteína.^{18,19} Tras la corrida con el ScanProt se detectó en los pacientes con esta patología lo descrito en la literatura en correspondencia con su diagnóstico. De esta forma se encontró el llamado puente beta-gamma, debido a la presencia de IgA en la zona de ambas fracciones.²⁰

Es importante destacar que al visualizar la corrida electroforética se deben analizar todos los datos del gráfico, ya que aunque aparentemente describan iguales concentraciones, al observar en la escala numérica que se corresponde con la intensidad del color, los valores representados son menores o mayores que los del patrón normal.

Conclusiones

Existió correspondencia entre los patrones obtenidos por densitometría descritos en la literatura y los alcanzados con el programa ScanProt en las patologías analizadas.

La aplicación del programa contribuyó a la confirmación diagnóstica y evolutiva del estado de salud de los pacientes en los cuales se empleó.

Referencias bibliográficas

1. Campuzano Maya G. La electroforesis de proteínas y su aplicación en la clínica. Laboratorio al Día 1990; 2:1-5.

2. Óriordan E, Orlova T, Mei J. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004; 12:3240-8.
3. Campuzano Maya G. La electroforesis de proteínas más que una prueba de laboratorio. *Medicina y Laboratorio* 2006; 12:47-70.
4. Ceballos G, Paredes J, y Hernández L. Pattern recognition in capillary electrophoresis data using dynamic programming in the wavelet domain. *Electrophoresis* [Internet] 2008 [citado 2016 Nov 25]. Disponible en: <http://www.fltk.org/>.
5. Cuadros J, Paredes JL, Ceballos G. Herramienta de software para el análisis de datos electroforéticos. *Mecánica Computacional* 2008; 27:3299-315.
6. Cuadros J, Paredes JL, Dhionel D. Herramienta de visualización y procesamiento de señales electroforéticas desarrolladas usando software libre. *Revista ciencia e ingeniería* 2007; 28(3): 125-134
7. Candebat Fernández OA, Rodríguez Bell Z, Rodríguez Bell V, Torres Candebat F, Callejas Candebat S. Tratamiento hemodialítico y evolución de los ancianos con insuficiencia renal crónica. *MEDISAN*. 2009; 13(5):25-31.
8. Pérez Ruiz L. Proteínas plasmáticas. En: *Bioquímica clínica para tecnología de la salud*. Tomo II. La Habana: Ecimed; 2012. p. 69-78.
9. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures* 2016. [Internet] Atlanta: American Cancer Society; 2016 [citado 2016 Nov 25] Disponible en: [<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>].
10. Chiriva Internati M, Ferraro R, Prabhakar M, Yu Y, Baggoni L, Moreno J, Gagliano N, Portinaro N, Jenkins MR, Frezza EE, Hardwicke F, D'Cunha N, Kast W, Cobos E. The pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG-1): an immunological target for multiple myeloma. *J Transl Med*. 2008 Apr 2;6:15-33.
11. Fernández Regalado R. Electroforesis. En: *Bioquímica. clínica. Principios y quías para el laboratorio* 2^{da} ed. La Habana: Ecimed; 2016. p 99 -126.
12. Cruz Rodríguez C. *Laboratorio Clínico. Química clínica*. La Habana: Ecimed; 2004.

13. Bradwell A, Harding S, Fourrier N. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig κ / Ig λ ratios in multiple myeloma patients. *Leu-kemia* 2013; 27: 202-7.
14. Lakomy D, Lemaire Ewing S, Denimal D. Evaluation of the new Hevylite® IgA assay for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. *Ann Biol Clin* 2013;71: 157-63.
15. Jhon E, Santiago P, Robin G. Prieto O, Ever L. Rojas D. Características clínicas y descompensación en pacientes con cirrosis hepática atendidos en dos centros de hepatología en la ciudad de Bogotá D.C, 2010-2014. *Rev Col Gastroenterol* [Internet] 2016 [citado 2016 Nov 25]; 31(1): [aprox. 10 p.]. 2016. Disponible en: <https://www.revistagastrocol.com/index.php/rcg/article/viewFile/66/66>.
16. Fernández Daza E, Fernández JE, Moreno Mejía I, Moreno Mejía M. Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Medicina & Laboratorio* [Internet] 2008 [citado 2017 Nov 25]; 14: 533-546. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl0811-12c.pdf>.
17. Fernández J, Alvarado C, Godoy S, Valencia L. Paraproteína. *REV MED HONDUR* [Internet] 2014 [citado 2017 Nov 25]; 82(2): [aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2014/pdf/Vol82-2-2014-9.pdf>.
18. Pallin DJ, Ronan C, Montazeri K, Wai K, Gold A, Parmar S, et al. Urinalysis in acute care of adults: pitfalls in testing and interpreting results. *Open Forum Infect Dis*. 2014 Jun 23;1(1): 15-27.
19. San Miguel J. Multiple myeloma: a model for scientific and clinical progress. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014 Dec 5; 2014(1):1-7.
20. Rojas Torres DS, Bastidas Yaguana DK, Sierra Santos L, Aguilar Shea AL. Importance of selective immunoglobulin A deficiency. *Semergen*. 2014 Apr; 40(3):65-8.