

UTILIDAD DEL PROTEINOGRAMA EN CLÍNICA DE PEQUEÑOS ANIMALES



[Gustavo Sánchez Visconti](#)

[Laboratorio de Análisis Veterinarios Arturo Soria \(LAV\)](#)

[C/ Querol 4](#)

[28033-MADRID](#)

[Tfno.: 91-383 84 93](#)

lav@lav-asoria.com

Actualmente en los laboratorios es posible determinar casi cualquier sustancia, pero uno de los primeros análisis realizados en la historia de la medicina fue el de las proteínas. Sin lugar a dudas el interés suscitado por el papel de las proteínas en el organismo es totalmente lógico, ya que son de los compuestos biológicos más abundantes en el organismo. Forman parte de la estructura celular, mantienen la presión oncótica, son responsables de la coagulación sanguínea, poseen función transportadora y enzimática y constituyen los anticuerpos. Una de las formas de separación y visualización de las proteínas es la electroforesis. Este método ideado hace más de 50 años, se basa en separar las proteínas por medio de un campo eléctrico. De este modo se obtienen distintos grupos de proteínas en forma de bandas, que una vez teñidas da lugar a una imagen de las diferentes fracciones proteicas, que es lo que se denomina proteínograma.

En este artículo explicaremos el principio del proteínograma, describiremos cómo se realiza y valoraremos su utilidad en la clínica.

PRINCIPIO DE LA ELECTROFORÉISIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas están formadas por aminoácidos, que son compuestos orgánicos que tienen un grupo amino (NH_3^+), lo que les confiere un carácter básico, y un grupo carboxilo (COO^-), que implica un comportamiento ácido (figura 1). A

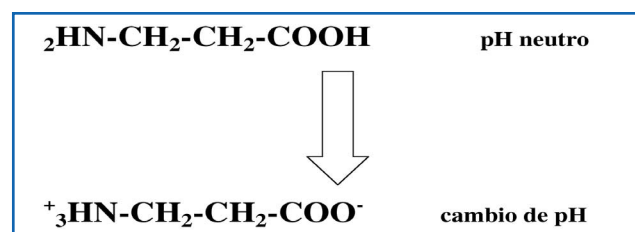


Figura 1.- Fórmula molecular del aminoácido Alanina. Posee únicamente un grupo amino (NH_2) y otro ácido (COOH) que a pH neutro no adquiere carga eléctrica. Al cambiar a un pH básico, estos grupos se ionizan y presentan cargas positivas y negativas.

pH neutro, los aminoácidos no están cargados, es decir, tienen un punto isoeléctrico neutro. Sin embargo, al variar el pH los aminoácidos adquieren carga. A un pH en torno a 8, la mayoría de las proteínas se cargan negativamente. Esto dependerá, entre otras cosas, de la cantidad de grupos amino y carboxilo que posea. Si ponemos un grupo de proteínas en solución (como es el suero sanguíneo) sobre un soporte de papel o un gel, inmerso en un tampón de pH básico, todas las proteínas estarán cargadas. Si ahora sometemos el suero a una corriente eléctrica, al cabo del tiempo se separarán grupos o fracciones de proteínas en función de su carga y su peso molecular. En la electroforesis, las proteínas séricas se separan en 5 bandas o fracciones:

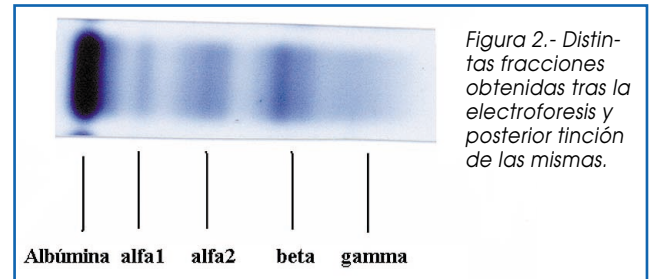
- Albúmina
- α_1 globulinas
- α_2 globulinas
- β globulinas
- γ globulinas

Estas fracciones se distribuyen, aparte de por su carga, por su peso molecular. Así, la albúmina tiene un peso molecular de 70.000 daltons y un punto isoeléctrico de 4.7. Estas dos condiciones hacen que la albúmina sea la que migre más hacia el polo positivo. Las α y β globulinas son muy heterogéneas y su peso molecular oscila entre 40.000 y 1 millón de daltons. Las γ globulinas presentan un peso molecular cercano a los 150.000 daltons, excepto la Ig M, con más de 1 millón de daltons.

A veces, y según el soporte, se pueden separar hasta dos fracciones de β globulinas. El gel de agarosa es uno de los soportes con los que se obtiene mayor separación de bandas. Son geles que presentan una buena conductividad, y la separación se puede mejorar si aumentamos el tiempo de electroforesis, y/o el voltaje de la corriente eléctrica. Sin embargo, no podemos aumentar demasiado el voltaje, ya que nos expondríamos a quemar el soporte de agarosa.

La albúmina es la proteína más abundante del organismo en condiciones normales, por lo que será la banda que más destaque en el proteínograma. La variación de ésta y las otras fracciones es lo que nos indicará cambios en la cantidad de ciertas proteínas, y como consecuencia una posible patología.

Una vez acabado el tiempo de separación de las distintas fracciones, por medio de un colorante se tiñen éstas, visualizándose 5 bandas correspondientes a cada fracción anteriormente mencionadas (figura 2). A simple vista se puede ver que fracción es más intensa o más ancha, o ambas particularidades a la vez. No obstante, la intensidad y anchura de cada banda se visualiza con un instrumento llamado



fotodensitómetro, que transforma las bandas en curvas, como veremos más adelante.

Las distintas fracciones o bandas aglutinan a varios grupos de proteínas distintas.

- La albúmina se aísla sólo.
- ALFA 1, formada por:
 - o α lipoproteína o HDL lipoproteína, transporta el colesterol desde los vasos sanguíneos al hígado.
 - o α_1 glucoproteína ácida o seromucoide. Reactante de la fase aguda.
 - o α_1 antitripsina y α_1 antiquimiotripsina. Las dos con carácter enzimático inhibitorio.
- ALFA 2. Se compone de:
 - o Macroglobulina o antiplasmina α_2 .
 - o Ceruloplasmina, una oxidasa de cobre.
 - o Haptoglobina, que elimina la hemoglobina por el retículo endotelial.
 - o Proteína C reactiva o factor de respuesta específica a la inflamación.

En las alfa 1 y 2 también están todas las proteínas del complemento.
- BETA se incluyen:
 - o Fibronectina, presente en los procesos de fagocitosis.
 - o β lipoproteína o LDL lipoproteína. Transporta el colesterol desde el hígado a los vasos sanguíneos.
 - o Transferrina o proteína que transporta el hierro hasta la médula ósea.
 - o β_2 microglobulina. Es una cadena ligera del complemento HLA.
 - o β_1 glucoproteína. Específica del embarazo y tumores.
 - o Transcobalamina 2, se encarga del transporte de vitamina B12 (cobalamina).
 - o Hemopexina. Retiene el grupo hemo liberado en la hemólisis.
- GAMMA
 - o En ella se agrupan los anticuerpos. Posiblemente sea la fracción más importante desde el punto de vista

clínico. Hay 5 tipos de inmunoglobulinas o γ globulinas: A, G, M E y D. Todas ellas implicadas en procesos inmunes. El significado y la implicación detallada de cada una de ellas en estos procesos se escapa del tema de este artículo. Se puede observar un aumento generalizado en la región γ , o un aumento monoclonal, caracterizado por una banda intensa y estrecha, debido a un sólo tipo de inmunoglobulinas, o bien una banda policlonal, es decir intensa y ancha. Aquí lo que se visualiza es más de un tipo de inmunoglobulinas.

REALIZACIÓN DEL PROTEÍNOGRAMA

El suero se diluye al doble (1:1) con un tampón Tris-barbital sódico, de pH 9. Sobre la placa de agarosa se aplica una plantilla, sobre la cual se dispensan 5 μ l de la dilución del suero (foto 1). Tras 4 minutos de incubación, el suero impregna el gel y entonces se elimina el suero sobrante con un papel secante. Posteriormente se somete el gel a un campo eléctrico, para lo cual se utiliza una cubeta de electroforesis. Ésta lleva dos electrodos, cada uno de ellos en un compartimento separado. En cada compartimento se añaden 35 ml de tampón Tris-barbital sódico (pH 9), y los comunicamos entre sí por medio de la placa de agarosa, que se dobla para puentearlos, como muestra la foto 2. Tras 25 minutos, a 80 voltios, se seca la placa con aire caliente, hasta que el gel se haya desecado por completo. Entonces se tiñe éste con un colorante azul ácido, durante 10 minutos. La tinción se decolora con una solución compuesta por agua, metanol y ácido acético, durante 5 minutos. La acción decolorante se detiene, simplemente lavando con agua. Se vuelve a secar la placa con aire caliente, y ya está lista para su evaluación.

Ahora se pueden ver las distintas bandas de los diferentes sueros aplicados, como se aprecia en la figura 3. A simple vista ya se aprecian diferencias de bandas en cada suero. La placa, seguidamente se introduce en el fotodensitómetro, donde se escanean todas las bandas. Este instrumento está acoplado a un ordenador, donde se representan las gráficas en forma de curva (figura 4). La intensidad de cada fracción es el alto de la curva, y el ancho de cada banda nos da el ancho de la curva. El instrumento fija como el 100 % la suma de todas las áreas de cada una de las curvas. El área de cada curva nos dará, por tanto, el porcentaje de cada fracción. Los intervalos de referencia que aparecen en la figura 4, se han calculado en nuestro laboratorio a partir de muestras de animales sanos, perros en este caso. La albúmina es la primera curva de la izquierda, y la fracción γ la última curva de la derecha. Entre ambas se distribuyen las fracciones α_1 , α_2 y β respectivamente.

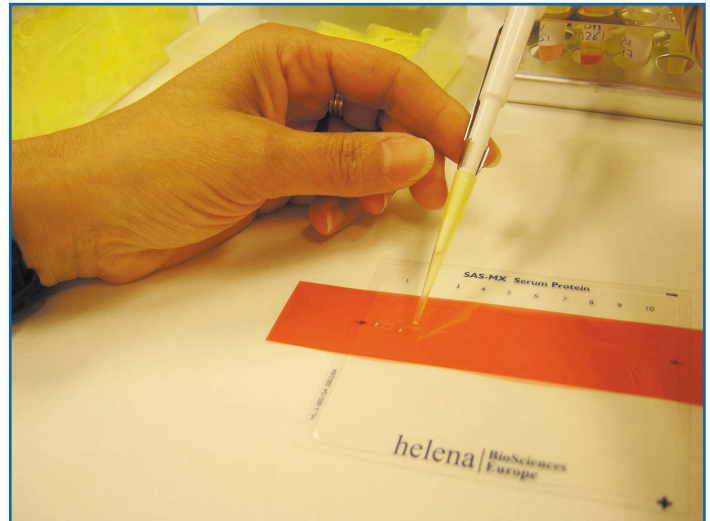


Foto 1.- En la foto se muestra la aplicación del suero en el gel de agarosa. Tras 4 minutos de incubación, el suero se habrá impregnado en el gel.

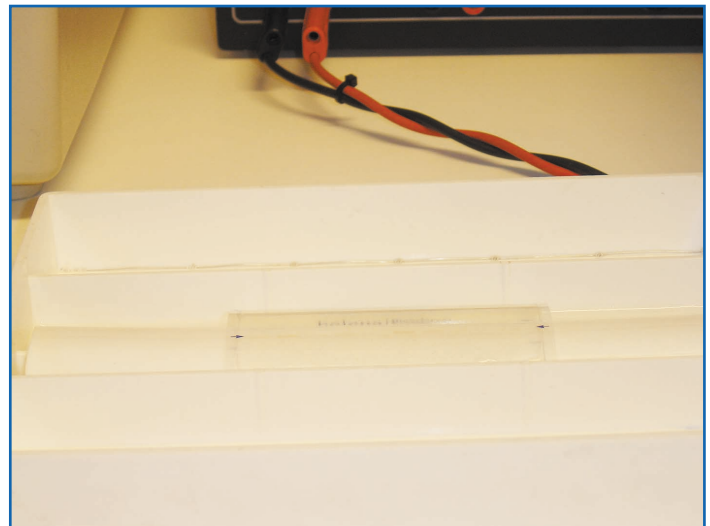


Foto 2.- Cubeta de electroforesis, donde se puede observar como la placa de agarosa une los dos compartimentos, comunicándolos entre sí para que pueda circular la corriente eléctrica. La placa se pone boca abajo, para evitar que el calor producido por la corriente eléctrica seque el gel.



Figura 3.- En esta placa podemos observar el proteínograma de 10 sueros distintos. Vemos que en algunos de ellos destaca alguna banda en particular sobre los demás. La albúmina es la fracción que más migra hacia el polo positivo

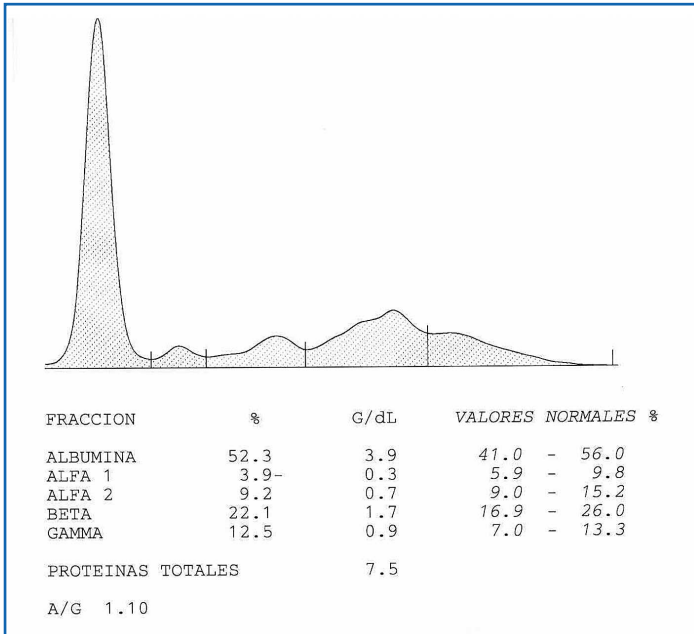


Figura 4.- Proteínograma de un suero canino normal. Aparecen los intervalos de referencia de cada fracción, expresados en porcentaje. También aparece el cociente albúmina/globulinas totales (A/G).

Es un error muy frecuente intentar cuantificar las distintas fracciones a partir del proteínograma. La premisa a plantear es la siguiente: si las proteínas totales suponen el 100 %, y tenemos el porcentaje de cada fracción, es sencillo calcular por tanto la cantidad de cada una de las fracciones proteicas. Sin embargo cuando se comparan los resultados de la albúmina, determinada fotométricamente con la calculada a partir del proteínograma, se observan marcadas diferencias. La explicación es que para poder cuantificar las proteínas a partir del porcentaje obtenido del proteínograma, se debería realizar una curva de calibración, comparar los resultados con un suero control, y que las condi-

ciones del ensayo (voltaje, tiempo de electroforésis y de tinción, de decoloración, etc.) siempre fueran las mismas, tal y como se realiza en el método fotométrico.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Evidentemente, la utilidad del proteínograma, como la de cualquier método diagnóstico, es confirmar o descartar la sospecha de una enfermedad. La variación de las distintas fracciones, está asociada a diversas patologías. En la tabla I se resumen los aumentos y descensos de las distintas fracciones, asociadas a patologías y condiciones concretas, que describimos a continuación.

Hemólisis y lipemia

La hemólisis aumenta la fracción β a niveles muy por encima de los normales, debido a la hemopexina y otras proteínas liberadas en la hemólisis. La lipemia también induce un aumento de la fracción β debido a las lipoproteínas (figura 5).

Inflamación aguda

En estos casos se suele hallar una ruptura de tejidos que puede producirse por infecciones (bacterianas, víricas o parasitarias), traumatismos, alteraciones cardíacas y metabólicas (uremia, shock...) y moquillo en los primeros estadios. En todos ellos se liberan proteínas de la fase aguda, que forman parte de las fracciones alfa 1 y 2, como hemos visto antes, por lo que observaremos un aumento de ambas fracciones.

Tabla 1.- Características de las distintas fracciones del proteínograma en ciertas condiciones clínicas.

	Proteínas totales	Albúmina	α ₁	α ₂	β	γ
Inflamación Aguda		N ↓	↑	↑		N ↓
Inflamación Crónica		N ↓	↑	↑	N ↑	↑
Hepatitis Severa	N ↓	↓↓	↓	↓	↓	↓
Cirrosis Crónica	Variable	↓↓		↓	↓	↑
Cirrosis Aguda	Variable	↓↓		↓	Puente β - γ	Puente β - γ
Síndrome Nefrótico	↓↓	↓↓		↑↑		N ↓
Hipogammalalbuminemia						↓↓↓
Hipergammaglobulinemia	N ↑	↓				↑
Hipoproteinemia	↓↓	↓↓	N ↑	N ↑	↓	Variable

Inflamación crónica

Las proteínas de la fase crónica se engloban en la fracción α_2 , por lo que ésta aumenta. A veces se observa un ligero aumento de la fracción β , debido a las proteínas del complemento. Este patrón se puede hallar por supuesto en todas las infecciones crónicas, como parasitosis, brucelosis, leptospirosis, etc., en procesos alérgicos, tumores, linfomas y en enfermedades auto inmunes.

Trastornos hepáticos

El hígado sintetiza la albúmina y las alfa globulinas, por lo que en alteraciones hepáticas severas se puede observar una disminución de ambas fracciones. Sin embargo, en las hepatitis agudas, cirrosis y alteraciones biliares, se observa un aumento de las fracciones β y γ . En el caso concreto de la cirrosis hepática el patrón es muy característico aumentando las fracciones en escalera desde la α_2 hasta la γ (figura 6).

Síndrome nefrótico

Una de las mayores características es la pérdida de grandes cantidades de proteína por el riñón. La albúmina es una de las que más se pierde por los glomérulos en fallos renales, junto con proteínas de bajo peso molecular, dando lugar a una bajada en la albúmina y en las fracciones alfa, y de forma más marcada en la α_2 , posiblemente debido al proceso inflamatorio (figura 7). La diabetes, intoxicaciones graves y alteraciones circulatorias, son las causas más frecuentes del origen del síndrome nefrótico. Las enfermedades inmunomediadas también pueden provocar fallo renal, debido a los inmunocomplejos.

Hipogammaglobulinemias

Como es bien sabido, las proteínas que componen la fracción γ son inmunoglobulinas o anticuerpos, por lo que una bajada en esta fracción implica una situación de inmunosupresión o inmunodeficiencia. Tratamientos con fármacos inmunosupresores, como ciclosporina o glucocorticoides en altas dosis, pueden reflejar este patrón electroforético, además de intoxicaciones graves. En cuanto a las enfermedades que pueden inducir inmunosupresión están la parvovirus canina y panleucopenia felina, e inmunodeficiencias felina y congénita.

Gammapatías

Las gammapatías son un aumento de la fracción γ por diversas causas. Según mi opinión, es en este tipo de alteraciones donde el proteinograma es más útil en el diagnóstico y

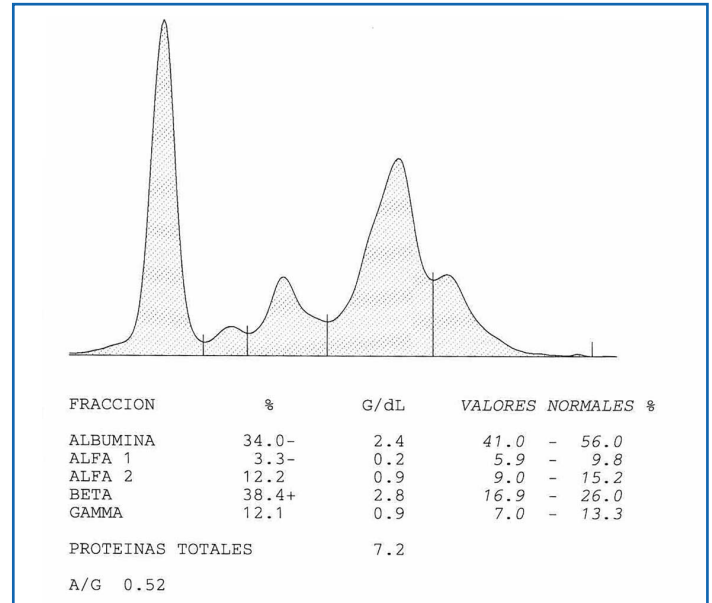


Figura 5.- Proteinograma de un suero hemolizado. Se puede observar un claro aumento de la fracción β .

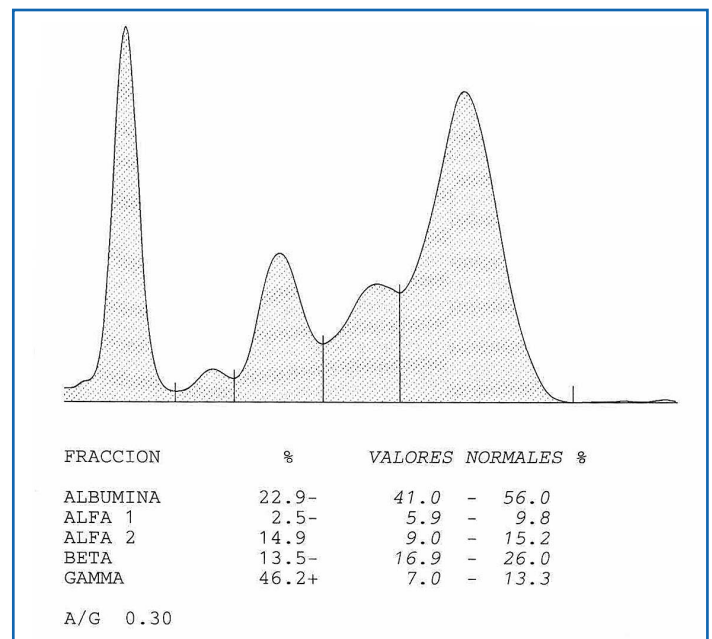


Figura 6.- Patrón típico de un proceso hepático severo, en este caso se trata de una cirrosis hepática. Las fracciones van aumentando desde la α_2 hasta la γ .

seguimiento de la evolución de una enfermedad. El aumento de esta fracción nos indica una respuesta exagerada del organismo frente a distintas situaciones, produciendo gran cantidad de anticuerpos. Los tumores, infecciones, linfomas, atopias y enfermedades autoinmunes, incrementan la fracción γ en el proteinograma. Las gammapatías pueden ser policlonales, es decir aumentan varias inmunoglobulinas, o monoclonales, donde destaca el aumento de una de las inmunoglobulinas.

Puesto que en la clínica diaria, la leishmaniosis y ehrlichiosis son infecciones bastante frecuentes, detallaremos más ampliamente el patrón electroforético de cada una de ellas.

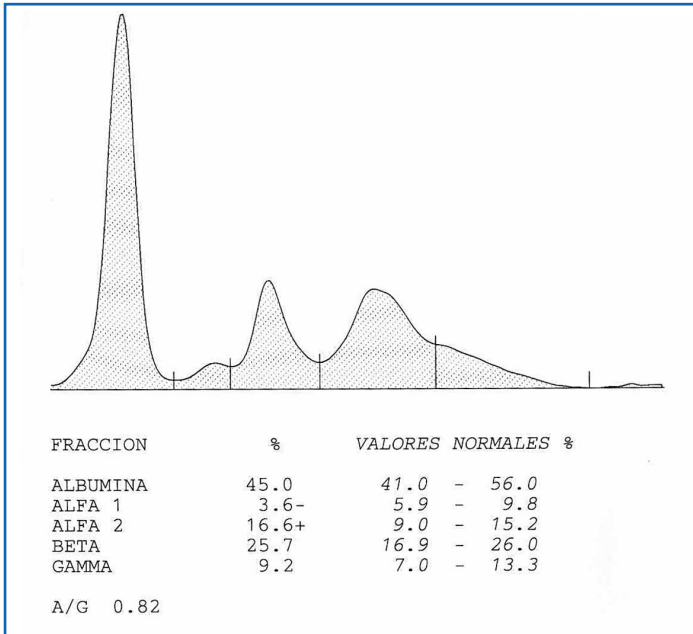


Figura 7.- Patrón típico de un proceso inflamatorio crónico. El porcentaje de la fracción α está muy elevado con respecto a los valores normales. En este caso el animal presentaba una insuficiencia renal.

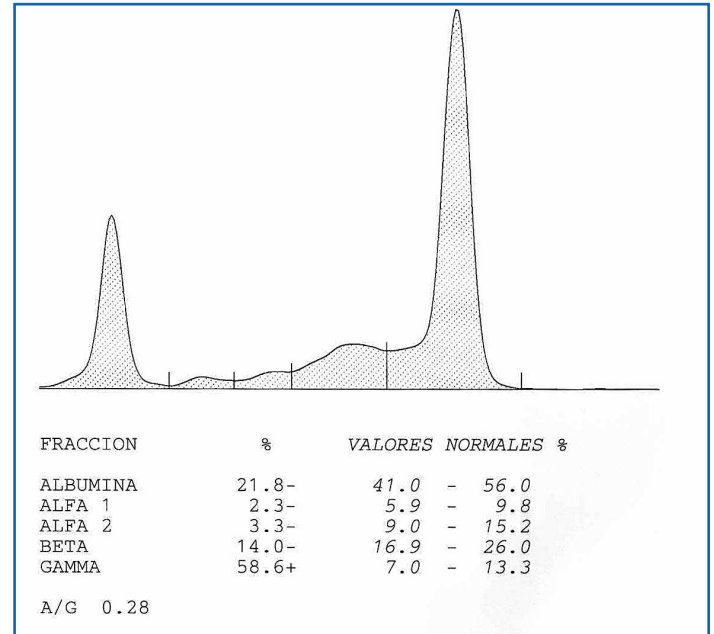


Figura 9.- Proteínograma de un perro con leishmaniosis, con un pico monoclonal en gamma.

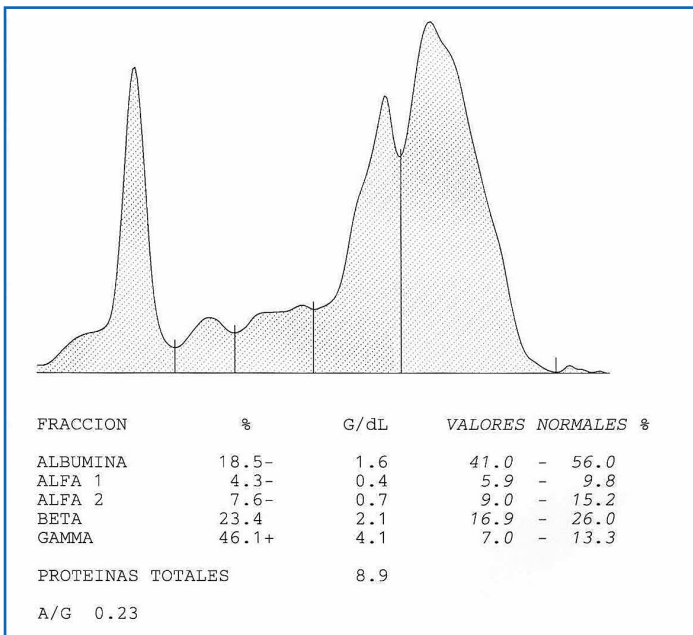


Figura 8.- Proteínograma de un perro con ehrlichiosis, diagnosticada por inmunofluorescencia indirecta. El aumento de las fracciones beta y gamma es patente.

En la ehrlichiosis, nos encontramos con una gamma policlonal (figura 8) con un aumento de beta. Tras el tratamiento, los niveles de globulinas se suelen normalizar entre los 3 y 9 meses, aunque a veces hay que esperar hasta los 18 meses. A veces suele aparecer un pico monoclonal.

En la leishmaniosis, es frecuente la aparición de picos monoclonales en la fracción gamma (figura 9), aunque también es frecuente observar gammas policlonales. La evolución de la enfermedad tras el tratamiento, se debe seguir por los resultados del proteínograma,

ya que es frecuente observar proteínogramas normalizados junto con títulos de anticuerpos positivos. Otras veces en cambio, se observa un aumento de la fracción gamma con títulos de anticuerpos negativos, cuando comienza una recidiva.

Por todo lo expuesto, está claro que el proteínograma es una herramienta muy útil en el diagnóstico y seguimiento de algunas enfermedades, siendo en los procesos que cursan con un incremento de la respuesta inmunitaria, donde su aplicación es idónea. Sabiendo interpretar la significación del aumento de una fracción concreta, podemos confirmar la sospecha de un diagnóstico y evaluar la evolución de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA:

- **Alper, C.A.** Plasma protein measurement as a diagnostic aid. N. England J. Med., 1974; 291; 287 - 290.
- **Balcells, A.** La clínica y el laboratorio. Masson-Salvat, 1989: 69 - 81.
- **Carcelen, J., Molano, I., Cámara C., Iniesta V., Viñuelas J., Mangas M., Fernández-Cotrino y Gómez nieto L.C.** Correlación entre disproteinemia y respuesta inmune. Argos. 2004 (62), 54 - 58
- **Lehninger, A.L. Bioquímica.** Proteínas: comportamiento en disolución. Ed. Omega. 1972; 139 - 158.
- **Rebar, A.H.** Cytology of fluids (evaluation of pleural, peritoneal, and pericardial effusions). TNAVC Proceedings, 1999.
- **Sainz Rodríguez, A. y Tesouro Díez, M. A.** Alteraciones biopatológicas: hematología, bioquímica sanguínea, urianálisis, etc. Canis et Felix. 2001 (51); 41 - 48.
- **Varela Balcells, F.** Inmunopatología de leishmaniosis canina: bases teóricas y aspectos prácticos. Fundación Purina. 1992. 21 - 24.