

Determinación de los valores normales de la electroforesis de proteínas por el método de elución

Determination of the electrophoresis normal values of protein by elution method

Maura Maidique Rojas(1), Pedro Abril Gómez(1), Milagros Marrero Luis(2)

Resumen

Se realizó un estudio observacional descriptivo con el objetivo de establecer el rango normal de las fracciones que componen la Electroforesis de Proteínas por el método de elución, se realizó una evaluación de esta determinación en el Laboratorio Clínico Central del Hospital General Provincial Docente de Morón "Capitán Roberto Rodríguez Fernández", la investigación se realizó durante Junio del 2001 con 65 pacientes donantes de sangre que acudieron al banco de sangre, los cuales al interrogatorio y examen físico no poseían ninguna enfermedad, ni estaban sometidos a ningún tratamiento médico. Los valores normales de las distintas fracciones fueron los siguientes: Albúmina 33,9 a 53,4 g/l; Alfa 1 : 0,63 a 3,51 g/l; Alfa 2 : 2,05 a 7,81 g/l; Beta: 4,22 a 10,34 g/l y Gamma : 8,59 a 19.4 g/l.

Palabras clave: ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS / elución.

1. Especialista de Primer Grado en Laboratorio Clínico.
2. Licenciada en Bioquímica.

INTRODUCCION

Las proteínas como constituyentes fundamentales que son de todos los protoplasmas, se han llamado la esencia del proceso vital. Intervienen como parte básica de la estructura de la célula viviente y también son responsables de una parte principal de su función. Por ejemplo, las proteínas sirven como componentes estructurales de las células, enzimas, algunas hormonas y algunos receptores para hormonas, moléculas de transporte, anticuerpos y factores de coagulación y otras funciones.

Los bloques de construcción de proteínas son los 20 alfa aminoácidos más comunes y estas difieren entre sí por los tipos de aminoácidos presentes, su disposición, cantidad, peso molecular, cambios superficiales, etc (1). Han sido descritos alrededor de 100 proteínas diferentes, y no cabe dudas de la existencia de muchas más que no han sido descritas.

Estas proteínas están sujetas a alteraciones algunas transitorias y fisiológicas frente a algunos estados, pero en otras ocasiones se necesita su determinación por fracciones debido a que se alteran sus valores en múltiples estados patológicos. Una de las técnicas empleadas para la determinación de las proteínas en el suero es la electroforesis(2,3).

Desde el punto de vista histórico la técnica de la electroforesis data de 1896, pero comenzó a aplicarse, de forma provechosa, en 1930, gracias a los trabajos de Tiselius, que fueron luego perfeccionando sus ulteriores investigaciones efectuadas por él mismo y además por Philpot, Svensson y Longsworth. Este método ha demostrado ser un procedimiento sumamente importante de investigación para las moléculas de dimensiones coloidales, como las proteínas.

Como esta técnica inicial de Tiselius era costosa y de ejecución larga, continuaron las investigaciones de otros procedimientos más sencillos de electroforesis. En 1939 y en los años siguientes aparecieron trabajos sobre electroforesis a través de algodón, amianto, lana de vidrio y gel de sílice. El empleo del

papel, como matriz o soporte para el recorrido electroforético, data de 1937. Sin embargo, tuvo que pasar una década para que se descubriesen sus amplias posibilidades ya que tiene múltiples ventajas sobre el método de Tiselius(clásico)como:

- El costo del equipo es considerablemente inferior.
- Se requieren cantidades más pequeñas para el análisis.
- Se logra un ahorro de trabajo y tiempo por ser innecesaria la diálisis previa.
- Puede hacerse simultáneamente múltiples análisis.
- Se pueden separar también iones de peso molecular más bajo que las partículas coloidales.
- Se consigue una absoluta separación de mezclas, lo que permite en muchos casos una buena especificidad.

Existen muchos trabajos que se han publicado sobre electroforesis que han empleado como soporte papel de filtro, pero existen otros soportes como papel de acetato de celulosa, el agar gel., gel de almidón y el cianógeno gel(4).

En nuestro país, así como en el Laboratorio Clínico del Hospital General Docente de Morón el soporte empleado es el papel de acetato de celulosa que posteriormente de la separación de las fracciones y su coloración se cuantifica mediante lectura densitométrica.

Actualmente no se está realizando este procedimiento en el Laboratorio por el método de lectura con el densitómetro ya que no contamos con el mismo, lo que nos llevó a la realización de este trabajo para dar una solución alternativa con la técnica de electroforesis empleando el método de elución y lectura fotométrica del colorante eluido, así como estableciendo sus valores de referencia en nuestro laboratorio, que será muy útil como complemento para el diagnóstico de algunas patologías como el Mieloma Múltiple(5,6,7), y para tomar conductas terapéuticas.

OBJETIVO

Establecer los valores de referencia de la Electroforesis de Proteínas por el método de elución.

METODO

Se realizó una evaluación de un medio diagnóstico en el Laboratorio Clínico del Hospital General Docente Capitán "Capitán Roberto Rodríguez Fernández " de Morón.

Se escogieron 65 pacientes donantes de sangre que acudieron al Banco de Sangre, los cuales al interrogatorio y escamen físico no poseían enfermedad, ni estaban sometidos a ningún tratamiento médico.

La toma de muestra se realizó previo ayuno de 12 horas, y se tomó a través de venipuntura en la flexión del codo del miembro superior no dominante con jeringuilla de cristal seca y químicamente limpia de 5ml y utilizando torundas de algodón estériles y alcohol al 70 % para asepticar la zona. La sangre fue transferida a un tubo seco de 13x100 separándosele posteriormente el coágulo y centrifugándolo durante 10 minutos a 3000 rpm, en una centrífuga Tehnika, posteriormente fue decantado el suero a otro tubo de ensayo seco de igual medida para aplicarle la técnica.

Técnica Operatoria para Electroforesis de Proteínas.

1. Se toma suero del paciente y se dosifican las Proteínas Totales por el método de Biuret en departamento de hemoquímica.

2. Se marca el papel de acetato de celulosa por la parte opaca, las marcas se realizan para garantizar la ubicación de 13 muestras, ocupando cada una aproximadamente 10 mm.
3. Colocar el papel de acetato de celulosa 10 minutos en la cámara de buffer.
4. Secar el acetato de celulosa con un papel de filtro y colocar 5 minutos en el puente con una corriente de 125 V y 10 mA.
5. Esperar de 30 a 40 minutos.
6. Apagar la fuente y colocar el acetato de celulosa en colorante rojo ponceau durante 5 minutos.
7. Aplicar sucesivos lavados con ácido acético al 5 % (alrededor de 5 minutos en cada cubeta).
8. Secar el acetato de celulosa.
9. Cortar con sumo cuidado cada fracción protéica (Albúmina, Alfa 1, Alfa 2, Beta, Gamma), que deben estar bien separadas y diferenciadas.
10. Colocar cada pedazo de papel de acetato de celulosa con la fracción protéica coloreada en un tubo bien limpio y debidamente rotulado.
11. Agregar 2,5 ml de buffer veronal a cada tubo.
12. Esperar 24 horas.
13. Proceder a la lectura fotométrica a 540 nm contra blanco reactivo (8,9).
14. Una vez obtenidos los valores de cada fracción en densidad óptica procedemos al cálculo del valor de cada fracción expresado en g/l, ya que lo realizamos en base al valor de las proteínas totales en cada caso.

Cuando contamos con el valor final de cada fracción proteica le determinamos la media y desviación estándar y se procedió a determinar si estos se distribuían de forma normal aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov con el que se demostró que los valores seguían una distribución normal (Gaussiana), por lo que establecimos que el rango normal en el sentido bioquímico clínico por la convención abarca los valores entre $X + 2DS$, es decir cerca del 95 % de los valores de una población clínicamente sana (10,11).

RESULTADOS

Como resultado del análisis estadístico realizado obtuvimos los siguientes valores medias y desviaciones estándares para cada una de las fracciones proteicas:

Albúmina: Media= 43,68 g/l ; DS= 4,86.

Alfa 1: Media=2,07 g/l ; DS=0,72.

Alfa 2: Media=4,93 g/l ; DS=1,44.

Gamma: Media=13,99 g/l ; DS= 2,70.

Establecimos que el rango normal en el sentido bioquímico clínico abarca los valores entre $X + 2DS$ y $X - 2DS$.

X = Media.

DS= Desviación Estándar

CONCLUSIONES

1. Los valores normales de la fracción albúmina se encuentran entre 33,9-53,4 g/l.
2. Los valores normales de la fracción de alfa 1 se encuentran entre 0,63-3,51 g/l.
3. Los valores normales de la fracción de alfa 2 se encuentran entre 2,05-7,81 g/l.
4. Los valores normales de la fracción beta se encuentran entre 4,22-10,34 g/l.
5. Los valores normales de la fracción gamma se encuentran entre 8,59-19,4 g/l.

ABSTRACT

A descriptive observational study was carry out with the aim of establishing a normal rank of fractions that constitute the electrophoresis of proteins by elution method. An evaluation of the determination in the central chemical laboratory of the teaching provincial Hospital "Capitán Roberto Rodríguez Fernández" in Morón was done. The research was done during June, 2001 with 65 blood donors that attended the blood bank whom in the survey and physical exam didn't have any illness nor were submitted to medical treatment the normal values of the different fractions were, as follows: Albumin 33,7 to 53,4 g/l; alpha 1: 1.63 to 3.51 g/l; alpha 2: 2.05 to 7.81 g/l; Beta: 4.22 to 10.34 g/l and Gamma: 8.59 to 19.4 g/l.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Hugh SC, Dietzler DN. Aminoácidos. En: Sonnenwirth AC, Jareff L. Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico. La Habana: Científico-Técnico; 1983.p.226-30.
2. Kay BM. Laboratory statistic, reference ranges, and quality control. En: Tilton RC, Balows A, editors. Clinical Laboratory Medicine. St Louis: Mosby; 1992.p.66-82.
3. Ward KV. Proteins. En: Tilton RC, Balows A, editors. Clinical Laboratory Medicine. St Louis: Mosby; 1992.p.157-78.
4. Henry RJ. Química Clínica; Principios y Técnicas. Barcelona: Jims; 1968.
5. Kogo Y. Diagnosis and treatment of multiple myeloma. Nippon Naika Gakkai Zasshi. 1999 Mar 10; 88 (3):357-40.
6. Joshua DE, Gibson J. Multiple myeloma-evolving concepts of biology and treatment. Aust N Z J Med.2000 Jun; 30 (3): 311-18.
7. Myeloma Physiopathology, diagnosis, principles of treatment. Rev Prat. 1992 Apr 1; 42 (7); 907-11.
8. Talaska FF. A Manual of Laboratory Diagnostic Test. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1992.
9. Thielmann K. Principios de Metodología en Bioquímica Clínica. Cuba: Instituto Cubano del Libro; 1973.
10. Pascual MC. Control de la Calidad en Bioquímica Clínica. La Habana: Ciencias Médicas; 1989.

ANEXO.

Tabla 1. Resultados de la media y desviación estándar de las fracciones proteicas.

Parámetros	Fracciones Protéicas				
	Albumina.	Alfa 1	Alfa 2	Beta	Gamma
Media.	43,68	2,07	4,93	7,28	13,99
Desviación estándar.	4,86	0,72	1,44	1,53	2,70