

Perfiles proteicos séricos asociados a la fisiopatología de los síndromes neurológicos en caninos

Terranova, E. (1).

RESUMEN

Se presenta un estudio de perfiles proteicos en suero canino mediante la técnica de electroforesis en gel de Acetato de Celulosa, con el fin de establecer una correlación clinicopatológica con enfermedades infecciosas, inflamatorias y neoplásicas del Sistema Nervioso Central (S.N.C.). Se llevó a cabo un estudio comparado de los perfiles proteicos obtenidos durante el curso de encefalitis viral por virus de distemper canino (C.D.V.), síndromes convulsivos, procesos tumorales del SNC y en animales clínicamente sanos, como grupo testigo. Se centró el análisis en la fracción Alfa 2 globulina del proteinograma electroforético sérico. Se halló una relación directa entre las variaciones de concentración relativa y absoluta de la mencionada fracción proteica con el estado clínico de los pacientes afectados por encefalitis infecciosa por Distemper virus. Se observó un aumento de la mencionada banda en relación directamente proporcional con el grado de deterioro de los pacientes. En base a los resultados obtenidos se presenta al proteinograma electroforético sérico como un recurso paraclínico de valor para el diagnóstico, seguimiento evolutivo y pronóstico de éstas afecciones del Sistema Nervioso Central.

Palabras clave: Proteinograma, electroforético, suero, S.N.C., alfa 2 globulinas1.

SUMMARY

A protein profile study using electrophoretic proteinogram with cellulose acetat gel looking for relationship between serum protein profiles and Central Nervous Sistem (CNS) pathologies specially on Canine Distemper virus encephalities (CDV) and healthy control group.

An increase of alpha 2 globulin fraction of the electrophoretic proteinogram was related with clinical evolution.

Electrophoretic serum proteinogram seems to be a valuable paraclinic resource for diagnostics as well as for monitoring CNS lesions evolution.

Keywords: Serum, electrophoretic, proteinogram, C.N.S., alpha 2 globulins.

INTRODUCCIÓN

En el análisis electroforético de proteínas séricas con soporte de acetato de celulosa en buffer de veronal sódico, se obtienen normalmente 5 bandas bien diferenciadas: Albúmina; Globulinas Alfa 1, Alfa 2, Beta y Gamma.

La fracción albúmina es la más prominente. Juega un papel importante en el control de la presión oncótica así como transporte de moléculas en la sangre.(3).

La fracción alfa 1 contiene diversos componentes proteicos de los cuales se destacan: antitripsina alfa 1, glucoproteína ácida alfa 1 y lipoproteína ácida alfa 1. (3).

La fracción alfa 2 es la más

heterogénea y sus componentes principales son: macroglobulina alfa 2, haptoglobina, cériuloplasmina, lipoproteínas de baja densidad, glucoproteína y neuraminaglicoproteína. (3).

El componente principal de la fracción beta es la transferrina. En soporte de gel de acetato de celulosa, presenta un pico bifásico, de los cuales, uno contiene los complementos. (3).

La fracción gamma está constituida por inmunoglobulinas sintetizadas en su mayor parte a nivel linfocito/plasmocitario y puede presentarse como una banda homogénea o polifásica, (monoclonal o policlonal), dependiendo de la especificidad de la respuesta. (3,4).

El comportamiento fisiopatológico de las globulinas séricas se relaciona con diversas entidades nosológicas y cuadros metabólicos derivados. (2,3,4).

Tradicionalmente se ha estudiado la relación albúmina/globulinas totales o gamma globulina. (1,4,5,6).

En base a lo mencionado el proteinograma electroforético se ha utilizado como recurso paraclínico no específico. En algunas afecciones como Mieloma múltiple, Leucemia linfocítica crónica, Linfoma, Leishmaniasis y Erlichiosis, se presentan perfiles monoclonales en la banda gamma que se relacionan con buena especificidad. (4).

La mayoría de las proteínas presentes

Aprobado 9/12/96

(1)D.M.V. Chaná 2373. CP 11200 Montevideo, Uruguay.

Tel/Fax 402.62.72— 099.68.26.11

en las bandas de corrida electroforética se sintetizan en el hígado a excepción de inmunoglobulinas que se producen a nivel linfocito/plasmocitario. (3,4).

En procesos inflamatorio/infecciosos y neoplásicos, los hepatocitos, que normalmente sintetizan albúmina, se reprograman, discontinuando dicha síntesis, para producir globulinas que jugarán diversos roles en la sangre, llamadas Reactivos de Fase Aguda (R.F.A.). Estas proteínas se distribuyen en el electroforetograma entre las bandas alfa 2, beta y gamma.(3,4).

En estudios que relacionan perfiles proteicos de electroforetogramas y síndromes neurológicos, se ha buscado la correspondencia entre proteinogramas en suero y líquido cefalorraquídeo (L.C.R.). (1,5).

En estos trabajos se centró la atención en las fracciones albúmina y gamma, confirmando su correlación. (1,5).

En el presente trabajo se estudia el comportamiento de la fracción alfa 2 del proteinograma sérico en relación con la encefalitis virales por virus de Distemper canino (C.D.V.), síndromes convulsivos y neoplasias del S.N.C..

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó equipo para electroforesis consistente en: cuba con soporte de gel de acetato de celulosa en buffer de veronal sódico. Fuente de corriente continua de intensidad y voltaje variable y regulable, (Cole Parmer E- 28400-05). Colorante Ponceau S, revelado con ácido acético al 5% y eluido con ácido acético al 80%. Lectura espectrofotométrica con colorímetro (Milton Roy Spectronic 20 D+) de rango de lectura de 440 - 660 nm.

Se sembraron 50 µl de cada suero problema sobre el soporte embebido en buffer de veronal sódico a un pH de 8.6 y se sometieron a un tiempo de corrida de 35 minutos.

Se tomaron 48 pacientes caninos arribados a consulta entre los años 1993 y 1996, distribuidos de la siguiente forma: Grupo A, Encefalitis por Distemper virus canino (C.D.V.): 2 machos, 5 hembras mestizos de entre 8 y 24 meses de edad; 2 machos Caniche toy de 30 meses; 1 hembra Pekines de 18 meses.; 1 hembra Gran Danés de 3 años; 1 hembra Ovejero Alemán de 18 meses. Total: 12 individuos. Todos ellos presentaron encefalitis por CDV, diagnosticados por técnica de inmunocitoquímica de exudado nasal y conjuntival, por técnica de Avidina biotina peroxidasa, utilizando anticuerpos monoclonales antidistemper Rhone Mérieux y kit universal DAKO.

Grupo B, Síndromes convulsivos crónicos (CONV): 2 hembras Pinscher miniatura de 3 años de edad; 2 hembras y 3 machos Caniche toy de 18 y 50 meses; 1 hembra Yorkshire terrier de 3 años; 1 macho Ovejero Alemán de 6 años; 1 macho Setter irlandés de 5 años; 1 hembra y 1 macho mestizos de 4 y 7 años respectivamente. Total: 12 individuos. Estos pacientes presentaron síndromes convulsivos crónicos de etiología idiopática (epilepsia verdadera) y hemodinámica (conv.) de tipo Jacksoniano. No se incluyeron aquellos síndromes convulsivos de origen metabólico (uremia, diabetes), carencial ni traumático.

Grupo C, Neoplasias de SNC: 1 hembra Cocker Spaniel ingles de 5 años; 1 macho Golden Retriever de 9 años; 1 hembra Pinscher miniatura de 11 años; 2 machos y 2 hembras Ovejero Alemán de 9 y 11 años respectivamente; 2 hembras y 2 machos mestizos de 7 y 14 años respectivamente; 1 macho Boxer de 9 años. Total: 12 individuos. Este grupo presentó neoplasias primarias y metastásicas que afectaron encéfalo y médula espinal diagnosticados por examen neurológico, radiográfico y confirmado en 8 de ellos por necropsia.

Grupo D, Testigo: 2 machos y 1 hembra mestizos de 18 a 30 meses de edad; 2 machos y 2 hembras Caniche toy de 18 a 50 meses; 3 machos y 2 hembras Ovejero Alemán de 18 a 50 meses. Total: 12 individuos. Animales adultos jóvenes clínicamente sanos.

Los grupos B, C y D resultaron negativos a las pruebas de inmunocitoquímica antiviral Distemper y fueron utilizados como control negativo de la reacción para el grupo A.

Se procedió a tomar muestras de sangre entera sin anticoagulante al arribo a consulta, para la realización de proteinograma electroforético. Todas las

muestras se refrigeraron y procesaron antes de 24 horas postextracción.

Se utilizó suero sanguíneo, para obviar la presencia de fibrinógeno, de modo que resultara un perfil proteico constituido por las fracciones Albúmina, Globulinas Alfa 1, Alfa 2, Beta y Gamma.

Se procedió al estudio comparado de las mencionadas fracciones proteicas y su posible correlación con las patologías que identifican a cada grupo.

Se realizaron curvas de frecuencia de concentraciones proteicas de cada fracción y para cada grupo.

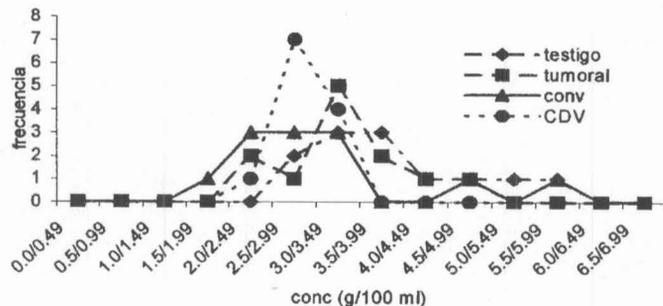
Se aplicó tratamiento estadístico de las muestras determinando: promedio, mediana, modo, desviación standard, coeficiente de variación, límite de confianza y test de t de distribución normal de la muestra.

RESULTADOS

De los registros obtenidos de los electroforetogramas y sus correspondientes curvas de distribución se observó el siguiente comportamiento:

- 1- Albúmina: No se encontraron patrones de distribución significativos entre los grupos y sus correspondientes patologías; dado por frecuencias heterogéneas dentro de cada grupo, con la salvedad del que representa a la encefalitis viral (CDV), que muestra una tendencia a la hipoalbuminemia. (gráfico N° 1).
- 2- Alfa 1 globulinas: Todos los grupos de muestra presentaron un patrón de distribución similar y homogéneo. (gráfico N° 2).
- 3- Alfa 2 Globulinas: En las curvas comparadas de los diferentes grupos se encontró una distribución aproximadamente normal (Gaussiana), para los testigo y encefalitis viral por Distemper

Gráfico N° 1. Frecuencia de distribución de Albúmina en grupos de muestra.



Conv.= Síndromes convulsivos crónicos
C.D.V.=Virus Distemper canino.

(CDV), siendo en cambio bimodal en los casos de síndromes convulsivos y tumoral. (gráfico N° 3).

En todos los casos se observó en un primer análisis de los gráficos, un desplazamiento hacia mayor concentración con respecto del grupo testigo.

4- Beta globulinas: No se observó una dispersión normal dentro de cada grupo y no se pudo determinar con precisión un patrón de comportamiento entre ellos.

El grupo testigo presentó una curva de distribución bimodal, repitiéndose y desplazándose hacia mayor concentración en CDV, convulsivos (CONV) y haciéndose trimodal en tumoral. (gráfico N° 4).

5- Gamma globulinas: Los histogramas de éste grupo mostraron una distribución aproximadamente normal en los grupos testigo, CDV y tumoral, presentándose trimodal en el grupo CONV..

No se observó un patrón concluyente para ésta fracción. (gráfico N° 5).

Del análisis de las curvas de distribución para las diferentes fracciones, se seleccionó la correspondiente a Alfa 2 Globulinas para tratamiento estadístico, cuyos resultados se resumen en el cuadro N° 1.

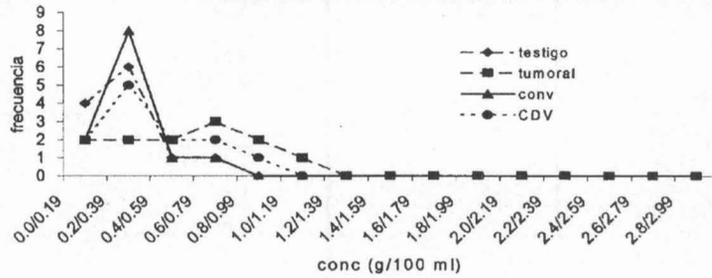
DISCUSIÓN

De la interpretación de los histogramas para las distintas fracciones proteicas y grupos de muestra se destacan los correspondientes a la fracción Alfa 2 Globulinas por mostrar un patrón de distribución aproximadamente normal del grupo CDV y testigo por lo cual se procedió a la aplicación de tratamiento estadístico para estudiar su correlación clínico-patológica. Por otra parte, dadas las características bioquímicas y la diversidad de proteínas de importancia fisiopatológica que la fracción Alfa 2 presenta, es que se centralizó el estudio en ella.

En función de los valores promediales en los grupos Testigo y CDV y los resultados estadísticos resumidos en el cuadro N° 1 se puede inferir que existiría una correlación fisiopatológica referida a las Alfa 2 Globulinas y las encefalitis virales. Por lo dicho, se produciría un incremento de síntesis, lo que concuerda con las funciones biológicas que sus proteínas integrantes tienen. Se trataría entonces de un incremento de síntesis como factor de respuesta a la patología presente.

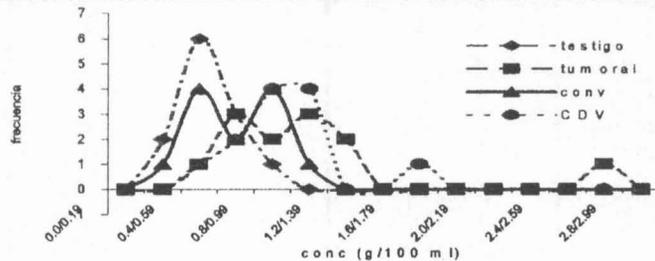
En el caso de las patologías tumorales y

Gráfico N° 2. Frecuencia de distribución de Alfa 1 globulinas en grupos de muestra.



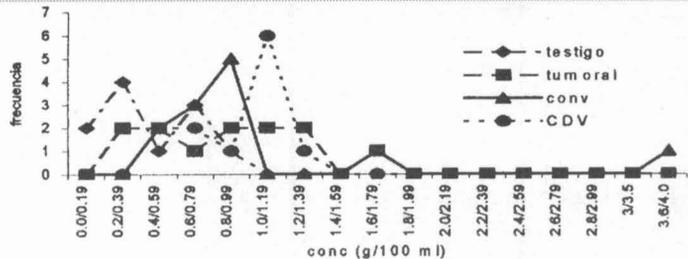
Conv.= Síndromes convulsivos crónicos
C.D.V.=Virus Distemper canino.

Gráfico N° 3. Frecuencia de distribución de Alfa 2 Globulinas en grupos de muestra.



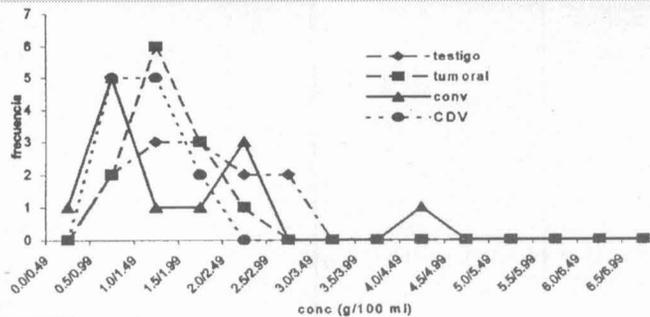
Conv.= Síndromes convulsivos crónicos
C.D.V.=Virus Distemper canino.

Gráfico N° 4. Frecuencia de distribución de Beta Globulinas en grupos de muestra.



Conv.= Síndromes convulsivos crónicos
C.D.V.=Virus Distemper canino.

Gráfico N° 5. Frecuencia de distribución de Gamma Globulinas en grupos de muestra.



Conv.= Síndromes convulsivos crónicos
C.D.V.=Virus Distemper canino.

Cuadro N° 1. Datos estadísticos sobre frecuencias de distribución de alfa 2 globulinas para grupos testigo y C.D.V.

Dato estadístico	Grupo Testigo	Grupo C.D.V.
n	12	12
Promedio	0.545	0.961
Mediana	0.495	0.495
Moda	0.495	0.960
Desv. standard	0.0175	0.069
Coef. de variación	0.032	0.072
Test de Student t.t = 35.0637	p < 0.001	

convulsivas, aunque no presentaron una distribución normal, al describir una curva bimodal, (gráf. N° 3), presentaron sin embargo, un desplazamiento hacia el incremento de concentración con respecto al grupo testigo.

Se debe tener en cuenta la variedad de etiologías en éstos grupos, así como la variedad de proteínas perteneciente a la banda Alfa 2, que responderían de manera diferencial.

Para el caso de la fracción Albúmina, ésta tiene poca incidencia reactiva en los procesos morbosos y tiende a disminuir por incremento de síntesis de otras fracciones o por su pérdida, (3), por lo cual se desestimó.

La fracción Alfa 1 globulina presentó un patrón de distribución muy similar en todos los grupos, descartando entonces una relación clínico-patológica detectable por éste método.

La fracción Beta Globulina tiene componentes con diferentes orígenes (Hepático y Linfocito/plasmocitario), en consecuencia poseen diferentes grados y tipos de reactividad, lo que explicaría la distribución heterogénea en todos los grupos.

En el caso de la fracción Gamma Globulina, ésta corresponde a las Inmunoglobulinas (Igs) siendo lógico esperar que respondan de manera diferencial en los distintos grupos y se explicaría la gran superficie de distribución observada en el grupo testigo, lo que respondería a diferentes estados inmunitarios compatibles con la homeostasis (diversidad de razas, vacunaciones recientes, etc.).

En el presente estudio se observa que la utilización de éste recurso aplicado a las enfermedades del SNC y particularmente a las encefalitis de etiología viral CDV, es posible y útil desde el punto de vista clínico, teniendo en cuenta que también se presentan alteraciones en otros procesos inflamatorios agudos, los que se deben descartar previamente por la clínica y otros estudios paraclínicos de rutina.

Por ésta razón, no debe tomarse éste como único y específico recurso diagnóstico, sino como un instrumento más en la

aproximación diagnóstica. Se ha constatado una estrecha relación entre las concentraciones de Alfa 2 globulinas y el cuadro clínico de los pacientes portadores de CDV.

Como las fracciones Alfa 2 y Beta incluyen las proteínas sintetizadas por los hepatocitos en respuesta a procesos inflamatorio/infecciosos y tumorales, constituyendo los reactores de fase aguda (RFA), éstas células discontinúan la síntesis de Albúmina y producen la respuesta mencionada desviando la síntesis proteica hacia globulinas alfa 2 y beta, de manera que los perfiles proteicos mostrarán incrementos en las fracciones de globulinas en un entorno de normoalbuminemia o hipoalbuminemia, con un valor de proteína total elevado. (4).

Los incrementos de los RFA presuponen acumulación de proteínas en la fracción Alfa. Parte de las proteínas texturales liberadas por daño celular viajarán en la sangre. Muchos de los polisacáridos ácidos liberados se combinarán con la proteína C reactiva (PCR), constituyente de la fracción Beta y Gamma, la cual a nivel hepático se desdoblaría y formaría nuevas glucoproteínas de bajo peso molecular, como ser: glucoproteínas ácidas alfa 1 antitripsina alfa 1 y glucoproteína alfa 2 HS. (3).

La PCR se combina con mucopolisacáridos que contienen ácido siálico, que aumenta en los procesos inflamatorios agudos. Muchos leucocitos de lesión inflamatoria se destruyen, produciéndose una proliferación de aquellos como respuesta, para lo cual necesitan el aporte de cobre que estaría ligado a la Ceruloplasmina (proteína contenida en la fracción Alfa 2), para lo cual se incrementaría su síntesis. (3). Situación ésta muy oportuna, teniendo en cuenta la infiltración leucocitaria que forma los manguitos perivasculares característicos de las encefalitis por CDV.

El aumento de los complementos y de inmunoglobulinas provocaría un aumento de los picos de dichas fracciones abarcando desde Alfa 2 hasta el pico de Gamma.

Dentro de la fracción Alfa 2, subfracciones como Haptoglobina,

Macroglobulina alfa 2, Céruloplasmina, poseen actividades específicas en los mecanismos de regeneración y reorganización de tejidos dañados. (3).

Dado que las variaciones en los picos en la fracción Alfa 2 demostraron tener una correlación directa con el estado clínico de los pacientes, en particular los del grupo CDV, se destinó la atención a ésta fracción.

La determinación de la correlación fisiopatológica entre concentraciones de Alfa 2 globulinas y las afecciones del SNC estudiadas, amerita la profundización de estudios cualitativos y cuantitativos de las subfracciones con criterio clínico para aumentar la precisión diagnóstica y mejorar las pautas terapéuticas en base a un conocimiento fisiopatológico mayor.

CONCLUSIONES

De lo observado en el presente estudio se desprende que el electroforetograma de proteínas séricas, constituye un recurso paraclínico valioso aplicado a los casos de afecciones del SNC particularmente a encefalitis de etiología infecciosa, (CDV).

La correlación lineal entre las bandas Alfa 2 y los cuadros de encefalitis por CDV, permite objetivar el status clínico de cada paciente sobre bases documentables.

Si bien no son análisis específicos que determinen per se un diagnóstico etiológico de las noxas, ofrecen en cambio, un cuadro sinóptico general sobre el estado fisiopatológico del paciente, con el consiguiente valor clínico. Esto permite establecer un pronóstico y evaluar tácticas y estrategias terapéuticas en forma eficaz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BICHSEL, P.; VANDEVELDE, M.; VANDEVELDE, E.: (1984) et al. *Immunoelectrophoretic determination of Albumin and IgG in serum and cerebrospinal fluid in dogs with neurological diseases. Res. Vet. Sci.* 37 (1) 101-107.
- DORFMAN, M.; DINSKY, D. (1995). *Paraproteinemias. Selecciones Veterinarias*, 3 (2) 99-105.
- KAWWAI, T. (1977) *Proteínas Plasmáticas. Aplicación a la Clínica. Ed. Médica Panamericana*. 27-34; 35-44; 45-59; 60-74; 82-102.
- NELSON, R.N.; COUTO, C. G.: (1995) *Proteínas Plasmáticas. Pilares de Medicina interna en Animales Pequeños. Ed. Intermédica.*, 891-892.
- SORJONEN, D.C.; COX, N.R.; SWANGO, L.J. (1989) *Electrophoretic determination of Albumin and Gamma globulin concentration in the cerebrospinal fluid of dogs with encephalomyelitis attributable to canine distemper virus infection: 13 cases. (1980-1987). J.A.V.M.A.* 195 (7) 977-980.
- TIPOLD, A.; PFISTER, H.; VANDEVELDE, M. (1993) *Determination of IgG index for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in dogs using ELISA. Res. Vet. Sci.* 54 (1) 40-44.